

**Государственный Научный Центр
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

На правах рукописи

Берзина Мария Яновна

Новые аналоги аденозина:
химико-ферментативный подход к получению

Специальность: 1.4.9 Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Константинова И.Д.

Москва, 2023 г

Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы	12
1.1. Противоопухолевые аналоги аденозина.....	14
1.1.1. Кладрибин.....	16
1.1.2. Флударабин.....	19
1.1.3. Клофарабин.....	19
1.1.4. N ⁶ -замещенные производные аденозина	20
1.1.5. Аналоги аденозина как иммуноонкологические препараты	23
1.2. Агонисты и антагонисты аденозиновых рецепторов	26
1.2.1. Роль аденозиновых рецепторов в организме.....	28
1.2.2. Аденозиновые рецепторы как мишени для терапии	29
1.3. Флуоресцентные нуклеозиды	36
1.3.1. Триазолил-замещенные пурины	38
1.4. Методы химической модификации пуринового основания	44
1.5. Ферментативный синтез нуклеозидов с использованием нуклеозидфосфорилаз	51
2. Обсуждение результатов	54
2.1. Синтез серии 2-хлор-N ⁶ -замещенных аналогов аденозина с применением методов классического химического синтеза и исследование биологической активности полученных соединений.....	55
2.1.1. Получение аналогов 2-хлораденозина: реакция нуклеофильного замещения в цикле (S _N Ar)	55
2.1.2. Получение аналогов 2-хлораденозина: аммонолиз ацетильных защит....	60
2.1.3. Определение цитотоксической активности аналогов аденозина <i>in vitro</i> .	63
2.1.4. Изучение рецепторной активности аналогов аденозина <i>in vitro</i> на валидированной экспериментальной модели A ₁ аденозиновых рецепторов.....	65
2.2. Химическая модификация пуринового основания: азид-алкиновое присоединение	71

2.3. Ферментативный синтез новых аналогов аденозина из модифицированных аденинов при помощи реакции трансгликозилирования.....	74
2.4. Ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов из синтезированных ранее рибонуклеозидов при помощи реакции трансгликозилирования	82
2.4.1. Ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов 2-хлор-N ⁶ -замещенных аденозинов.....	83
2.4.2. Ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)-пуринов.....	87
2.5. Изучение фотофизических свойств триазолил-замещенных пуринов.....	89
2.6. Разработка способа получения 2'-деокси-2'-фтор-арабинозидов N ⁶ -замещенных производных 2-хлораденозина.....	92
2.7. Изучение аномалии в спектрах ЯМР аналогов аденозина.....	95
3. Экспериментальная часть.....	116
3.1. Материалы и методы	116
3.2. Конденсация 2,6-дихлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)пурина N-нуклеофилами	117
Общая методика проведения реакции	117
3.3. [3+2] азид-алкильное циклоприсоединение.....	138
3.4. Аммонолиз с получением свободного углеводного остатка.....	140
Общая методика проведения реакции	140
3.5. Ферментативный синтез рибозидов при помощи реакции трансгликозилирования.....	160
3.6. Ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов при помощи реакции трансгликозилирования.....	163
Заключение.....	174
Список сокращений	175
Список использованной литературы.....	177

Введение

Нуклеозиды являются широко распространенным в природе ключевым классом биологически активных соединений. Особую роль среди всех нуклеозидов занимает аденозин, выполняющий в клетке множество различных уникальных функций. Помимо того, что он является одним из мономеров нуклеиновых кислот (в форме аденозина – в РНК, в форме 2'-дезоксаденозина – в ДНК), он входит в структуру коферментов S-аденозилметионина и кофермента А. Его 5'-нуклеотиды (аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат и аденозинтрифосфат) играют ключевую роль в биохимических процессах: участвуют в процессах передачи энергии, а циклоаденозинмонофосфат (цАМФ) является важнейшим вторичным посредником, реализующим передачу сигнала внутри клетки. Также аденозин регулирует межклеточные взаимодействия, выступая ингибиторным нейротрансмиттером для аденозиновых рецепторов нескольких подтипов, имеющих разнообразное распределение в тканях организма и регулирующих внутриклеточные процессы. Вовлеченность аденозина и его нуклеотидов в разнообразные биологические процессы делает его интересной целевой молекулой для исследования механизмов взаимодействия с различными мишенями и поиска структурных аналогов с иным клеточным метаболизмом.

Аналоги аденозина занимают особое место среди модифицированных нуклеозидов, проявляя антивирусную, противоопухолевую, иммуносупрессорную активность, действуют как агонисты или антагонисты по отношению к аденозиновым рецепторам.

Среди множества аналогов аденозина стоит отдельно отметить кладрибин – 2-хлорзамещенный аналог 2'-дезоксаденозина (Рисунок 1). Он используется в качестве противоопухолевого цитостатического препарата в терапии волосатоклеточного лейкоза. В клетке кладрибин подвергается фосфорилированию внутриклеточными киназами и в виде активного метаболита 5'-трифосфата-2-хлор-2'-дезоксаденозина проявляет цитостатический эффект в отношении делящихся и неделящихся клеток, ингибируя синтез и репарацию ДНК, что в конечном итоге приводит к гибели клетки. Кроме того, благодаря иммуносупрессорной активности в отношении лимфоцитов кладрибин применяется в терапии рассеянного склероза, с возможностью перорального введения, под торговым названием Мавенклад. На сегодняшний день кладрибин – единственный аналог аденозина двойного применения в клинической практике.

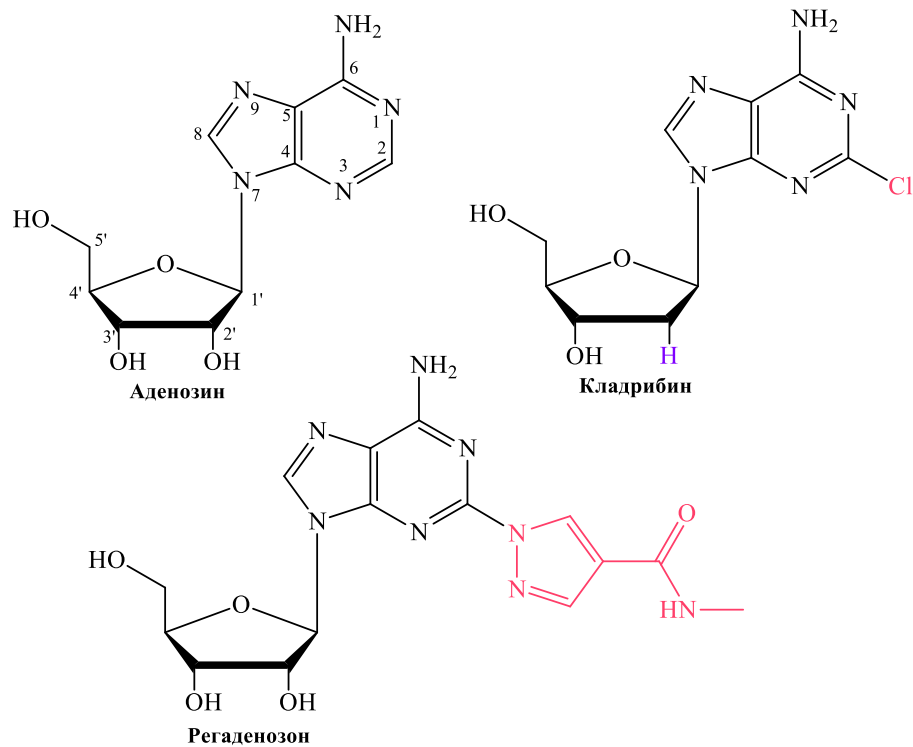


Рисунок 1 – Структуры аденозина, кладрибина и регаденозона

Интересно, что среди рибозидных аналогов аденина нет препаратов, которые использовались бы в качестве антиметаболитов или противовирусных соединений. Но стоит упомянуть о немаловажном свойстве аналогов аденозина выступать в качестве селективных агонистов или антагонистов аденозиновых рецепторов разных подтипов (A_1 , A_{2A} , A_{2B} и A_3). Несмотря на хорошую изученность этой темы, до сих пор в клиническую практику введены только два препарата с агонистическим действием по отношению к аденозиновым рецепторам: собственно, неселективный агонист аденозиновых рецепторов – аденозин и агонист аденозиновых рецепторов A_{2A} регаденозон (Рисунок 1), которые используются при проведении перфузионной эхокардиографии миокарда со стрессом в режиме реального времени для выявления ишемической болезни сердца и радиоизотопной визуализации перфузии миокарда во время стресс-тестов с увеличением потребности миокарда в кислороде [1-3].

Разнообразные синтетические агонисты и антагонисты аденозиновых рецепторов до сих пор не нашли широкого применения, поскольку обладают побочными эффектами из-за широкого спектра активации разных типов аденозиновых рецепторов в тканях организма. Такие эффекты включают вазодилатацию, снижение частоты сердечных сокращений, снижение артериального давления [2, 4]. Задача поиска новых структурных аналогов аденозина с избирательным действием на определенный подтип рецепторов остается открытой.

Модификацию структуры аденозина можно проводить по двум направлениям: в гетероциклическом пуриновом основании и в углеводном остатке. Из-за наличия большого количества оптически активных центров проведение химических модификаций углеводного остатка – это сложный и трудоемкий многостадийный процесс, связанный с использованием дорогостоящих реагентов и с получением большого числа побочных продуктов и сложно разделимых стереоизомеров, а значит и необходимостью проведения многочисленных стадий очистки, что приводит к большим потерям в количестве желаемого продукта и низкому выходу.

Альтернатива химическому гликозилированию – ферментативное трансгликозилирование, осуществляющее замену одного углеводного остатка нуклеозида на другой. Однако практически все катализируемые бактериальными ферментами реакции проходят обратимо, поэтому в каждом случае необходима тщательная оптимизация условий проведения реакции с постоянным контролем протекания реакции во времени.

Цель данной работы – разработка химико-ферментативного метода синтеза новых модифицированных аденозиновых нуклеозидов рибозы и 2-дезоксирибозы. Сочетание химического и ферментативного синтеза позволяет методами химического синтеза внести модификации по гетероциклическому основанию, а методом ферментативного синтеза проводить замену стабильной в условиях химического синтеза рибозы на менее стабильную 2-дезоксирибозу.

Объектом исследования являются новые нуклеозиды – аналоги природного аденозина. Предметом исследования является возможность проведения последовательного комбинированного химико-ферментативного синтеза новых нуклеозидов аденина с модификациями в структуре пуринового гетероцикла и углеводного остатка.

Исследование проводилось с целью создания серии новых аналогов аденозина, изучения их биологической активности, а также для определения корреляции «структура-активность» в ряду полученных соединений и разработки дальнейших направлений модификаций гетероциклического основания и углеводного остатка для усиления желаемой биологической активности.

Комплекс экспериментальных работ, выполняемых в рамках настоящей диссертационной работы, можно подразделить на следующие основные исследовательские задачи:

- модификации гетероциклического пуринового основания по C2 и N⁶-положениям рибонуклеозида с получением 2,6-дизамещенных аналогов аденозина с применением методов классического химического синтеза;

оптимизация условий синтеза, выделение продуктов и подтверждение структуры физико-химическими методами анализа;

- исследование субстратной специфичности пурипнуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к полученным рибонуклеозидам, оптимизация условий ферментативного синтеза 2'-дезоксирибонуклеозидов, выделение продуктов и подтверждение структуры физико-химическими методами анализа;
- исследование возможности ферментативного синтеза 2'-дезоксидеозидов из полученных рибонуклеозидов;
- проведение ферментативного синтеза новых аналогов аденозина из модифицированных по N⁶-положению или по C2 и N⁶-положению аденинов, выделение продуктов и подтверждение структуры физико-химическими методами анализа;
- определение биологической активности полученных модифицированных аденозиновых рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов.

Работа выполнена в лаборатории Биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) при взаимодействии с коллегами из других подразделений Института, а также с коллегами из Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина и с кафедры фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета.

Актуальность темы исследования обусловлена необходимостью разработки новых аналогов аденозина, потенциально обладающих антипролиферативной, антибактериальной, противовирусной или агонистической по отношению к аденозиновым рецепторам активностью. Используемые в клинической практике модифицированные нуклеозиды обладают системным действием на организм человека, часто вызывая нежелательные побочные эффекты. Поэтому синтез новых специфичных нуклеозидов крайне актуален. Проведенный комплекс химико-ферментативных синтезов позволил синтезировать четыре серии новых C2,N⁶-дизамещенных аналогов аденозина, получить первичные данные скрининга их биологической активности.

Научная новизна исследования заключается в разработке новых химико-ферментативных подходов к синтезу аналогов 2-хлор- и 2-амино-аденозина, замещенных по N⁶ атому остатками амидов хиральных аминокислот, линейных и разветвленных аминокислот, 4-замещенными триазол-1-илами. Полученные 4 серии нуклеозидов относятся по типу углеводного остатка к рибозидам, 2'-дезоксирибозидам и 2'-дезоксидеозид-арабинозидам. Показано наличие высокой агонистической активности по

отношению к аденозиновым A₁ рецепторам у нуклеозидов, имеющих остатки линейных и разветвленных аминок спиртов в N⁶-положении.

Впервые методом спектроскопии ЯМР доказано существование внутримолекулярной водородной связи N⁶CH^δ...N7 в 2-хлор-N⁶-замещенных аналогах аденозина, что поставило точку в обсуждении гипотезы зарубежных коллег о существовании amino-имино-таутомерных форм для 2-хлор-N⁶-замещенных аденозинов.

Теоретическая и практическая значимость работы разработаны основные подходы к проведению химико-ферментативных синтезов 2-хлор- и 2-амино-аденозинов, замещенных по N⁶ атому основания. Доказана высокая эффективность и региоселективность реакции трансгликозилирования для получения серий нуклеозидов с разнообразными углеводными остатками. Полученные данные первичного скрининга активности синтезированных соединений позволили провести корреляцию «структура-активность» в ряду рибозидов и синтезировать новые, более эффективные агонисты аденозиновых A₁ рецепторов, перспективных для дальнейших медико-биологических испытаний.

Проведенный комплекс исследований структуры полученных нуклеозидов очевидно доказал возможность применения методов двумерной гетероядерной спектроскопии ЯМР для расшифровки аномалий в структуре нуклеозидов, связанных с образованием внутримолекулярных водородных связей.

Результаты, описанные в настоящей диссертации, получены лично автором или при его непосредственном участии. Личный вклад автора в представленной работе заключался в непосредственном участии в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертации. Автор разрабатывал методы синтеза новых аналогов аденозина и методы внесения модификаций, проводил химический и ферментативный синтез, получал вещества в количествах, необходимых для изучения их физико-химических характеристик и биологических исследований, анализировал полученные данные: интерпретировал данные масс-спектров и одномерных и двумерных спектров ЯМР. Также автор участвовал в написании и подготовке к публикации статей и тезисов докладов на научных конференциях по результатам исследования.

Берзина М.Я. является соавтором патента РФ № RU 2563257 C1 от 20.09.2015. Бюл. №26. Константинова И.Д., Елецкая Б.З., Дорофеева Е.В., Фатеев И.В., Берзина М.Я., Лутонина О.И., Мирошников А.И. *Способ получения 9-(бета-D-арабинофуранозил)-6-(N^α-L-сериламидо)-2-хлорпурина* и главы *A convenient approach to the biosynthesis of C2,C6-disubstituted purine nucleosides using E. coli purine nucleoside phosphorylase and arsenolysis* в книге Applied Biocatalysis: The Chemist's Enzyme Toolkit, Fourth Edition, 2020, Publisher

Wiley-VCH, pages 211-214; Konstantinova I.D., Kayushin A.L., Arnautova A.O., Antonov K.V., Yeletskaia B.Z., Berzina M.Ya., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Fateev I.V., Esipov R.S., Miroshnikov A.I.

По теме диссертации опубликованы следующие статьи:

- 1) Berzina M. Ya., Eletskaia B.Z., Kayushin A.L., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Fateev I.V., Zhavoronkova O.N., Bashorin A.R., Arnautova A.O., Smirnova O.S., Antonov K.V., Paramonov A.S., Dubinnyi M.A., Esipov R.S., Miroshnikov A.I., Konstantinova, I.D. *Intramolecular Hydrogen Bonding in N⁶-Substituted 2-Chloroadenosines: Evidence from NMR Spectroscopy* //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 11. – P. 9697. DOI: 10.3390/ijms24119697 **IFwos 6.208 (Q1)**
- 2) Berzina M.Ya., Eletskaia B.Z., Kayushin A.L., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Fateev I.V., Paramonov A.S., Kostromina M.A., Zayats E.A., Abramchik Yu.A., Maltsev D.V., Naumenko L.V., Taran A.S., Yakovlev D.S., Spasov A.A., Miroshnikov A.I., Esipov R.S., Konstantinova I.D. *Synthesis of 2-chloropurine ribosides with chiral amino acid amides at C6 and their evaluation as A₁ adenosine receptor agonists* //Bioorganic Chemistry. – 2022. – V. 126. – P. 105878. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.105878 **IFwos 5.275 (Q1)**
- 3) Fateev, I.V.; Kostromina, M.A.; Abramchik, Y.A.; Eletskaia, B.Z.; Mikheeva, O.O.; Lukoshin, D.D.; Zayats, E.A.; Berzina, M.Ya.; Dorofeeva, E.V.; Paramonov, A.S.; Kayushin, A.L.; Konstantinova, I.D.; Esipov, R.S. *Multi-enzymatic cascades in the synthesis of modified nucleosides: Comparison of the thermophilic and mesophilic pathways* //Biomolecules. – 2021. – V. 11. – №. 4. – P. 586. DOI: 10.3390/biom11040586 **IFwos 4.879 (Q2)**.
- 4) Kharitonova M.I., Antonov K.V., Fateev I.V., Berzina M.Ya., Kaushin A.L., Paramonov A.S., Kotovskaya S.K., Andronova V.L., Konstantinova I.D., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. *Chemoenzymatic Synthesis of Modified 2'-Deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl Benzimidazoles and Evaluation of Their Activity Against Herpes Simplex Virus Type 1.* // Synthesis. – 2017. – V. 49. – № 05. – P. 1043. DOI: 10.1055/s-0036-1588625 **IFwos 3.157 (Q2)**

Апробация работы была проведена на 9 международных и российских конференциях.

1. Берзина М.Я., Елецкая Б.З. “Синтез и свойства новых нуклеозидов, модифицированных по 2 и 6 положениям пуринового основания”. // Материалы XXIX Зимней молодежной научной школы «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ

НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ». Москва, 7–10 февраля 2017 г.

2. Юфряков В.С., Берзина М.Я. “Синтез и изучение свойств новых 2,6-дизамещенных пуриновых нуклеозидов”. // Материалы XXX Зимней молодежной научной школы "ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ". Москва, 12–15 февраля 2018 г.
3. Берзина М.Я., Елецкая Б.З., Юфряков В.С. «ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И СВОЙСТВА 2-ХЛОРПУРИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ РИБО-, 2'-ДЕЗОКСИРИБО И АРАБИНО-РЯДОВ». // Материалы XX Научной молодежной конференции «Проблемы и достижения современной химии». Одесса, 27–28 сентября 2018 г.
4. Берзина М.Я., Елецкая Б.З. «НОВЫЕ ПУРИНОВЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ: ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ПОДХОД». // Материалы VIII Молодежной конференции ИОХ РАН. Москва, 22–23 мая 2019 г.
5. Берзина М.Я., Елецкая Б.З., Константинова И.Д., Мирошников А.И., Яковлев Д.С., Султанова К.Т., Агацарская Я.В., Мальцев Д.В., Науменко Л.В., Таран А.В. «НОВЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ 2-ХЛОРАДЕНОЗИНА В КАЧЕСТВЕ АГОНИСТОВ АДЕНОЗИНОВЫХ A1 РЕЦЕПТОРОВ». // Материалы 5-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021». Волгоград, 16–19 мая 2022.
6. Елецкая Б.З., Берзина М.Я., Миронов А.Ф., Жаворонкова О.Н., Гаврилов Л.А., Константинова И.Д., Мелихова Т.Д. «Получение нуклеозид-пептидных конъюгатов методом ферментативной транспептидации для направленной химиотерапии». // Материалы всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика». Новосибирск, 24–28 июля 2022 г.
7. Жаворонкова О.Н., Елецкая Б.З., Гроза Н.В., Берзина М.Я. «СИНТЕЗ НОВЫХ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ – АНАЛОГОВ АГОНИСТОВ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ». // Материалы XXXV Зимней молодежной научной школы "ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ". Москва, 7–10 февраля 2023 г.
8. Maria Ya. Berzina, Alexey L. Kayushin, Elena V. Dorofeeva, Olga I. Lutonina, Irina D. Konstantinova. «NEW ADENOSINE ANALOGS: CHEMICAL-ENZYMATIC

SYNTHESIS». // Abstracts ICPS 2023. Conference: Actual problems of the Chemistry of Natural Compounds. Tashkent, March 15–16, 2023

9. Olga N. Zhavoronkova, Maria Ya. Berzina, Irina D. Konstantinova. «SYNTHESIS OF NEW PURINE NUCLEOSIDES – ANALOGUES OF ADENOSINE RECEPTIJI AGONISTS». // Abstracts ICPS 2023. Conference: Actual problems of the Chemistry of Natural Compounds. Tashkent, March 15–16, 2023

1. Обзор литературы

Вследствие наличия у аденозина множества различных функций в организме аналоги аденозина обладают широким спектром биологической активности. Тем более интересным становится поиск новых структурных аналогов и исследование их влияния на клеточные и межклеточные процессы.

В клинике широко используются аналоги аденозина и гуанозина с различными сайтами модификации (пуриновое основание, углеводный остаток) (Рисунок 2):

- Видарабин (Vidarabine, 9-β-D-арабинофуранозиладенин), терапия заболеваний, вызываемых вирусом *Herpes simplex* типов 1 и 2, в том числе кератита, кератоконъюнктивита, рецидивирующего генитального герпеса, энцефалита;
- Кладрибин (Cladribine, 2-хлор-2'-дезоксаденозин), терапия волосатоклетчатого лейкоза и рассеянного склероза;
- Неларабин (Nelarabine, 2-амино-9-β-D-арабинофуранозил-6-метоксипурин), лечение острого лимфобластного лейкоза и Т-клеточной лимфобластной лимфомы;
- Флудара (Fludarabine, 5'-фосфат 9-β-D-арабинофуранозил-2-фторпурин-6-амин), терапия В-клеточного хронического лимфолейкоза, неходжкинских лимфом низкой степени злокачественности;
- Клофарабин (Clofarabine, 2-хлор-6-амино-9-β-D-(2'-дезоксидеокси,2'-фторарабинофуранозил)пурин), терапия острого лимфобластного лейкоза;
- Ацикловир (Acyclovir, аналог дезоксигуанозина, содержащий вместо углеводного остатка ациклическую цепь), противовирусный препарат, эффективный против вирусов простого герпеса, ветряной оспы, опоясывающего герпеса (лишай) или цитомегаловируса;
- Валцикловир (Valaciclovir, сложный валиновый эфир ацикловира), противовирусный препарат – пролекарство ацикловира.

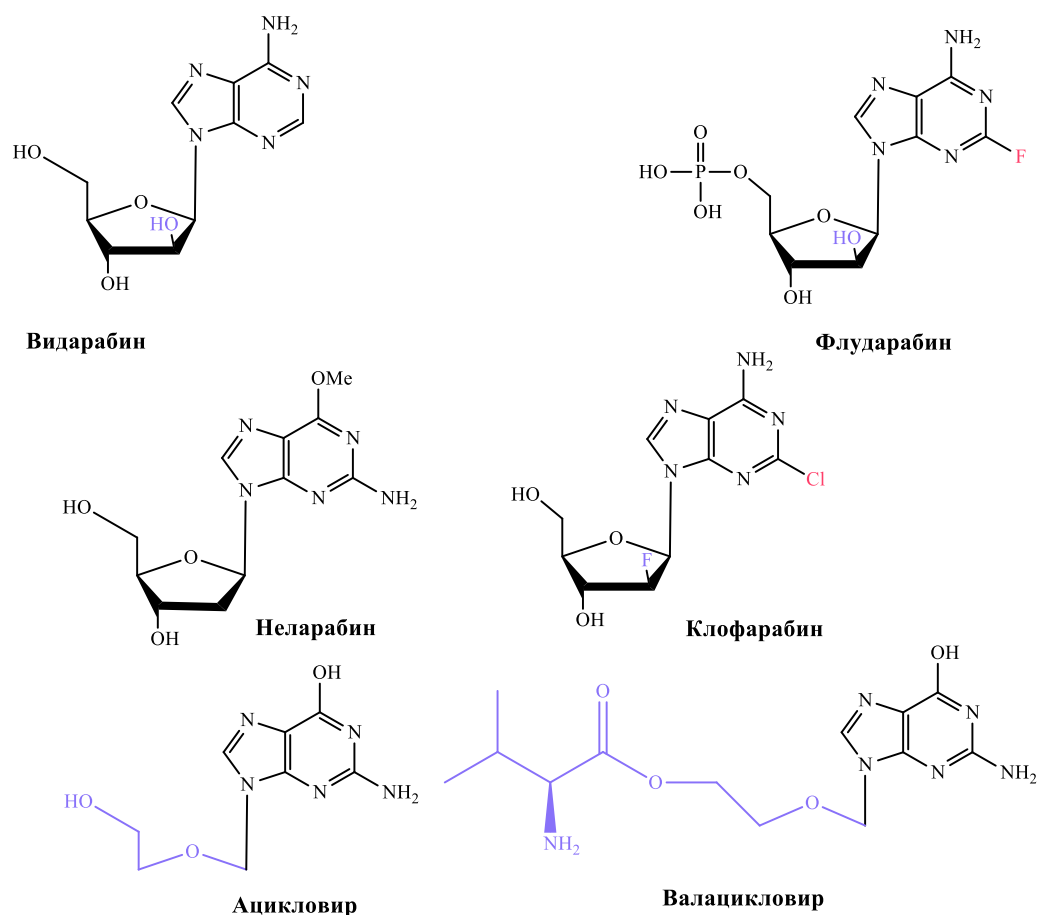


Рисунок 2 – Модифицированные нуклеозиды в клинической практике

Среди производных аденозина не найдено активных соединений, обладающих избирательным действием на опухолевые клетки или вирусы. Флудара, неларабин, клофарабин и видарабин относятся к арабинофуранозидам. Кладрибин – производное 2-дезоксирибозы. Известен нуклеозид – 2-хлораденозин, обладающий цитотоксичностью по отношению к клеткам рака предстательной железы РС3, однако индекс селективности у этого соединения значительно ниже индекса селективности кладрибина [5-7].

В современных исследованиях для синтеза новых аналогов аденозина применяются два подхода. Первый – это модификации пуринового гетероциклического основания и углеводного остатка методами классического органического синтеза и биоорганической химии [8, 9]. Однако прямой химический синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов затруднен вследствие сложностей работы с углеводным остатком: лабильность гликозидной связи, высокая вероятность образования побочных продуктов на этапе синтеза, наличие стереоизомеров и сложность выделения и очистки продуктов [10]. Второй подход – это образование гликозидной связи между агликоном и углеводным остатком ферментативным гликозилированием с использованием пуриннуклеозидфосфорилазы [11-13]. Введение ферментативной стадии трансгликозилирования в общий план синтеза

позволяет обойти эти ограничения и получить желаемые нуклеозиды 2-дезоксирибозы высокой степени чистоты, с отличным выходом и небольшими затратами. Комбинируя оба этих подхода, можно получать библиотеки новых аналогов аденозина.

Химико-ферментативный подход к синтезу новых модифицированных нуклеозидов получил широкое распространение. В частности, ведется поиск структурных аналогов кладрибина, обладающих потенциальной биологической активностью и меньшей системной токсичностью [14].

1.1. Противоопухолевые аналоги аденозина

Одно из основных направлений применения пуриновых нуклеозидов в клинической практике – эффективные противоопухолевые препараты. Кладрибин, флударабин и клофарабин, которые используются в терапии онкогематологических заболеваний, были получены при введении атома галогена в С2 положение аденозина (Рисунок 2) [15-17]. Несмотря на то, что соединения класса галогензамещенных адениновых нуклеозидов обладают структурным сходством (Рисунок 2) и механизмы их действия во многом сходны, тонкие количественные и качественные различия в метаболизме этих соединений и их взаимодействиях с ферментами-мишенями могут иметь глубокое влияние на их противоопухолевую активность [18].

Возможно, лучшим примером этого факта является одобренный FDA в 2004 году препарат клофарабин, который отличается от кладрибина всего одним атомом фтора во втором положении углеводного остатка. Он продемонстрировал превосходную эффективность при лечении рецидивирующего и рефрактерного острого лимфобластного лейкоза у детей, в то время как кладрибин не эффективен против этого заболевания. Биохимическое действие клофарабина отличается от действия кладрибина, что определяет его уникальную клиническую активность. Этот и другие примеры [18] служат примером того, как небольшие структурные модификации аналогов нуклеозидов могут оказывать сильное влияние на химическую стабильность и биологическую активность.

Для понимания механизма действия галогензамещенных адениновых нуклеозидов необходимо знать процессы метаболизма пуриновых нуклеозидов в биологической системе. Ключевыми ферментами в метаболизме пуриновых нуклеозидов являются аденозиндезаминаза (ADA), дезоксицитидинкиназа (dCK) и 5'-нуклеотидаза (5'-NT) (Схема 1). ADA необратимо дезаминирует аденозин, заменяя аминогруппу в С6 положении гетероцикла на кето-группу и таким образом превращая аденозин в инозин. Фермент dCK участвует в принципиальной стадии метаболизма 2'-дезоксинуклеозидов – фосфорилировании их до 2'-дезоксинуклеозид-монофосфатов, а 5'-NT выполняет

обратную функцию, дефосфорилируя их до нуклеозидов (Схема 1). Обычно в клетках соблюдается равновесие реакций, катализируемых перечисленными ферментами. Исключением являются лимфоциты, где активность dCK выше, чем активность 5'-NT [19-21].

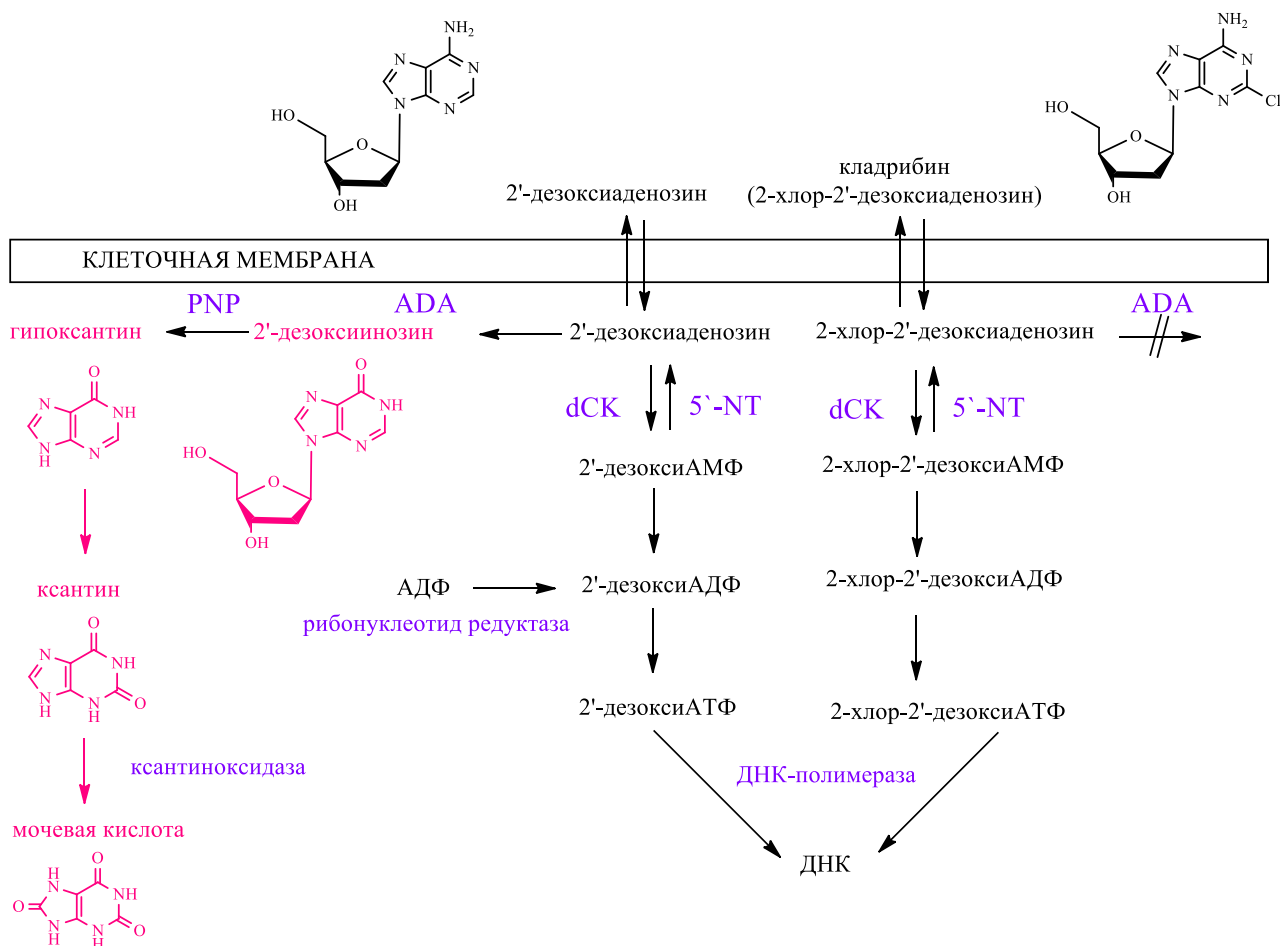


Схема 1 – Схема метаболизма 2'-дезоксиаденозина и кладрибина

В клетках человека находятся все ферменты, необходимые для синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*. Однако эти ферменты не участвуют в активации пуриновых антиметаболитов и представляют собой лишь вторичные мишени, которые ответственны за противоопухолевую активность этих соединений. Клетки человека экспрессируют множество ферментов, которые могут использовать пурины в качестве субстратов, и именно эти ферменты наиболее важны для анаболизма и катаболизма пуриновых антиметаболитов, используемых при лечении онкологических заболеваний. Ферменты катаболизма особенно важны, потому что они часто отвечают за вывод токсичных аналогов нуклеозидов, и эти ферменты экспрессируются во всем организме. Ксантиноксидаза – ключевой фермент в путях деградации пуринов. Аденозиндезаминаза ADA и пурииннуклеозидфосфорилаза PNP являются двумя важными ферментами в

инактивации аналогов пуриновых нуклеозидов, а также мишенями двух терапевтических агентов – пентостатина и флордезина [18].

Кроме того, в последнее время активно ведутся разработки новых противоопухолевых препаратов на основе агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов. Эта область применения будет отдельно рассмотрена в соответствующем разделе 1.2 «Агонисты и антагонисты аденозиновых рецепторов».

1.1.1. Кладрибин

Кладрибин – аналог 2'-дезоксаденозина, содержащий атом хлора во втором положении пуринового гетероцикла. Он был одобрен FDA в 1992 г. для лечения волосатоклеточного лейкоза и В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, а в 2019 году в таблетированной форме – для лечения рассеянного склероза.

Избирательное действие кладрибина на лимфоциты обусловлено следующим механизмом. В норме в лимфоцитах аденозиндезаминаза способствует утилизации 2'-дезоксаденозина, метаболизируя его до инозина, который затем превращается в выводимую из клетки мочевую кислоту. Однако при наследственной недостаточности аденозиндезаминазы 2'-дезоксаденозин начинает фосфорилироваться до 2'-дезоксирибонуклеотидов. Эти токсичные для клеток соединения накапливаются, что приводит к возникновению лимфопении, в том числе у новорожденных [22]. Хотя при такой патологии фермент отсутствует во всех тканях, это сказывается в основном на росте и развитии лимфоидной системы [23].

Известно, что атом хлора в С2 положении пурина ингибирует действие внутриклеточной аденозиндезаминазы (ADA) [24], которая участвует в метаболизме пуринов, что продлевает время жизни соединения в клетке и позволяет ему проявить биологическую активность.

Основываясь на этих данных, для терапии онкологических лимфобластных заболеваний были синтезированы аналоги пуриновых нуклеозидов, в том числе кладрибин, устойчивые к действию ADA и обладающие селективной активностью в отношении лимфоцитов. Селективность действия этих веществ определяется соотношением в клетке фосфорилирующего и дефосфорилирующего ферментов: дезоксицитидинкиназы dCK и 5'-нуклеотидазы 5'-NT, соответственно. Поскольку в лимфоцитах активность dCK больше, чем 5'-NT, кладрибин присутствует в виде монофосфата, который затем фосфорилируется до трифосфата. В клетках других тканей соотношение этих ферментов смещено в другую сторону, и кладрибин присутствует в

виде неактивной формы нуклеозида. Этим обусловлено его селективное действие на лимфоциты [25].

Цитотоксические эффекты активного метаболита кладрибина, 5'-трифосфат-2-хлор-2'-дезоксиаденозина, обусловлены его способностью ингибировать синтез и репарацию ДНК в делящихся и неделящихся лимфоцитах. Трифосфат кладрибина служит хорошим субстратом для ДНК-полимераз и встраивается в растущую цепь ДНК [26]. ДНК-полимераза α удлиняет цепь ДНК после включения одного остатка кладрибина и останавливается после того, как включит в цепь три последовательных остатка [26]. Поскольку включение трех последовательных остатков дезоксиаденозина является вероятным событием репликации генома, кладрибин может вызывать обрыв цепи.

Кроме того, кладрибин ингибирует рибонуклеотидредуктазу, которая катализирует реакцию образования дезоксинуклеозидтрифосфатов. Это снижает их концентрацию и затрудняет синтез ДНК [27]. Механизм ингибирования рибонуклеотидредуктазы человека флударабином и кладрибином основан на том, что они вызывают образование дефектного гексамера α_6 рибонуклеотидредуктазы [28]. Также фосфат кладрибина ингибирует ДНК-полимеразу и активирует специфическую эндонуклеазу, что вызывает одноцепочечные разрывы ДНК и в конечном итоге приводит к гибели клетки. В итоге накопление трифосфата кладрибина приводит к нарушению клеточного метаболизма лимфоцитов, ингибированию синтеза ДНК, активации фактора транскрипции p53 и дальнейшему апоптозу [29, 30].

При использовании в терапевтических дозах кладрибин вызывает быстрое и стойкое снижение числа CD4+ и CD8+ клеток, при этом оказывая менее выраженное действие на CD19+ В клетки, и не влияет существенно на другие клетки крови, клетки иммунной системы и других тканей организма [21]. Именно эти клетки играют основную роль в патогенезе рассеянного склероза, и поэтому стало возможным применение кладрибина при лечении рассеянного склероза.

1.1.1.1. Применение кладрибина в терапии рассеянного склероза

Активные лимфоциты у людей с рассеянным склерозом атакуют миелиновую оболочку нервной системы, повреждая белое вещество головного и спинного мозга. Недавно был проведен анализ восстановления популяции иммунных клеток у пациентов, участвовавших в исследовании CLARITY (CLAdRIbine Tablets treating multiple sclerosis orally). Было выявлено увеличение количества неактивированных В-лимфоцитов и макрофагов M2 и уменьшение В- и Т-клеток памяти во время репопуляции через 2 года

после начала лечения [31]. Таким образом, лечение вызывает устойчивую иммуномодуляцию, не затрагивая врожденные иммунные механизмы.

Мавенклад – торговое название кладрибина, доступного в форме таблеток. Более чем у 75% больных количество лимфоцитов возвращается к норме в течение 90 недель после приема последней дозы Мавенклада. Кладрибин уменьшает количество CD19+ В-клеток быстрее, чем Т-клеток. Однако В-клетки восстанавливаются быстрее и достигают уровней, близких к исходному, в среднем через 12 месяцев. Среднее количество НК-клеток несколько снижается, оставаясь в пределах нормы [31].

Применение кладрибина при лечении рассеянного склероза рецидивирующего (ремиттирующего) течения обуславливает продолжительный противовоспалительный эффект, нарушая иммунопатологические механизмы, которые в противном случае поддерживают текущую и рецидивирующую активность воспалительного заболевания при рассеянном склерозе. Мавенклад способен снизить выраженность воспалительных изменений в тканях нервной системы, что является ключевым аспектом борьбы с данной патологией. Кроме того, при использовании кладрибина наблюдается снижение числа рецидивов заболевания, а также снижение активности воспалительных процессов в мозговой ткани. Это позволяет замедлить прогрессирование инвалидизации у пациентов с рассеянным склерозом.

Гибель активных лимфоцитов сводит на нет проявление основных симптомов рассеянного склероза. Со временем пул лимфоцитов восстанавливается, однако новые незрелые лимфоциты не запрограммированы повреждать белое вещество. За время одного курса терапии происходит атака на активные лимфоциты и запуск их запрограммированной клеточной гибели. Для достижения длительного устойчивого эффекта в среднем необходимо два года. Курс лечения предусматривает прием таблеток в течение двух лет, однако этот прием не постоянный. Вместо этого он разделен на два небольших курса продолжительностью по пять дней в год. Такой режим лечения обеспечивает гибкость и удобство для пациентов, при этом сохраняя эффективность лекарственной терапии.

Препарат Мавенклад был одобрен в Европе в 2017 году, в США в марте 2019 года. 10 марта 2020 года препарат был одобрен в России и сейчас входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) [32]. Таким образом, кладрибин нашел применение в терапии волосатоклетчатого лейкоза и рассеянного склероза.

1.1.2. Флударабин

Флударабин одобрен FDA в 2008 году для лечения различных лейкозов и лимфом, включая хронический и острый лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз и неходжкинскую лимфому [33]. Флударабин – это структурный аналог аденозина, фторированный по второму положению аденинового основания, со стереохимической инверсией гидроксила в С2' положении рибозного кольца. Из-за плохой растворимости флударабина в клинике используется лекарственная форма Флудара (монофосфат флударабина).

Монофосфат флударабина под действием фосфатаз плазмы крови быстро превращается во флударабин, который становится основной циркулирующей формой препарата. Флударабин является субстратом дезоксицитидинкиназы – основного фермента, ответственного за превращение этого соединения в активный метаболит в форме нуклеотидов уже внутри клетки. Флударабин – хороший субстрат для репликативных ДНК-полимераз. Включение флударабина в синтезирующийся 3'-конец ДНК приводит к ингибированию репликации ДНК. Поскольку флударабин – арабинофуранозид, имеющий 3'-ОН-группу, он не полностью ингибирует наращивание цепи. Однако его действие вызывает немедленное и значительное ингибирование репликации ДНК, и именно это действие ответственно за цитотоксичность флударабина.

Трифосфат флударабина также является слабым ингибитором рибонуклеотидредуктазы [34]. Чтобы гарантировать наличие в клетке всех дезоксинуклеотидов, необходимых для синтеза ДНК, в правильных концентрациях, активность рибонуклеотидредуктазы строго контролируется природными дезоксинуклеозидтрифосфатами. Природный dATP является мощным регулятором активности рибонуклеотидредуктазы и ингибирует восстановление ADP, UDP и CDP [35]. Ингибируя рибонуклеотидредуктазу, трифосфат флударабина вызывает снижение внутриклеточного уровня dATP – природного субстрата, который конкурирует с трифосфатом флударабина за активный сайт ДНК-полимеразы, тем самым усиливая свою активность.

1.1.3. Клофарабин

Клофарабин относится ко второму поколению нуклеозидных препаратов против рака [36]. Рациональность его дизайна заключалась в объединении структурных особенностей кладрибина и флударабина. Подобно кладрибину и флударабину, клофарабин токсичен как для непролиферирующих лимфоцитов человека, так и для

быстро пролиферирующих клеток, при этом он устойчив к фосфоролитическому расщеплению и дезаминированию в кислой среде. Он был одобрен FDA для лечения рецидивирующего острого лимфобластного лейкоза у детей в 2004 г [37, 38] в случаях, когда минимум два других метода лечения не дали положительного результата [39].

Структура клофарабина отличается от структуры кладрибина атомом фтора во 2'-положении. Сравнение этих двух препаратов является лучшим примером того, как небольшие структурные различия могут привести к значительным клиническим различиям. Введение атома фтора в 2'-положение значительно увеличивает стабильность гликозидной связи, что приводит к повышенной стабильности соединения в кислых условиях, в том числе хорошей биодоступности при пероральном приеме [18]. Механизм действия клофарабина подобен механизму действия кладрибина и флударабина. Он фосфорилируется дезоксицитидинкиназой до 5'-трифосфата, который ингибирует репликацию ДНК за счет ингибирования как рибонуклеотидредуктазы, так и ДНК-полимеразы [40, 41]. Эффективность клофарабина в отношении ингибирования рибонуклеотидредуктазы сходна с эффективностью кладрибина. Кроме того, он легко встраивается в цепь ДНК, но по эффекту обрыва цепи близок к флударабину, а не к кладрибину. Клофарабин объединяет свойства кладрибина (активное ингибирование рибонуклеотидредуктазы) и флударабина (активное ингибирование ДНК-полимеразы), которые ответственны за их противоопухолевую активность [36]. Трифосфат клофарабина обладает длительным временем внутриклеточного удержания [42]. Клинические данные свидетельствуют о высокой эффективности клофарабина при гематологических злокачественных новообразованиях, а антиангиогенная активность, показанная *in vitro* [36], свидетельствует о том, что препарат может быть полезен для лечения солидных опухолей. Хотя клофарабин действует как миелосупрессор [43], профиль его токсичности делает его потенциально полезным для пациентов, исключенных из интенсивной химиотерапии при постановке диагноза.

1.1.4. N⁶-замещенные производные аденозина

Продолжаются поиски новых активных противораковых аналогов аденозина. Одно из направлений поиска – введение в N⁶ положение аденозина различных заместителей. В природе такой класс N⁶-замещенных аденозинов представлен в основном цитокинами [44], гормонами растений, которые стимулируют деление клеток (цитокинез, отсюда название класса соединений). По структуре заместителя N⁶ в аденозине природные цитокинины можно разделить на изопреноидные и ароматические (Рисунок 3). Однако действие цитокининов не ограничивается растительными клетками. В клетках животных

цитокинины способны активировать аденозиновые рецепторы и модулировать биохимические процессы. N⁶-Изопрениладенозин, один из классических представителей цитокининов, входит в состав тРНК животных [45]. Механизмы биологического действия N⁶-замещенных аденозинов у растений и животных во многом различаются [44].

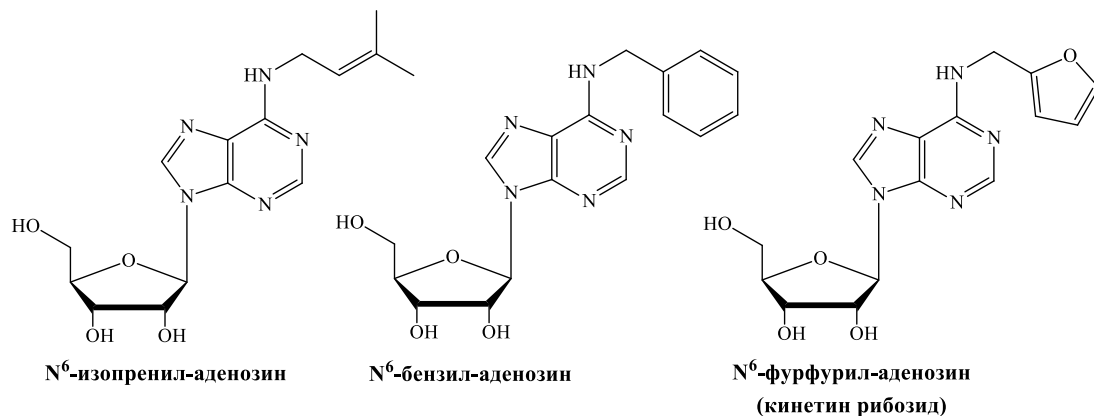


Рисунок 3 – Природные цитокинины пуриновой природы

Было обнаружено, что цитокинины ингибируют клеточную пролиферацию в различных клеточных линиях [46, 47]. Терапевтический потенциал этих нуклеозидов как противоопухолевых препаратов впервые был продемонстрирован в ограниченных клинических испытаниях [48]. Было показано, что цитокинины проявляют антипролиферативную активность в отношении гематологических и солидных опухолей в низком микромолярном диапазоне [49]. Так, N⁶-изопрениладенозин способен индуцировать апоптоз опухолевых клеток [50-52]. При введении в положение N⁶ аденинового основания коротких заместителей (аллил, изопропил, пропаргил) полученные вещества увеличивали продолжительность жизни мышей, больных карциномой молочных желез [50]. Аналоги аденозина с короткими заместителями по положению N⁶ оказались более активны при терапии карцином животных, чем в системах опухолевых клеток лейкемии или саркомы [53].

Точный противоопухолевый механизм действия N⁶-изопрениладенозина и его аналогов до сих пор является предметом изучения. Отличительной чертой активности кинетинов со структурно разнообразными N⁶-боковыми цепями, наблюдаемой первоначально в клеточных линиях лейкемии, является заметное уменьшение содержания АТФ в клетке [47]. В этих клеточных линиях происходит быстрый апоптоз по внутреннему пути. Другая характерная особенность клеток – накопление кинетин-5'-монофосфатов, тогда как высшие фосфаты присутствуют только в следовых количествах [54]. Эти наблюдения позволяют предположить, что кинетины действуют по другому механизму [55], чем известные противоопухолевые нуклеозиды, такие как флударабин

или кладрибин, которые после преобразования в 5'-трифосфаты непосредственно препятствуют синтезу нуклеиновых кислот. Известно, что апоптотические эффекты N⁶-изопрениладенозина в солидных опухолевых клетках сопровождаются фосфорилированием и активацией каспаз [56], которые участвуют в рецептор-зависимом пути апоптоза. N⁶-Изопрениладенозин способен образовывать комплексы с ДНК [51] и активировать гены, участвующие в негативной регуляции хода клеточного цикла [57]. Фосфорилирование N⁶-изопрениладенозина в цитозоле может быть косвенным свидетельством регуляции транскрипции [52].

Природа боковой цепи в положении N⁶ аденозина важна для биологических эффектов. Насыщенные аналоги N⁶-изопрениладенозина проявляли меньшую биологическую активность [57].

Также в качестве заместителей по С6 положению пуринового гетероцикла аденозина используются аминокислоты. Природная аденилянтарная кислота (Рисунок 4) представляет собой алкилированный аналог аденозина (Рисунок 4, А). Кроме того, ее можно рассматривать как пуриновый нуклеотид, где заместителем по С6 положению служит природная протеиногенная оптически активная *L*-аспарагиновая кислота (Рисунок 4, В). Аденилянтарная кислота участвует в пуриновом нуклеотидном цикле, необходимом для регулирования уровня аденозиновых нуклеотидов в клетке [58, 59]. Установление структуры аденилянтарной кислоты подтолкнуло исследователей к синтезу серии пуриновых оснований, замещенных по С6 остатками хиральных аминокислот [60-64].

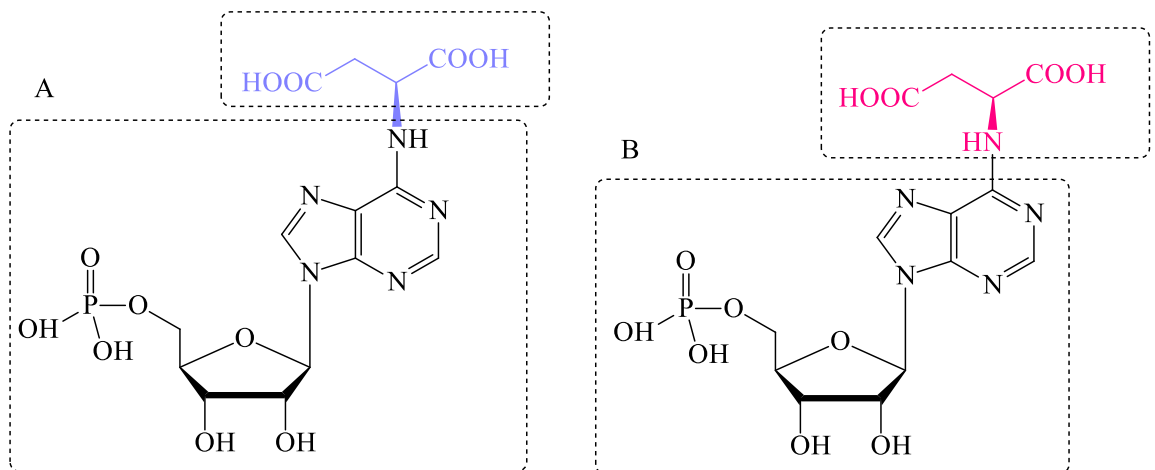


Рисунок 4 – Аденилянтарная кислота как производное аденозина (АМФ) (А) и пуринового рибонуклеотида (В)

Были синтезированы соединения как со свободными аминокислотами [65, 66], так и их метиловыми эфирами [65, 67]. Соединения со свободными аминокислотами обладают антимикробактериальной активностью, но при этом не проявляют противоопухолевую активность [61, 62].

Недавно были синтезированы рибозиды 2-Н [68] и 2-триазолилзамещенных [69] пуринов с аминокислотами в С6-положении, но данные по их биологической активности в работах отсутствуют. Также были синтезированы производные этих оснований, содержащие вместо рибозы бензильный [68] и пропильный [70] остатки.

Также продолжается поиск противоопухолевых препаратов среди производных кладрибина. Проводились исследования противоопухолевой активности 2-Cl-N⁶-замещенных аналогов аденозина на линиях человеческих эпителиальных раковых клеток (печени Huh7, толстого кишечника HCT116, молочных желез MCF7). Аналог 2-хлораденозина с N⁶-(4-трифторометилфенил)пиперазиновым заместителем (Рисунок 5) проявил многообещающую цитостатическую активность. На перечисленных типах клеточных линий это соединение было более токсично, чем флударабин, но по эффективности уступало кладрибину [71].

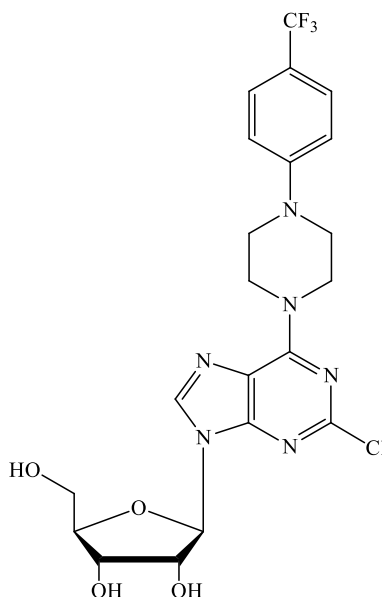


Рисунок 5 – Структура 2-хлор-N⁶-(4-трифторометилфенил)пиперазин-аденозина

В качестве перорально биодоступного и хорошо переносимого противоопухолевого средства у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой оценивается намоденосон (2-хлор-N⁶-(3-иодобензил)-аденозин-5'-N-метил-уранамид), проходящий сейчас клинические испытания I и II фазы [14]. Более подробно о механизме его действия будет рассказано в Разделе 1.2 «Агонисты и антагонисты аденозиновых рецепторов».

1.1.5. Аналоги аденозина как иммуноонкологические препараты

Опухолевые клетки способны ускользать от иммунного ответа организма, активируя различные так называемые иммунные контрольные точки, которые контролируют выраженность и длительность иммунного ответа. Ингибиторы иммунных контрольных

точек (Immune checkpoint inhibitors, ICI) на основе моноклональных антител изменили представление о терапии онкологических заболеваний. С 2011 года FDA одобрила шесть препаратов ICI для терапии опухолей различных типов. Среди ICI наиболее распространены антитела, блокирующие сигнальные пути цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного протеина 4 (CTLA-4), рецептора запрограммированной клеточной гибели-1 (PD-1) и лиганда рецептора запрограммированной клеточной гибели (PD-L1) [72].

Однако ингибирование иммунных контрольных точек может привести к нарушению регуляции иммунных ответов и спровоцировать появление нового типа нежелательных реакций, связанных с изменением активности иммунокомпетентных клеток организма. Несмотря на то, что глубокий и стойкий ответ пациентов на терапию ICI вызвал большой энтузиазм, большинство больных по-прежнему не реагируют на монотерапию ICI вследствие либо первичной, либо вторичной резистентности. Широкое применение иммуно-онкологической терапии при помощи ICI затруднено из-за низкой частоты ответа и возникновения связанных с иммунной системой побочных эффектов у некоторых пациентов [73]. Для преодоления этой проблемы в настоящее время изучаются комбинированные варианты терапии [74].

В последние пять лет в фокус исследований в области противоопухолевой терапии попала разработка низкомолекулярных иммуноонкологических препаратов – ингибиторов ключевых ферментов, способных обойти ограничения моноклональных антител [75]. Для их разработки особое внимание уделяется изучению микроокружения опухоли. Как только размер опухоли выходит за пределы небольшого скопления клеток, ее устойчивый рост требует образования поддерживающей опухоль микросреды, способствующей ангиогенезу, воспалению и ремоделированию ткани. Кроме того, растущая потребность в энергии прогрессирующих опухолей требует, чтобы раковые клетки перепрограммировали свои метаболические пути, что приводит к заметным изменениям концентрации питательных веществ и метаболитов. Этот процесс дополнительно формирует микроокружение опухоли.

Внеклеточный аденозин, присутствующий в высоких концентрациях в микроокружении опухоли, действует как локальный иммуносупрессор, подавляя иммунную функцию посредством ингибирования активации Т-клеток и НК-клеток (Рисунок 6). Было показано, что аденозин накапливается в микроокружении опухолей и оказывает сильное иммунодепрессивное действие на различные инфильтрирующие опухоль лейкоциты через аденозиновые рецепторы типов A_{2A} и A_{2B} . Хотя $A_{2A}AR$ является

основным рецептором, экспрессируемым лимфоидными клетками, инфильтрирующие опухоль миелоидные клетки экспрессируют как $A_{2A}AR$, так и $A_{2B}AR$ [76].

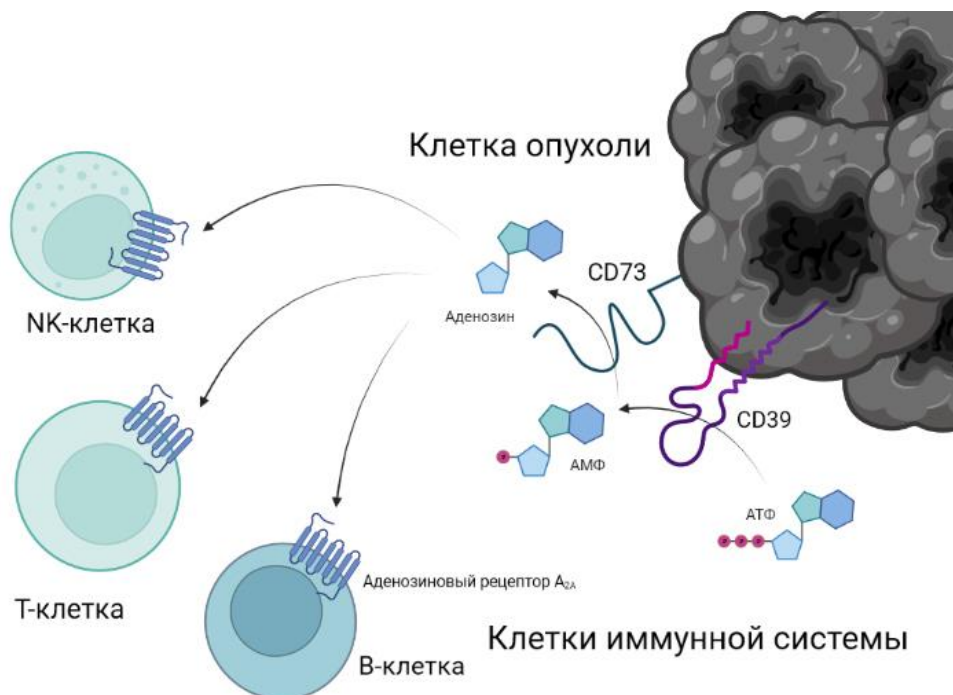


Рисунок 6 – Механизм образования аденозина в микроокружении опухоли. Изображение создано с помощью BioRender.com

Внутриопухолевое образование аденозина в межклеточном пространстве зависит от последовательного катаболизма АТФ двумя эктонуклеотидазами, эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазой-1 CD39 (АТФ → АМФ) и экто-5'-нуклеотидазой CD73 (АМФ → аденозин) (Рисунок 6) [77], причем CD73 оверэкспрессирована в различных типах рака, а ее высокая экспрессия связана с плохим клиническим прогнозом [78]. Ингибирование CD73 устраняет основной путь продукции аденозина в микроокружении опухоли и может обратить вспять опосредованное межклеточным аденозином подавление иммунитета [79-81]. В настоящее время активно разрабатываются ингибиторы CD73 аденозиновой природы.

На основе 5'-(α,β -метилен)дифосфата аденозина (АМPCP) было создано соединение под названием кемликластат (Quemliclustat, AV680, Arcus Biosciences), которое с 2018 года проходит первую фазу клинических испытаний для оценки безопасности и переносимости комбинированной терапии у пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта [82-84] (Рисунок 7). Еще один аналог АМPCP OP5244 (ORIC Pharmaceuticals) оказался сильнодействующим и перорально биодоступным ингибитором CD73. В доклинических исследованиях он полностью ингибировал продукцию аденозина как в раковых клетках человека, так и в CD8⁺ T-

клетках. Он значительно снижал соотношение аденозин/АМФ и обращал вспять иммуносупрессию на мышинных моделях, что указывает на его потенциал в качестве соединения для дальнейшей разработки [85].

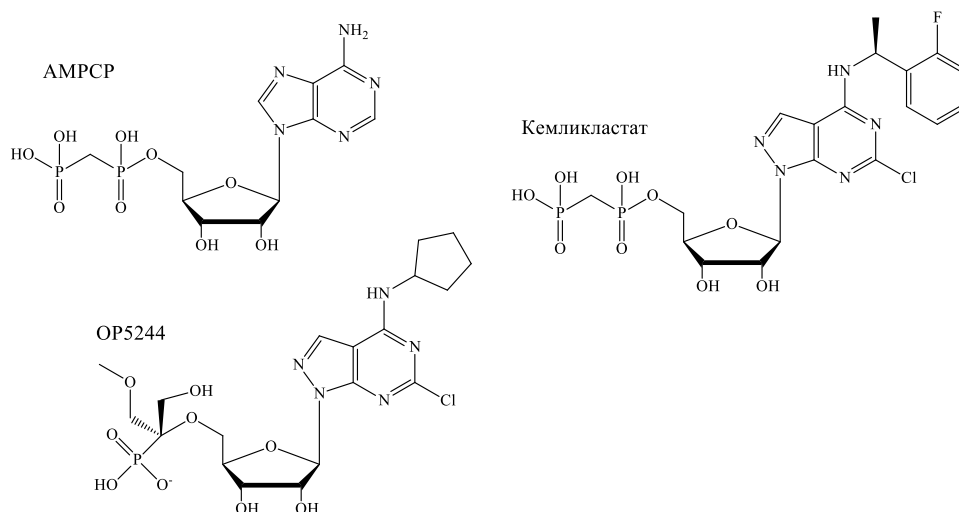


Рисунок 7 – Структуры ингибиторов CD73

Взаимодополняющая комбинация моноклональных антител с различными низкомолекулярными агонистами или ингибиторами в настоящее время проходит клинические испытания для улучшения результатов лечения и предотвращения рецидива опухоли [86].

Хотя сложность и гибкость синтеза аденозина и его влияния на процессы в микроокружении опухоли вызывают множество непредсказуемых сложностей, можно надеяться, что учитывая большое количество доступных соединений для разработки, при выборе правильных целевых комбинаций будет достигнут клинический успех [75].

1.2. Агонисты и антагонисты аденозиновых рецепторов

Аденозин – это межклеточная сигнальная молекула, связывающаяся с несколькими типами аденозиновых рецепторов. Внеклеточный аденозин действует как локальный модулятор, выполняющий в организме цитопротекторную функцию [87]. Внеклеточная концентрация свободного аденозина возле здоровых клеток составляет примерно 300 нМ. Но при реакции на повреждение клетки в результате воспаления в ткани или ишемии локальная концентрация внеклеточного аденозина быстро возрастает до 600-1200 нМ. Воздействие аденозиновых рецепторов на процессы защиты и восстановления тканей делится на четыре категории: увеличение подачи кислорода; защита от ишемического повреждения; запуск противовоспалительных реакций; стимулирование ангиогенеза [88]. В ответ на повреждение клеток попадающий в межклеточное пространство аденозин

опосредует цитопротекторное действие, направленное на защиту тканей от дальнейшего повреждения в случаях гипоксии, ишемии или судорог.

1.2.1. Роль аденозиновых рецепторов в организме

Существует четыре известных подтипа аденозиновых рецепторов (AR): A_1 , A_{2A} , A_{2B} и A_3 – каждый из которых имеет свой фармакологический профиль и распределение в тканях. Все четыре подтипа аденозиновых рецепторов являются членами суперсемейства рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR). Рецепторы A_1 и A_3 сопряжены с альфа-субъединицей белка G_i , а A_{2A} и A_{2B} – с альфа-субъединицей белка G_s .

Классификация подтипов аденозиновых рецепторов базируется на их способности стимулировать или ингибировать активность внутриклеточной аденилатциклазы. Рецепторы A_1 и A_3 активируют белок G_i , который снижает активность аденилатциклазы, что приводит к снижению содержания внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что вызывает сокращение гладкой мускулатуры. Рецепторы A_{2A} и A_{2B} активируют белок G_s , увеличивающий активность аденилатциклазы, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации цАМФ, который открывает калиевые каналы и ингибирует потенциалзависимые кальциевые каналы. Это приводит к расслаблению гладкой мускулатуры и расширению артериол [89].

Функции различных типов аденозиновых рецепторов отличаются, хотя могут и накладываться друг на друга [90]. Например, оба типа рецепторов A_1 и A_{2A} локализованы в тканях сердца и регулируют потребление кислорода миокардом и коронарный кровоток. При этом активация рецепторов типа A_{2A} вызывает широкий спектр физиологических ответов по всему организму, которые можно классифицировать как противовоспалительные. Эти два типа рецептора также играют важную роль в тканях мозга [91, 92], регулируя высвобождение других нейротрансмиттеров, таких как дофамин и глутамат. Метилированные производные ксантина кофеин и теofilлин являются неселективными антагонистами аденозиновых рецепторов. Их стимулирующее головной мозг и ускоряющее сердечный ритм действие противоположно эффекту аденозина. Аденозиновые рецепторы типов A_{2A} и A_{2B} способствуют дифференцировке остеобластов [93], что открывает возможность терапевтического применения при дегенеративных заболеваниях костей, возрастных изменениях, а также при лечении травм. Рецепторы A_{2B} и A_3 расположены в основном в периферических тканях и участвуют в процессах воспаления и иммунного ответа.

Рецептор A_3 сверхэкспрессирован в раковых и воспалительных клетках, что делает его потенциальной мишенью для противоопухолевой терапии [94]. Среди агонистов аденозиновых рецепторов A_3 типа обнаружены соединения, обладающие противоопухолевой активностью [95, 96].

1.2.2. Аденозиновые рецепторы как мишени для терапии

Существует множество исследований, показывающих, что аденозиновые рецепторы также могут стать мишенями при терапии различных заболеваний, включая церебральные и сердечные ишемические заболевания, нарушения сна, иммунные и воспалительные нарушения, онкологические заболевания. Эта область исследуется более чем 40 лет, и было обнаружено значительное количество селективных агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов [97, 98]. Благодаря этому стало возможным проводить обширные исследования эффектов блокирования или стимуляции отдельных подтипов аденозиновых рецепторов, что в настоящее время привело к созданию нового поколения более селективных препаратов со различными медицинскими применениями. Достижения в понимании роли различных подтипов аденозиновых рецепторов и разработка селективных и сильнодействующих лигандов приближают возможность терапевтического применения модуляторов аденозиновых рецепторов. В настоящее время актуальна разработка структурных аналогов аденозина, селективных к определенному типу рецепторов.

Поиск агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов проводится не только среди нуклеозидов, но и среди свободных пуриновых оснований с заместителями по С6 положению пурина [99, 100]. 8-Циклопентил-1,3-дипропилксантин (DPCPX, Рисунок 8) является мощным блокатором аденозиновых рецепторов типа A_1 и активно используется в экспериментальных исследованиях [101].

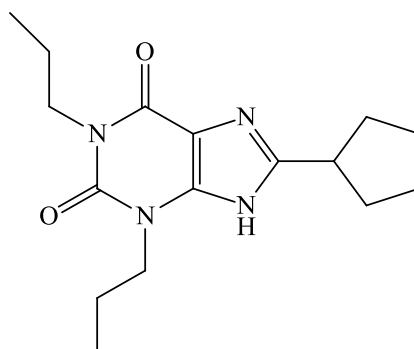


Рисунок 8 – Структура DPCPX, антагониста аденозиновых рецепторов типа A_1

Хлорированные аналоги аденозина проявляют агонистическую активность по отношению к различным типам аденозиновых рецепторов. Например, N^6 -циклопентиладенозин (CPA) и 2-хлор- N^6 -циклопентиладенозин (CCPA) – селективные агонисты аденозиновых рецепторов A_1 типа [102] со значениями K_i связывания 2.25 и 0.83 нМ соответственно [103]. В лабораторной практике CCPA широко применяется для

изучения активации этих рецепторов и их влияния на процессы, идущие в организме [104].

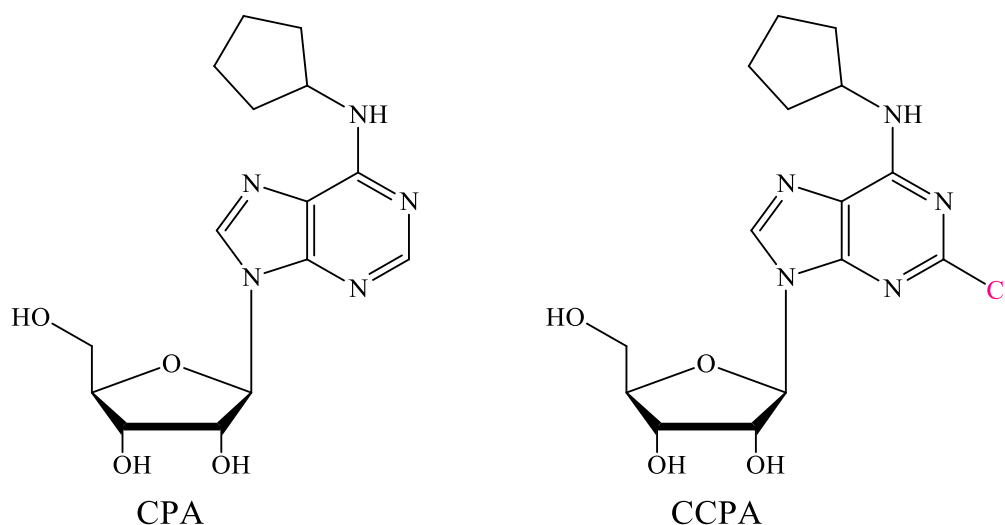


Рисунок 9 – Структура соединений CPA и CCPA, селективных агонистов аденозиновых рецепторов типа A₁

В 2008 году синтетический агонист аденозиновых рецепторов типа A_{2A} регаденозон (Рисунок 1), был одобрен FDA для использования в медицинской практике в качестве коронарного сосудорасширяющего средства, используемого в радионуклидной перфузионной визуализации миокарда [105]. Регаденозон – селективный агонист A_{2A}R, которые активно экспрессированы на гладкомышечных клетках коронарных артерий [106]. Он имеет преимущество перед аденозином, поскольку имеет меньше нежелательных побочных эффектов и пролонгированное действие. Регаденозон используется при эхокардиографии миокарда со стрессом в режиме реального времени для выявления ишемической болезни сердца и во время стресс-тестов с увеличением потребности миокарда в кислороде. Фармакологический стресс-тест выполняют обычно в тех ситуациях, когда пациент не может достаточно долго (до достижения целевой ЧСС) идти по беговой дорожке из-за нарушений сознания, патологии скелета и мышц, ожирения, заболеваний периферических артерий или по другим причинам. Регаденозон можно вводить внутривенно в виде одной болюсной дозы, а не в виде инфузии, как аденозин, во время исследования.

В 2019 году FDA одобрила применение истрадефиллина (istradefylline, торговое название Nourianz, Рисунок 10). Это первый антагонист аденозиновых рецепторов типа A_{2A}, использующийся как клинический препарат. Это производное ксантина в сочетании с леводопой используется для лечения болезни Паркинсона.

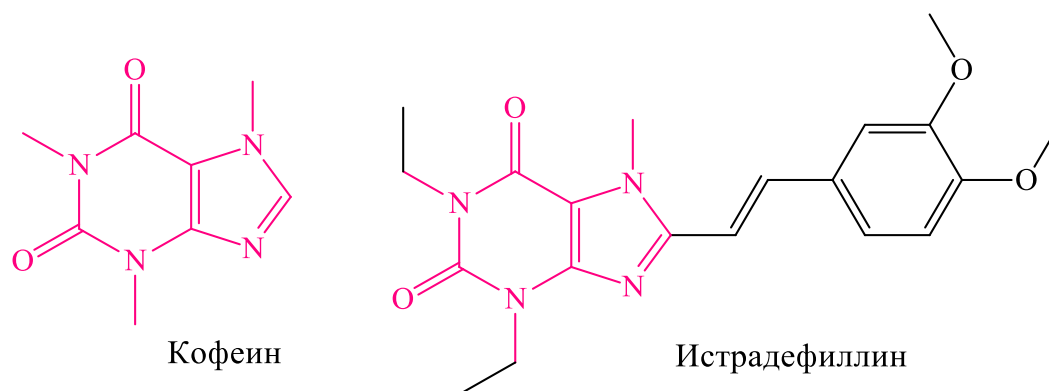


Рисунок 10 – Структуры кофеина и истрадефиллина, антагонистов аденозиновых рецепторов типа A_{2A}

Особенно высокая плотность $A_{2A}AR$ в базальных ганглиях и их тесное антагонистическое взаимодействие с дофаминовыми рецепторами D_2 , типичным примером которого является образование гетеромеров рецепторов $A_{2A}AR$ и D_2 [107], побудили исследователей выбрать $A_{2A}AR$ целью для облегчения дофаминергического истощения, характерного для болезни Паркинсона. Действительно, антагонисты $A_{2A}AR$ ослабляют признаки болезни Паркинсона на животных моделях, а регулярное потребление умеренных доз кофеина ослабляет признаки болезни Паркинсона у людей [108]. Как упоминалось выше, эти доклинические данные вместе с хорошим профилем безопасности антагонистов $A_{2A}AR$ подтверждают недавнее одобрение FDA истрадефиллина в качестве дополнительной терапии для лечения пациентов с болезнью Паркинсона [109]. Планируется проведение испытаний IV фазы для проверки роли $A_{2A}AR$ в контроле немоторных симптомов болезни Паркинсона, таких как когнитивный дефицит и дисфункция настроения.

Следует отметить, что траектория клинического принятия истрадефиллина была длинной и извилистой. После его появления в Японии в 2013 году доступ на рынок в Соединенных Штатах до недавнего времени (до 2019 года) был закрыт, а его применение ограничивается только лечением эпизодов «отключения» леводопой. Тем не менее, это одобрение прокладывает путь к созданию совершенно новых терапевтических возможностей для антагонистов аденозиновых рецепторов A_{2A} , таких как нейропротекция или изменение настроения и когнитивных нарушений при болезни Паркинсона и других психоневрологических заболеваниях [109].

Активно проводятся исследования в области применения агонистов аденозиновых рецепторов в терапии онкологических заболеваний. Накопленный внеклеточный аденозин в микроокружении опухоли опосредует регуляторные иммуносупрессивные функции, связываясь с $A_{2A}R$, экспрессируемым на Т-клетках и Т-клетках естественных киллеров

(NKT), моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, дендритных клетках и клетках естественных киллеров (NK) [78]. Эффект от выработки аденозина в обычных воспаленных тканях сочетает в себе регрессию воспаления в сочетании с активным подавлением иммунного ответа путем передачи сигналов через рецептор A_{2A} [110]. Однако эта комбинация заживления ран и иммуносупрессии неадекватна при злокачественных опухолях и является основным механизмом уклонения от иммунного ответа. С этой точки зрения передача сигналов аденозином представляет собой ключевой метаболический путь, который нарушает иммунологический надзор. Ранее ингибиторы экто-нуклеотидазы CD73 уже обсуждались как препараты, нацеленные на преодоление этого механизма (Раздел 1.1.5. Аналоги аденозина как иммуноонкологические препараты, стр. 23).

Соответственно, антагонисты $A_{2A}R$ можно использовать в качестве новых терапевтических мишеней для управления противоопухолевым иммунитетом. Так, антагонисты $A_{2A}R$ имараденант (AZD4635, AstraZeneca), цифораденант (CPI-444, Corvus Pharmaceuticals) и инупаденант (EOS 850, iTeos) (Рисунок 11) с 2015 года находятся в фазах I/II клинических испытаний. Эти соединения продемонстрировали подавление роста опухоли и иммунную активацию в доклинических моделях и хорошо переносятся пациентами [75].

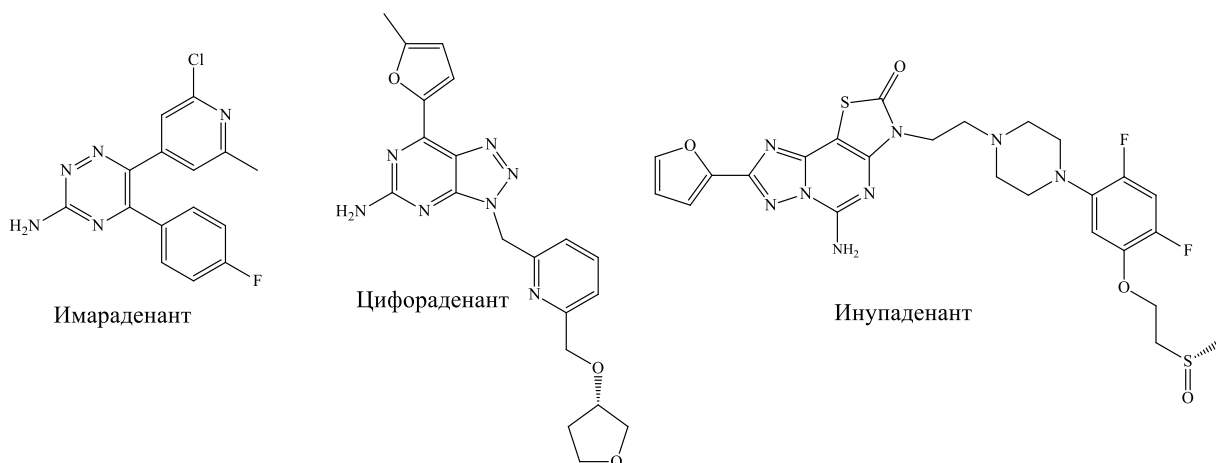
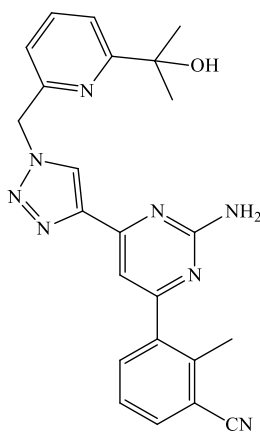


Рисунок 11 – Структурные формулы имараденанта, цифораденанта и инупаденанта, антагонистов аденозиновых рецепторов A_{2A}

Внимание исследователей в настоящее время смещается в сторону двойных ингибиторов $A_{2A}R/A_{2B}R$. Примером может служить этрумаденант (Etrumadenant, AV928, Arcus Biosciences, Рисунок 12), антагонист рецепторов обоих типов с эффективностью в низких наномолярных концентрациях, который проходит сейчас I и II фазы клинических испытаний для терапии рака легких, рака молочной железы и яичников, рака желудочно-кишечного тракта и рака простаты [111].



Эрумаденант

Рисунок 12 – Структурная формула эрумаденанта, антагониста аденозиновых рецепторов A_{2A} и A_{2B}

Несмотря на первоначальные опасения по поводу токсичности из-за полной блокировки аденозинового пути, это соединение не влияло на какие-либо физиологические параметры, чувствительные к ингибированию аденозина, даже при самой высокой клинической дозе 200 мг [112]. Лечение этрумаденантом в комбинации с антителом к PD1 зимберелимабом и доцетакселом привело к улучшению клинической картины у пациентов с метастатическим резистентным к кастрации раком предстательной железы [113].

Учитывая важность как образования аденозина в микроокружении опухоли, так и передачи сигнала через аденозиновые рецепторы, двойное ингибирование обоих механизмов является логичным следующим шагом. Были начаты комбинированные исследования этрумаденанта (ингибирование CD73) и кемликластата (антагонист A_{2A} и A_{2B}) при раке предстательной железы и колоректальном раке [75].

Рецепторы A₃AR представляют собой перспективную мишень для противоопухолевой терапии, поскольку высокий уровень экспрессии рецепторов A₃ характерен для некоторых линий опухолевых и воспалительных клеток [114, 115]. Путем комбинирования объемного заместителя в положении C2 аденинового фрагмента и уронамидной группы в 5'-положении рибозного фрагмента было разработано несколько высокоэффективных и селективных агонистов A₃ рецепторов [116]. Введение атома хлора может изменить аффинность соединения по отношению к A₃AR, однако это изменение может быть непредсказуемым и не подчиняться каким-либо законам [117-119].

Самыми известными синтетическими агонистами аденозиновых рецепторов подтипа A₃ являются уже упомянутые N⁶-(3-иодобензил)-аденозин-5'-N-метил-уринамид (IB-MECA, пиклиденозон, CF101) и 2-хлор-N⁶-(3-иодобензил)-аденозин-5'-N-метил-уринамид (Cl-IB-MECA, Namodenoson, Намоденосон, CF102) [120], отличающиеся отсутствием

атома хлора в С2 положении или его наличием, соответственно (Рисунок 13). Они представляют собой водонерастворимые перорально биодоступные агонисты A_3AR с разной областью применения. Оба индуцируют апоптоз раковых и воспалительных клеток за счет ингибирования выработки воспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (TNF)- α , интерлейкин (IL)-12, интерферон- γ , IL-17 и IL-23, а также при помощи молекулярного механизма, влекущего за собой нарушение регуляции сигнальных путей Wnt (развитие злокачественных опухолей) и NF- κ B (процессы воспаления и апоптоза) [121].

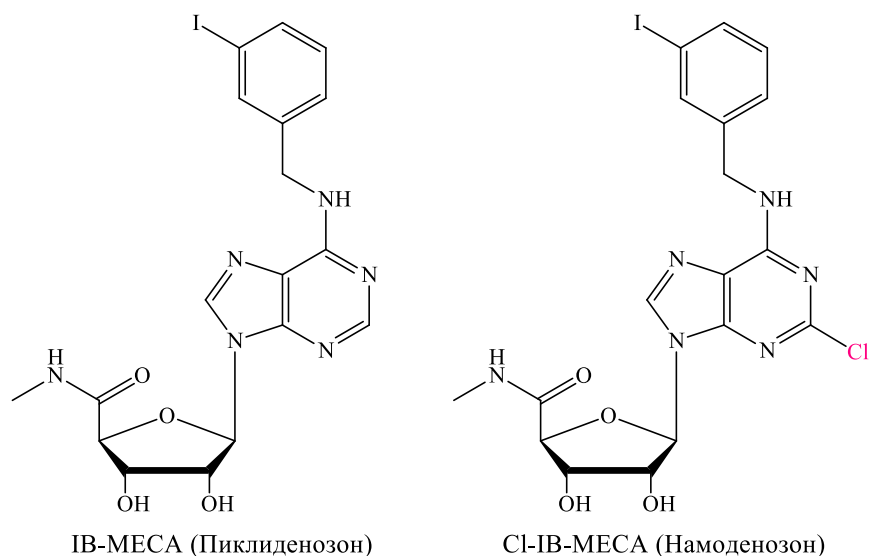


Рисунок 13 – Структуры IB-MECA и Cl-IB-MECA, агонистов аденозиновых рецепторов типа A_3

Важно отметить, что агонисты A_3AR оказывают различный эффект на патологические и нормальные клетки. Так, пиклиденозон и намоденозон индуцируют апоптоз воспалительных и раковых клеток, тогда как нормальные клетки невосприимчивы к действию этих препаратов или реагируют на них положительно [122]. В раковых клетках, где наблюдается сверхэкспрессия рецептора A_3AR , обработка соответствующим агонистом приводит к ингибированию регуляторных белков, таких как NF- κ B, с последующим ингибированием роста опухоли [121]. В нормальных клетках костного мозга при связывании агониста происходит активация NF- κ B с последующим повышением уровня цитокина гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), что индуцирует пролиферацию нормальных клеток-предшественников с увеличением количества лейкоцитов и нейтрофилов и обеспечивает химиопротекторный эффект [123]. Наиболее яркий пример такого механизма – одновременное противоопухолевое и противовоспалительное действие намоденозона на патологические клетки печени наряду с его гепатопротекторным действием на нормальные клетки печени.

Хороший профиль безопасности агонистов A_3AR объясняется таким дифференциальным эффектом [124].

В исследованиях фазы III у пациентов с псориазом пиклиденозон (IB-MECA) был безопасен и продемонстрировал эффективность, проявляющуюся в значительном улучшении состояния кожных покровов [115]. Также неплохие результаты были достигнуты у пациентов с ревматоидным артритом [125], однако дойдя до III фазы клинических испытаний, программа клинических исследований была прекращена, поскольку эффективность пиклиденозона оказалась ниже, чем у метотрексата [115]. Активность пиклиденозона как перорального противовоспалительного и противоракового агента была протестирована на нескольких экспериментальных моделях воспалительного заболевания кишечника, артрита, остеоартрита, увеита, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и синдрома высвобождения цитокинов [115]. Во всех моделях пероральное введение пиклиденозона вызывало заметное снижение воспалительной реакции, что подтверждалось клиническими и гистологическими анализами. Противораковая активность была продемонстрирована на животных моделях простаты, меланомы, толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы и карциномы молочной железы [115].

Исследование фазы II для лечения неалкогольной жировой болезни печени у пациентов с прогрессирующим заболеванием было успешно завершено и показало, что намоденозон оказывает противовоспалительное, антифиброзное и антистеатозное действие [115]. Намоденозон в настоящее время проходит III фазу клинических испытаний. Также в настоящее время намоденозон проходит фазу II клинических испытаний как препарат для терапии неалкогольного стеатогепатита.

Имеющиеся данные позволяют предположить, что пиклиденозон и намоденозон потенциально могут стать первыми агонистами A_3AR , получившими одобрение FDA, и представить класс новых пероральных и безопасных препаратов в арсенале борьбы с псориазом (пиклиденозон), гепатоцеллюлярной карциномой и неалкогольной жировой болезнью печени (намоденозон).

Противоопухолевый эффект IB-MECA и C1-IB-MECA в микромолярных концентрациях обусловлен механизмами, отличными от активации аденозинового рецептора A_3 [126, 127]. На клетках линии карциномы цитовидной железы человека NPA, лейкемии HL-60 и клетки лимфомы U-937 был показан значительный противоопухолевый эффект, однако он не предотвращался ни антагонистами A_3AR , ни ингибиторами нуклеозидных транспортеров, ни антагонистами рецепторов A_1 , A_{2A} и A_{2B} [126]. На основании этих результатов был сделан вывод, что IB-MECA или C1-IB-MECA в высоких концентрациях могут индуцировать гибель опухолевых клеток через рецептор-

независимые механизмы, возможно, посредством активного транспорта в клетки через транспортеры нуклеозидов [126, 127].

В клетках рака молочной железы человека MCF-7 ИВ-МЕСА в концентрации 100 мкМ заметно снижал количество клеток и ингибировал образование колоний [128]. Примечательно, что эти раковые клетки не экспрессируют А₃AR, а сверхэкспрессия А₃AR не снижает концентрации ИВ-МЕСА, необходимую для ингибирования клеточной пролиферации. В этих исследованиях было показано, что объяснение этого ингибирующего эффекта ИВ-МЕСА может быть связано с его способностью снижать уровень экспрессии альфа-рецептора эстрогена, который играет роль в различных сигнальных путях [128, 129].

1.3. Флуоресцентные нуклеозиды

Пурины и пиримидины, обычно встречающиеся в нуклеиновых кислотах, не флуоресцируют в нейтральных водных растворах. Вполне ожидаемо, что природа выбрала в качестве носителя генетического материала соединения, которые при фотохимическом возбуждении быстро возвращаются в исходное состояние. Флуоресцентные аналоги нуклеозидов нашли широкое применение в биологических исследованиях. Использование данных соединений помогает получить четкое представление о внутриклеточных взаимодействиях нуклеиновых кислот с белками, их динамике и локализации [130]. Кроме того, флуоресцентные аналоги модифицированных нуклеозидов применяются для анализа однонуклеотидного полиморфизма, как зонды-маяки и зонды для определения ионов металлов в живых системах [131]. Это мощный инструмент для визуализации и изучения внутриклеточных процессов.

Идеальный флуоресцентный нуклеозид обладает следующими свойствами: высоким квантовым выходом флуоресценции, смещенными в красную область максимумами поглощения, отсутствием дестабилизации при гибридизации, способностью обеспечивать распознавание азотистых оснований и способность достоверно и предсказуемо реагировать на различия в локальной среде посредством изменения интенсивности флуоресценции или длины волны. Многие флуоресцентные нуклеозиды были сделаны на основе аденозина [132, 133].

Первым и наиболее широко используемым флуоресцентным нуклеозидом стал 2-аминопурин (Рисунок 14), который представляет собой структурный изомер аденина со значительно улучшенными фотофизическими характеристиками [134, 135]. С момента первой публикации в 1969 г, описывающей его флуоресцентные свойства в составе нуклеозида или олигонуклеотидов, о 2-аминопурине сообщалось более чем в 1600

публикациях, а пионерная статья была процитирована почти 800 раз. Способность 2-аминопурина не нарушая вторичную структуру ДНК [136] образовывать стабильные пары с тиминном и урацилом по аналогии с Уотсон-Криковскими парами, высокий квантовый выход флуоресценции ($\Phi = 0,68$ в воде), изолированная полоса поглощения (303 нм), минимальная чувствительность к изменениям рН и, что важно, чувствительность к полярности окружающей среды — все это способствует его огромному потенциалу для использования [130], несмотря на малую величину стоксова сдвига (63 нм) [134].

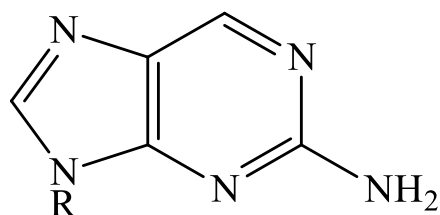
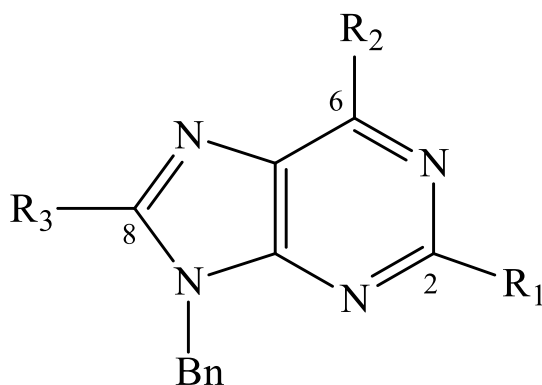


Рисунок 14 – Структура 2-аминопуриновых нуклеозидов, R = рибоза или 2'-дезоксирибоза

Однако менее эффективное и менее специфичное образование пар оснований по сравнению с аденином вносит возмущение в нативную структуру ДНК, а также придает 2-аминопурину повышенную динамику внутри спирали ДНК. Это делает 2-аминопурин менее пригодным в качестве зонда для изучения молекулярной динамики и взаимодействия ДНК–белок с использованием таких методов, как анизотропия флуоресценции и резонансный перенос энергии флуоресценции [135]. Разработка универсального аналога аденозина, который включает в себя все желательные характеристики, представляет собой довольно сложную задачу, решение которой не найдено до сих пор.

Достоин упоминания ряд аналогов азотистых оснований, пуриновый гетероцикл которых был использовано в качестве каркаса для размещения различных донорных и акцепторных групп с созданием так называемых «пуш-пулл» пуринов (Рисунок 15) [137, 138]. Базовая конструкция состоит из пуринового ядра и присоединенных к положениям С2 и С6 донорных amino-, метиламино- и диметиламиногрупп, а акцепторные группы – циано, карбоксиметильная и карбоксамидная – находятся в положении С8.



R₁ = NH₂, NHCH₃ или N(CH₃)₂
 R₂ = H, NH₂, N(CH₃)₂ или OBn
 R₃ = CN, COOCH₃ или CONHR

Рисунок 15 – Структуры «пуш-пулл» пуринов, где R₁ и R₂ – донорные группы, а R₃-электроноакцепторные группы

Такие замещенные пурины демонстрируют необычные фотофизические свойства, включая смещенный в красную область максимум поглощения (20–50 нм), повышенную квантовую эффективность (одну из самых высоких для известных пуринов, приближающуюся к единице) и сольватохроматические эффекты. Хотя такие аналоги при включении в нуклеиновые кислоты скорее всего нарушат их структуру, они могут найти применение в изучении распределения флуоресцентных нуклеозидов в клетке и биосенсорах [137, 138].

1.3.1. Триазолил-замещенные пурины

Среди огромного количества флуоресцентных нуклеозидов и производных азотистых оснований можно выделить класс пурин-триазольных конъюгатов [69, 139, 140], где гетероцикл пурина сопряжен (но не конденсирован) с триазольным гетероциклом. 1,2,3-Триазольное кольцо является распространенной фармакофорной системой среди азотсодержащих гетероциклов. Этот пятичленный гетероцикл может быть легко получен с использованием «click» химии при помощи катализируемой медью реакцией азид-алкинового [3+2] циклоприсоединения. Триазол устойчив к гидролизу и другим реакциям при физиологических pH. Пурин-триазолильные конъюгаты обладают необходимыми для флуорофора свойствами: стабильны и имеют смещенный в длинноволновую область максимум поглощения [139].

1,2,3-Триазол – миметик пептидной связи и может служить в качестве линкера между молекулой аденозина и другими молекулами. В итоге получается конъюгат с совершенно иными свойствами для различных биологических мишеней. Так, лигирование при помощи триазола было использовано для получения различных олигомерных нуклеотидов [141, 142] и введения флуорофоров в цепь ДНК [140]. Триазольные

нуклеотиды также исследуются в качестве ингибиторов эндонуклеазы CD73 [143]. Область применения производных 1,2,3-триазола сейчас активно развивается [140, 144].

Ряд производных C8-(1,2,3-триазол-4-ил)-замещенного аденозина, где триазол связан с положением C8 пурина через C-C связь, был синтезирован с использованием кросс-сочетания Соногаширы и клик-химии [139] (Рисунок 16). Нуклеозиды продемонстрировали высокую поглощающую способность и высокие квантовые выходы. Использование клик-химии позволяет вводить различные заместители по N1 положению 1,2,3-триазола, что позволяет модулировать длину волны излучения без существенного изменения свойств поглощения [139].

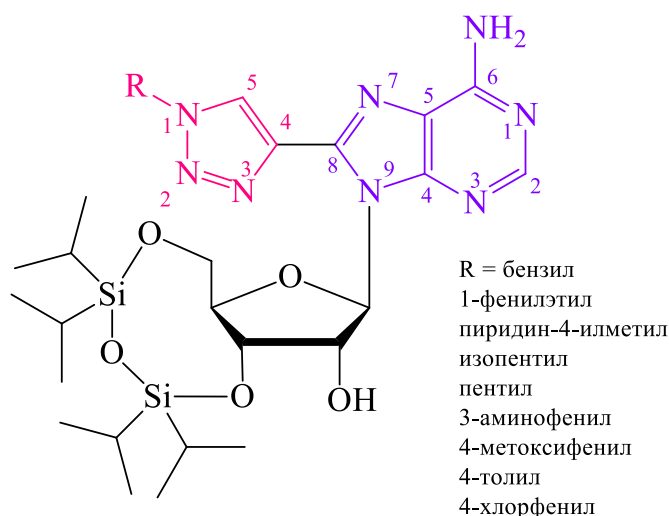


Рисунок 16 – Структура 8-(1,2,3-триазол-4-ил)-замещенных аденозинов

Флуоресцентные свойства полученных соединений (Рисунок 16) продемонстрировали большое различие между алифатическими и ароматическими заместителями R. Производные с алифатическими заместителями (R) имели похожие свойства с максимумом эмиссии около 344 нм. Кроме того, они обладали высокими квантовыми выходами флуоресценции (0,49–0,64) и сравнительно малыми стоксовыми сдвигами (53–57 нм). Максимум эмиссии нуклеозидов с ароматическими заместителями (R) был смещен в красную область (25–55 нм) по сравнению с алифатическими производными, у них наблюдались низкие квантовые выходы (0,03–0,05) и большие стоксовы сдвиги (74–102 нм). Однако несмотря на сопряжение ароматического заместителя с триазольным кольцом, нуклеозид с заместителем (R = 3-аминофенил) продемонстрировал высокий квантовый выход флуоресценции (0,38), самое сильное поглощение ($24000 \text{ мк}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и наибольший стоксов сдвиг (106 нм). Это показывает возможность «настройки» длины волны излучения, что необходимо в экспериментах по переносу энергии флуоресцентного резонанса, где длина волны излучения должна перекрывать область поглощения акцептора [139].

Были синтезированы две серии производных 2-триазол-1-ил- и 2-триазол-4-иладенозина (Рисунок 17). Для них определяли аффинность связывания с человеческими аденозиновыми рецепторами A_1 , A_{2A} и A_3 , а также относительную эффективность в отношении A_3AR . Аналоги триазол-1-ила показали сродство к A_3AR в низком наномолярном диапазоне, высокое отношение селективности A_3/A_{2A} и соотношение A_3/A_1 от умеренного до высокого. 1,2,3-триазол-4-ильные изомеры проявили пониженную аффинность к A_3AR . Соответствующие аналоги 5'-этилуруонида имели повышенное сродство к A_3AR и проявляли свойства полных агонистов [145].

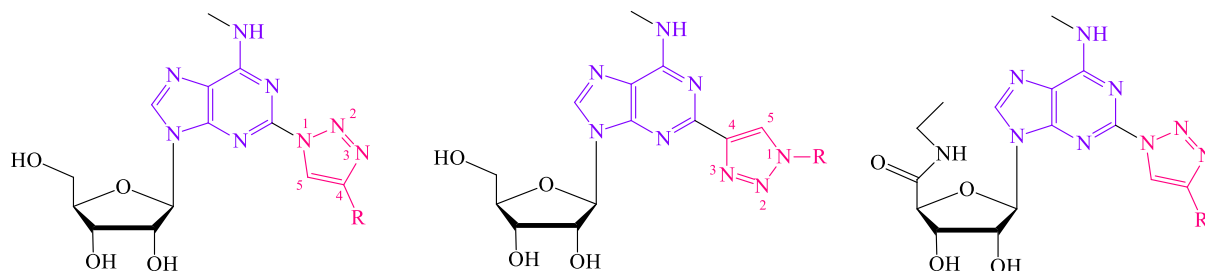


Рисунок 17 – Структуры 1,2,3-триазол-1-ил и 1,2,3-триазол-4-ил аналогов N^6 -метил аденозина

Была синтезирована серия производных N^6 -моно- и N^6 -бис-замещенного-2-(1,2,3-триазол-1-ил)аденозина, в которой все продукты обладали сходными флуоресцентными свойствами с максимумами эмиссии около 400 нм, стоксовым сдвигом до 130 нм и квантовыми выходами флуоресценции до 53% [146]. Интересно, что замещенные по N^6 положению аналоги C2-1,2,3-триазол-1-ил-аденозина продемонстрировали выраженную антипролиферативную активность при исследовании на культурах клеток рака яичников и колоректального рака человека HCT116 [147].

Были получены C6-аминокислотные производные 2-(1,2,3-триазол-1-ил)пуринового рибозида и установлено, что такие нуклеозид-аминокислотные соединения обладают флуоресцентными свойствами с максимумом эмиссии около 390 нм, стоксовым сдвигом до 91 нм и квантовым выходом до 38%, что несколько ниже, чем у простых N^6 -замещенных производных [69] (Рисунок 18). Интересно, что бис-2,6-ди-триазолильные производные показали такие же фотофизические характеристики, что и 2-триазолилы [146].

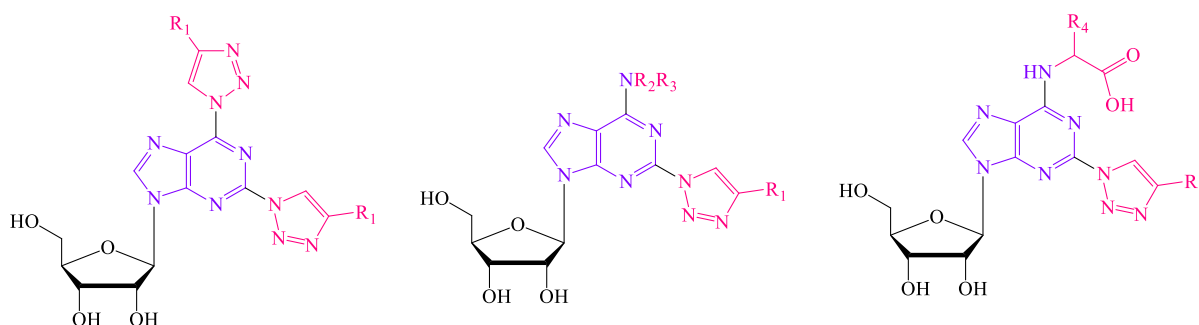


Рисунок 18 – Структуры N⁶-замещенных C2-1,2,3-триазол-1-ил аналогов аденозина

Были также синтезированы C6-(1,2,3-триазол-4-ил)-замещенные пуриновые нуклеозиды (Рисунок 19). К сожалению, исследование их флуоресцентных характеристик не проводилось, однако оценивали связывание этих соединений с мембранами клеток млекопитающих Chem-3, которые сверхэкспрессируют аденозиновые рецепторы типа A₁, получив неоднозначные результаты. Некоторые соединения увеличивали выработку цАМФ, дозозависимо действуя как антагонисты A₁, а некоторые соединения действовали как агонисты, в том числе бис-производное (Рисунок 19) [148].

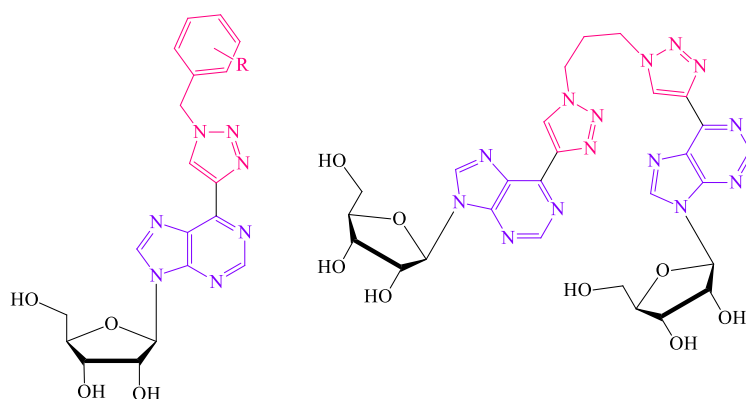


Рисунок 19 – Структуры моно- и бис-C6-1,2,3-триазол-4-ильных производных

Также была синтезирована серия производных 6-(1,2,3-триазол-1-ил)пуририбозида (Рисунок 20), но флуоресцентные исследования не проводились. Однако соединения тестировали на антипролиферативную активность в отношении клеток карциномы толстой кишки HCT116 и клеток карциномы яичников. Было отмечено лишь слабое антипролиферативное или цитотоксическое действие [149].

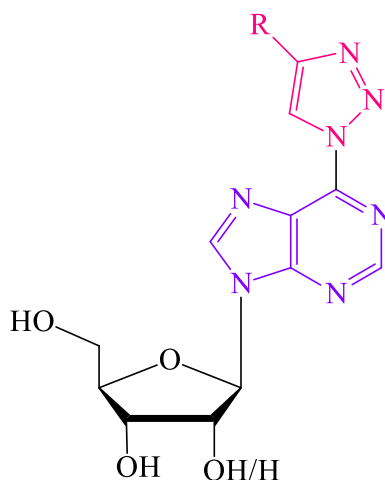


Рисунок 20 – Структура C6-1,2,3-триазол-1-ильных производных

Помимо катализируемого одновалентной медью циклоприсоединения исследовалась реакция промотируемого напряжением азид-алкинового циклоприсоединения между

нуклеозидами 2- или 8-азидoadенина с различными циклооктинами [150]. Реакции проводили в средах для культивирования клеток или водно-органических растворах при комнатной температуре без присутствия меди. Полученные соединения (Рисунок 21), в том числе синтезированные *in vivo*, обладали выраженными флуоресцентными свойствами и использовались для прямой визуализации живых раковых клеток MCF-7 без необходимости использования дополнительных флуорофоров. Было продемонстрировано использование модифицированных триазолом азотистых оснований для динамического измерения и отслеживания сигнальных событий внутри отдельных живых клеток [150].

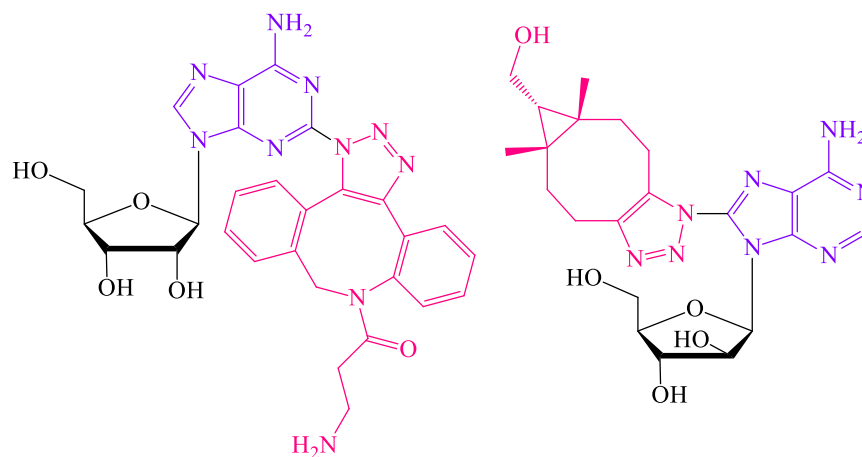


Рисунок 21 – Структуры триазолил-замещенных производных аденозина

Были проведены исследования по встраиванию триазолил-модифицированных аденозинов в олигонуклеотиды. N⁶-Метил-2-(1,2,3-триазол-1-ил)-2'-дезоксирiboаденозин продемонстрировал квантовый выход 12% в воде. В дальнейшем он был применен в синтезе тринуклеотида (Рисунок 22), который обладал стоксовым сдвигом 121 нм и квантовым выходом 7% при облучении на длине волны 310 нм, что сопоставимо с подобными тринуклеотидами, содержащими 2-аминопурин (3–6%) [151].

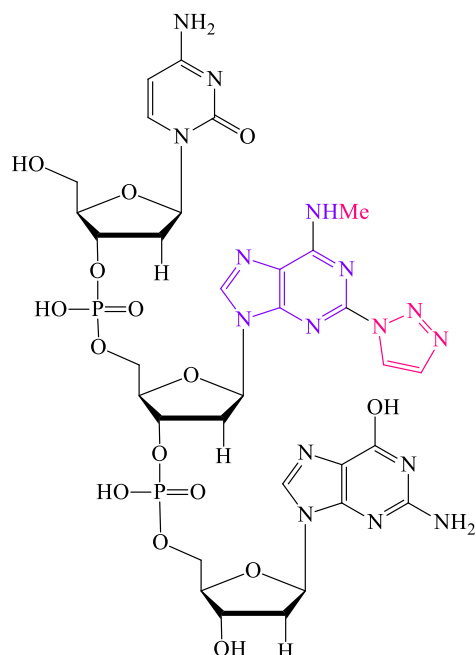


Рисунок 22 – Структура флуоресцентного тринуклеотида

Были синтезированы бис-триазол-4-ильные производные с 9-этил-3,3,3-трифенилпропаноатовым заместителем (Рисунок 23). Оказалось, что не все производные бистриазолилпурина проявляют флуоресценцию: с заместителем CN не было обнаружено флуоресценции, но для соединения с заместителем OMe квантовый выход достигал 26% с максимумом эмиссии на 394 нм. В этом исследовании были получены производные 9H-пурина, и их фотофизические свойства были изучены и сравнены с их триазол-1-ильными аналогами, однако прямых корреляций провести не удалось. Квантовые выходы для производных бистриазолилпурина в растворе ДМСО достигали 49%, а для монотриазолилпуринов, связанных С-С, до 81% в CH_2Cl_2 и до 95% в ДМСО [152].

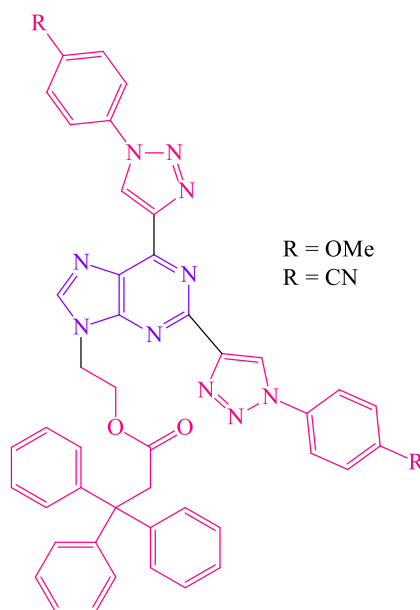


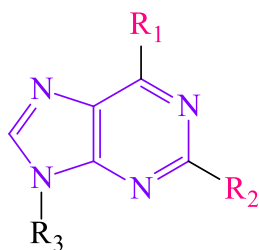
Рисунок 23 – Структура 2,6-бис-триазол-4-ильных производных пурина

Олигонуклеотиды, содержащие производные 8-(1,2,3-триазол-4-ил)-аденина, можно получить при помощи автоматического синтезатора и стандартного фосфамидитного цикла [153] или встроить в олигонуклеотидную ДНК, содержащую одиночный нуклеотидный разрыв, при помощи полимеразы β [154]. Полученный при помощи полимеразы β олигонуклеотид продемонстрировал отличные флуоресцентные свойства по сравнению с широко используемым 2-аминопурином. Квантовые выходы флуоресценции достигали 20% и 5% в одноцепочечной и двухцепочечной ДНК соответственно и зависели от соседних оснований. Интересно, что несмотря на довольно объемную модификацию пурина, C8 положение достаточно удалено от локализации классических водородных связей по Уотсону и Крику, чтобы C8-замещенный аденин демонстрировал лишь незначительную дестабилизацию дуплексов ДНК, сравнимую с 2-аминопурином, и вызывал минимальные структурные нарушения нормальной В-ДНК. Производные 8-(1,2,3-триазол-4-ил)-аденина образовывали пары с тиминном и, что удивительно, с аденином [154].

1.4. Методы химической модификации пуринового основания

Говоря о химической модификации пуринового гетероцикла, необходимо упомянуть о работах Робинса и Монтгомери, проведенных в 60-70 годах, которые стали пилотными в этой области. Разработав методы, которые до сих пор используются для синтеза подобных соединений, они синтезировали целые библиотеки соединений C2 и C6 замещенных пуринов.

В серии работ 1960 года, проведенных при участии Джона А. Монтгомери и озаглавленных «Synthesis of Potential Anticancer Agents» приведен синтез различных 2,6-замещенных пуринов [155, 156], в том числе галоген-замещенных [157] (Рисунок 24). Из-за применения довольно агрессивных синтетических методик (например, сильный нагрев, пробулькивание газообразного хлора через метанольный раствор соединения [158] или суспендирование в жидком аммиаке с добавлением металлического натрия [157]) синтезы в основном проводились на плохо растворимых гетероциклических основаниях, а не на нуклеозидах. Это было удобно для проведения перекристаллизации или если в ходе реакции модифицированные основания выпадали в осадок, однако в ряде случаев реакции было проще вести с хорошо растворимыми нуклеозидами [157].



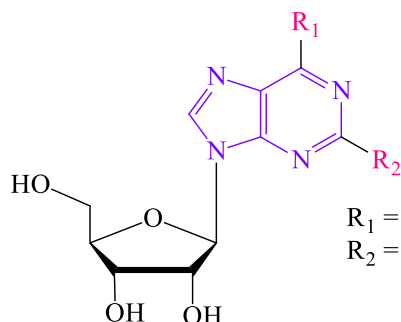
$R_1 =$ O-Alkyl, H, OH, NH_2 , SH, Cl, CH_3 , etc

$R_2 =$ NH_2 , F, Cl, H, etc

$R_3 =$ рибоза, 2'-дезоксирибоза, H, etc

Рисунок 24 – Структуры синтезированных химически замещенных пуринов

Чуть позже этих работ, в 1961–1967 годах, вышла серия материалов под авторством Роланда К. Робинса, под названием «Purine Nucleosides». Особое внимание в этих работах уделялось введению атомов галогенов по разным положениям гетероциклического основания, в том числе по C8 положению [159-162], а работы велись с использованием рибозидов и их триацетатов. Примеры полученных соединений приведены на рисунке (Рисунок 25).



$R_1 =$ O-alkyl, Cl, I, Br, SH, $\text{N}(\text{Et})_3$ и другие

$R_2 =$ NH_2 , Cl, F и другие

Рисунок 25 – Структуры синтезированных химически замещенных пуриновых нуклеозидов

Одной из основных проблем при попадании модифицированных нуклеозидов в клетку является их биодegradация под воздействием внутриклеточных ферментов. В случае модифицированных пуриновых нуклеозидов это явление можно использовать: фосфорилирование нуклеозидов внутриклеточными киназами приводит к образованию соответствующих нуклеотидов, и в этой форме лекарственное вещество чаще всего обладает активностью. Однако, нуклеозиды также подвергаются действию внутриклеточной аденозиндезаминазы, которая в норме катализирует превращение аденозина в инозин, а в случае модифицированных нуклеозидов способна инактивировать их, удаляя активную группу или заменяя ее на кетогруппу. Как уже было упомянуто, одним из способов предотвращения воздействия аденозиндезаминазы на нуклеозид является введение атома галогена (фтора или хлора) во второе положение пуринового гетероцикла (флударабин, кладрибин, клофарабин) [38, 163], что делает соединения полностью устойчивыми к действию аденозиндезаминазы.

Введение различных заместителей по шестому положению гетероциклического основания не только расширяет спектр биологической активности соединения, но и может также способствовать увеличению устойчивости соединения к действию аденозиндезаминазы [44, 164-169]. Такая химическая модификация может осуществляться различными способами. Эффективным и испытанным подходом является нуклеофильное ароматическое замещение, протекающее по механизму присоединения и отщепления (S_NAr) [71, 170, 171], для которого во взаимодействие вводятся 6-замещенное производное пурина и нуклеофил, обычно в присутствии основания (Схема 2).

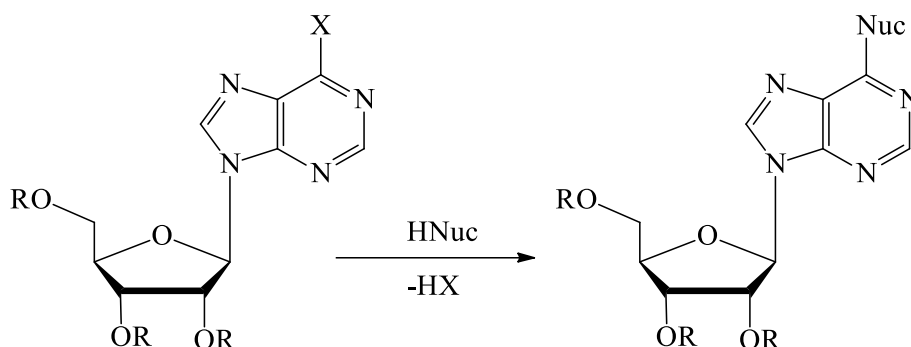


Схема 2 – Нуклеофильное ароматическое замещение по С6 положению пурина

Нуклеофильное замещение в пуриновом нуклеозиде – универсальная процедура, удобный метод введения новых заместителей в пуриновое ядро [172]. Скорость и условия реакции зависят от наличия других заместителей модифицированного пурина, от типа уходящей группы **X**, а также от природы нуклеофила. Для лучшего протекания такого замещения нужны определенные условия. Наличие электрон-акцепторных групп в гетероцикле, способствующих делокализации отрицательного заряда в молекуле пурина, позволяет реакции проходить быстрее и в более мягких условиях, чем без заместителя или с электронодонорным заместителем [173]. В качестве хороших уходящих групп в литературе можно встретить множество вариантов: имидазол [173, 174], триазол [175], тозил [176, 177], мезитилен сульфонат [178, 179], хлор [44, 46, 62, 164], фтор [180], бром [181] и другие.

Была описана неожиданно высокая активность 6-бромпуририбозиды по сравнению с 6-хлорпуририбозидом в реакциях S_NAr [181], что находится в несоответствии с рядом активности галогензамещенных ароматических систем ($F > Cl > Br > I$) [182]. Было проведено полное исследование реакции S_NAr в ряду 6-фтор-, 6-хлор-, 6-бром-, 6-иод- и 6-алкилсульфонил-пуририбозидов [180]. В качестве нуклеофилов были исследованы азот, кислород и сера. Оказалось, что в ряде случаев 6-галогенпурины не соответствовали классическому порядку реакционной способности для реакций S_NAr , а реакционная

способность при С6 в пуринах зависела от природы уходящей группы и нуклеофила. Скорость реакции с первичными алифатическими аминами уменьшалась в ряду $F \gg Br > Cl > I$, с алифатическими спиртами в ряду $F \gg Cl = Br > I$ и с тиолатами в ряду $F > Br = I > Cl$, то есть находилась в приблизительном соответствии с «классическим» рядом $F > Cl > Br > I$. При этом со слабыми нуклеофилами – ароматическими аминами – скорость реакции уменьшалась в ряду $I > Br > Cl > F$, причем наблюдалось время отсрочки начала реакции (~50 мин для 6-йод- и ~6 ч для 6-фторзамещенного производного), а затем реакция протекала с возрастающей скоростью.

Объяснением этого необычного явления стал автокатализ (Схема 3). Первая стадия, присоединение, является обратимой, а вторая стадия, потеря $HHal$, является лимитирующей. Образующийся в процессе $HHal$ протонирует пуриновое основание. Время отсрочки начала реакции зависит от силы кислоты $HHal$. Протонированное основание образует более устойчивый интермедиат. В отсутствие внешнего кислотного катализатора производное 6-йодпурина оказалось самым активным за счет автокатализа под действием образующейся в ходе реакции кислоты HI [183].

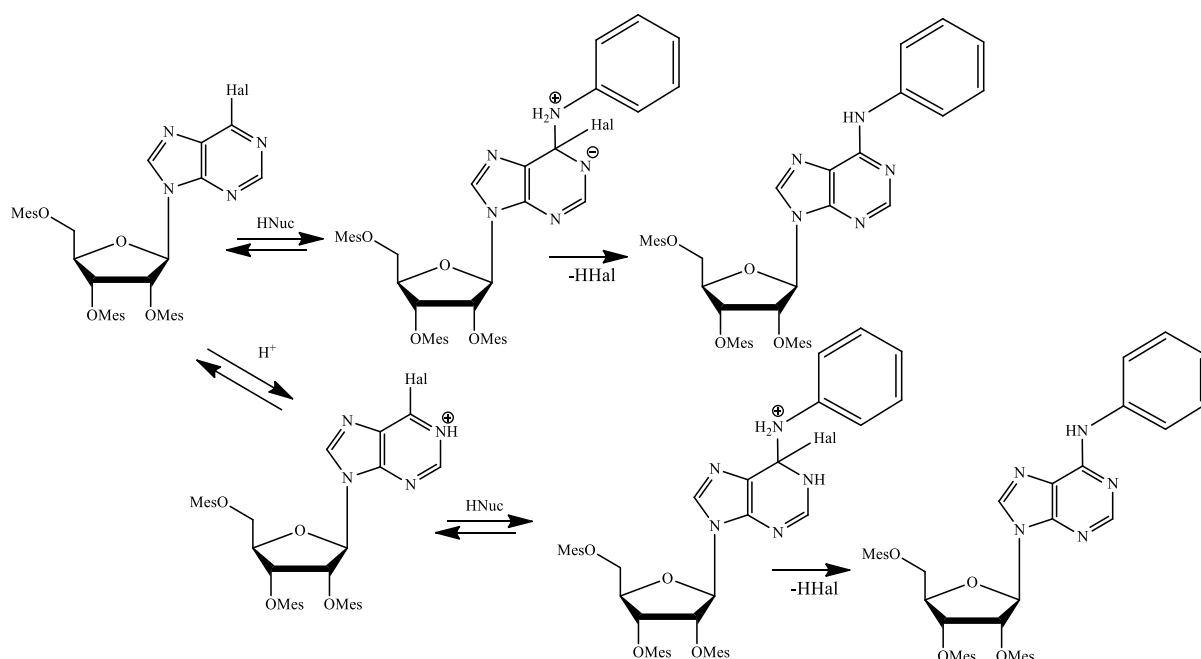


Схема 3 – Механизм автокаталитического протекания реакций S_NAR со слабыми нуклеофилами

Добавление трифторуксусной кислоты устранило отсрочку начала реакции, и порядок уменьшения скорости реакции изменился: вместо $I > Br > Cl > F$ стал близок к классическому: $F > I > Br > Cl$. Это объясняет ускорение протекания реакций нуклеофильного замещения в гетероциклических системах при использовании слабых нуклеофилов при добавлении кислоты [184]. Множественные эффекты, влияющие на скорость реакции,

включают термодинамическое и кинетическое протонирование различных положений в 6-галопурина, а также анилина как нуклеофила; образование водородной связи с уходящей группой H-F-C6, а также прочность связи углерод-галоген [180].

Эффективным методом получения новых производных природных нуклеозидов, замещенных по C6 положению пурина, являются разнообразные реакции кросс-сочетания с образованием новой связи углерод-углерод [185], например реакции Сузуки-Мияура [183, 186, 187], Стилле [187] и Соногашеры [188]. При помощи реакции катализируемого палладием кросс-сочетания были получены новые аналоги пуриновых рибозидов, содержащих алкильные и циклоалкильные заместители в положении C6 [189]. Также стоит упомянуть прямое алкилирование положения N⁶ [190-193].

Интересно, что нуклеозиды с объемными заместителями являются субстратами пуриннуклеозидфосфорилазы *Escherichia coli* (PNP *E. coli*) [189]. Объемные бензоксазиновые заместители в C6 положении пурина также не мешают проведению ферментативного синтеза при помощи PNP [194]. PNP *E. coli* способна трансгликозилировать нуклеозиды независимо от стерически затрудняющих или гидрофобных заместителей в C6-положении синтезированных рибозидов, что открывает широкие возможности для дальнейшей модификации при помощи реакции трансгликозилирования. Подробно реакция трансгликозилирования будет обсуждаться в следующем разделе.

Отдельно стоит выделить подход к синтезу модифицированных пуриновых рибозидов с использованием метода азид-алкинового [3+2] циклоприсоединения, катализируемого солями одновалентной меди (Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC), самого известного представителя ряда реакций click-химии [69, 139, 149, 151], позволяющий получить 1,2,3-триазолил замещенные нуклеозиды (Схема 4) [149].

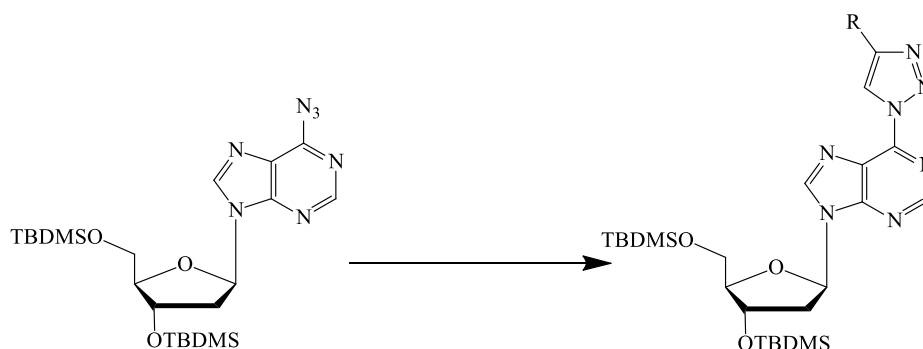


Схема 4 – Синтез 6-триазол-1-ильных производных пуриновых нуклеозидов методом click-химии

У реакции CuAAC с использованием азид-замещенных пуринов наблюдались сложности. Во-первых, азид находится в равновесии с N1-тетразолил-изомером [149, 195]

(Схема 5). Во-вторых, в присутствии солей одновалентной меди и аскорбата натрия (который используется для генерации солей одновалентной меди *in situ*) азидная группа легко восстанавливается до амидной, что приводит к образованию инертного побочного продукта. Эти сложности потребовали оптимизации состава растворителей. Реакция прошла в двухфазной системе растворителей хлористый метилен – вода, где восстановление азидов до амина было минимальным [149].

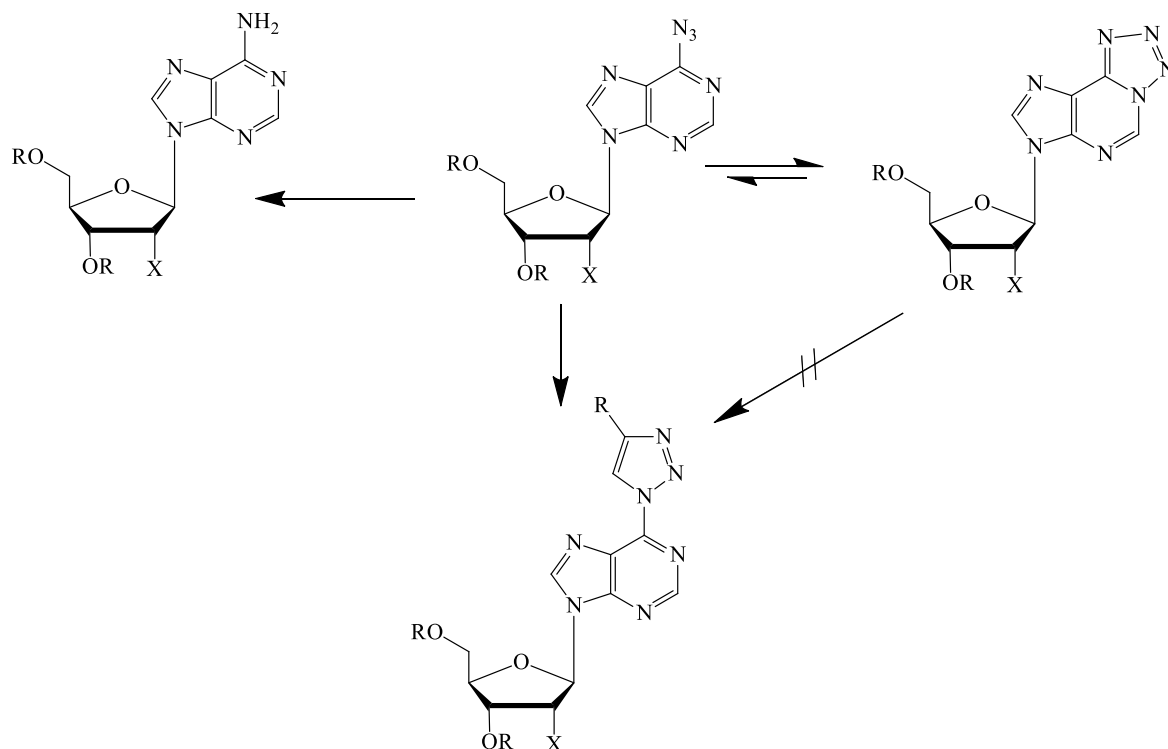


Схема 5 – Проблемы азид-замещенных пуринов: образование тетразольной формы и восстановление до амина

Проблема азидо-тетразольной таутомерии стала стимулом для получения ряда 1,2,3-триазол-4-ил-замещенных пуринов. Не получив желаемые 1,2,3-триазол-1-ил-замещенные пурины, авторы применили альтернативную синтетическую стратегию и использовали С6-ацетиленпурин в качестве алкинской компоненты для реакции CuAAC [148] (Схема 6).

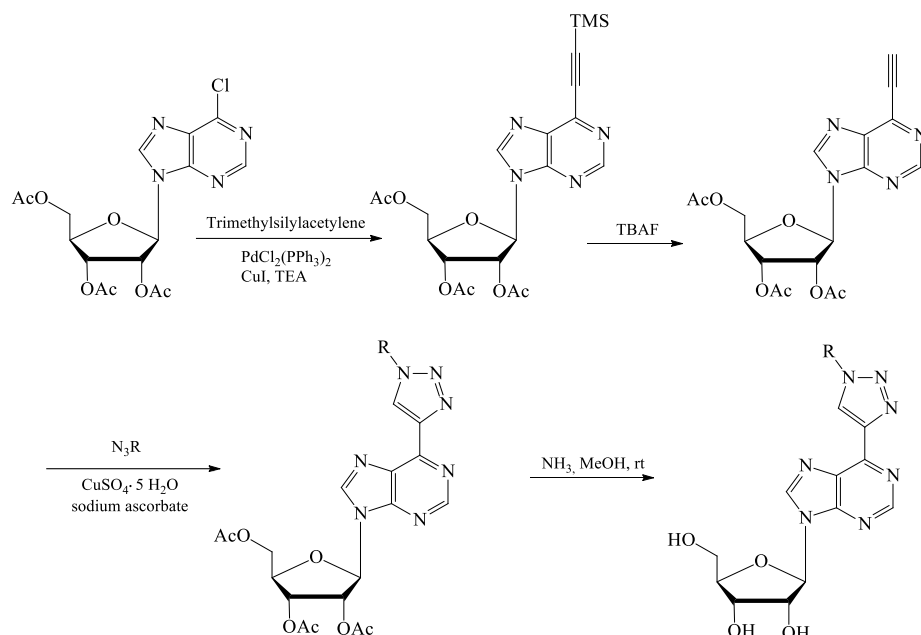


Схема 6 – Синтез триазол-4-ил-замещенных пуринов

Это позволило получить несколько новых 1,2,3-триазол-4-ил-замещенных пуринов, в том числе и димерное соединение (Рисунок 19, стр 41). Полученные соединения изучались в отношении агонистов аденозиновых рецепторов типа A_1 [148].

Проблема изомеризации была успешно решена подбором растворителей и добавлением 10% уксусной кислоты к реакционной смеси (Схема 7). Такое количество не влияет на устойчивость гликозидной связи и предотвращает образование тетразольной формы. Этим методом были получены 2,6-бистриазолильные производные пурина [146].

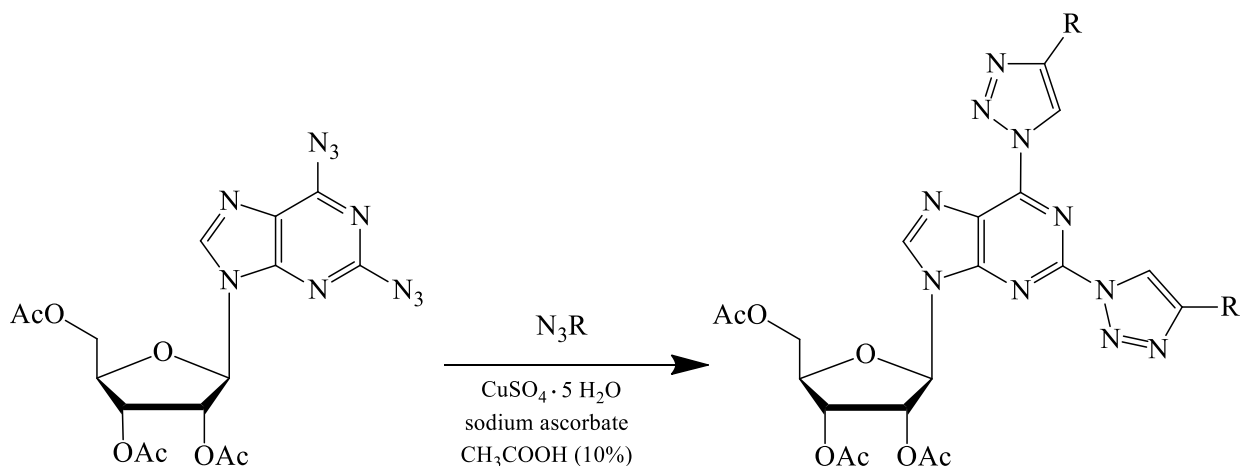


Схема 7 – Синтез 2,6-бистриазолильных производных пурина

Было показано, что триазол в С6 положении пуринового гетероцикла является хорошей уходящей группой в реакции нуклеофильного замещения и позволяет получить

ряд 2-триазолил-N⁶-замещенных аденозинов [146], в том числе производных, где R₂/R₃ - остаток аминокислоты [69] (Схема 8).

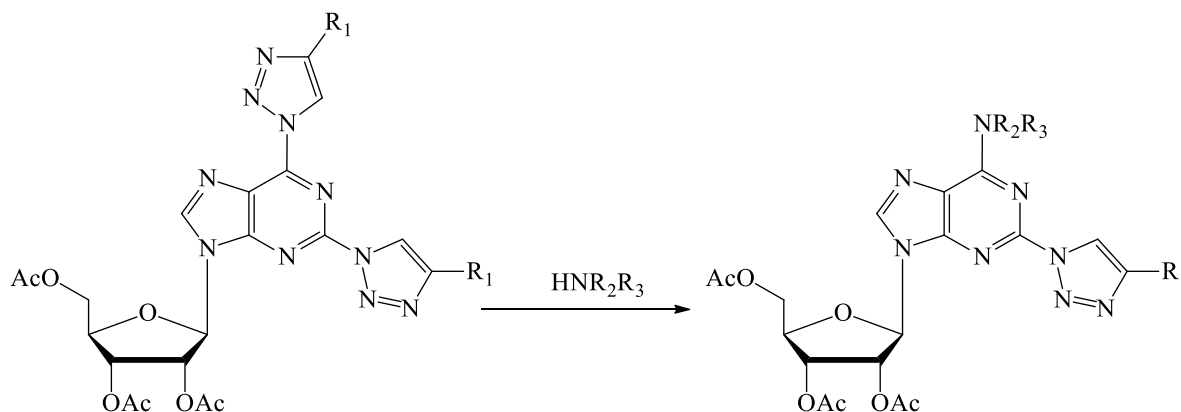


Схема 8 – Синтез триазолил-замещенных производных аденозина

Сочетание азид-алкинового [3+2] циклоприсоединения и нуклеофильного замещения представляет собой перспективную стратегию для осуществления синтеза разнообразных биоконъюгатов.

1.5. Ферментативный синтез нуклеозидов с использованием нуклеозидфосфорилаз

Типичные ограничения в химии нуклеозидов – многоступенчатые процессы синтеза, реакции введения и снятия защитных групп, отсутствие регио- и стереоселективности и вследствие этого низкие выходы целевых соединений и высокая трудоемкость процесса выделения их из реакционных смесей [172, 196, 197]. Наиболее распространенный способ синтеза нуклеозидов включает в себя присоединение гетероциклического основания (или его производных) к углеводному фрагменту. Для этого требуется введение защитных групп в гетероциклическое основание и углеводный фрагмент и использование соответствующего донора остатка углевода. Контроль региоселективности образования С-Н гликозидов необходим при наличии нуклеофильных групп в гетероциклических основаниях.

Открытие новых терапевтических агентов идет рука об руку с созданием новых синтетических стратегий, направленных на преодоление этих препятствий. Химико-ферментативный подход к синтезу позволяет преодолеть большинство этих недостатков. К основным преимуществам ферментативных методов относятся высокая каталитическая эффективность, мягкие условия реакции (а значит, более экологичный и безопасный синтез), высокая стерео- и региоселективность, уменьшение количества стадий синтеза. Однако по-настоящему эффективный синтез аналогов нуклеозидов часто является результатом сочетания химических методов и биохимических превращений [12].

Обеспечить более простой подход к разработке новых пуриновых нуклеозидов позволяет принцип ферментативного синтеза, воплощенный в реакции трансгликозилирования (Схема 9).

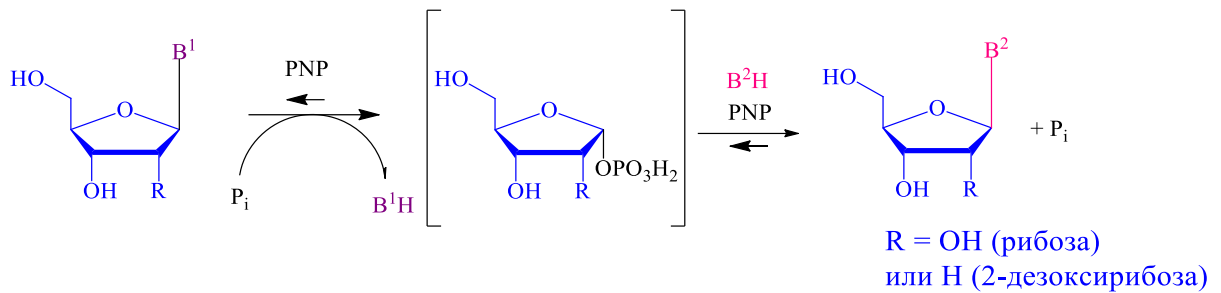


Схема 9 – Реакция трансгликозилирования. PNP – пурипнуклеозидфосфорилаза, P_i – неорганические фосфаты, B^1 – природное гетероциклическое основание, B^2 – модифицированное гетероциклическое основание

Пурипнуклеозидфосфорилазы (PNP, EC 2.4.2.1) *E. coli* катализируют обратимый фосфоролит гликозидной связи с образованием остатка пентофуранозы и гетероциклического основания. При наличии в реакционной среде второго пуринового основания может происходить образование нового нуклеозида в результате регио- и стереоселективной реакции трансгликозилирования. Фермент осуществляет перенос 1- α -фосфата пентофуранозы с природных нуклеозидов на новые пуриновые или модифицированные гетероциклические основания.

В качестве акцептора углеводного остатка в реакцию можно вводить как нуклеозиды, так и гетероциклические основания. Так получают серии новых нуклеозидов с разными гетероциклами и одной и той же модифицированной углеводной частью: 2'-, 3'-дезоксирибозиды [198-200], арабинозиды [199, 201], 4'-алкилрибозиды [202, 203] и другие нуклеозиды [12, 199].

Ферментативный процесс регио- и стереоселективен, то есть не происходит образования побочных продуктов химического синтеза: альфа-аномера гликозида или N-7 региоизомера пурина [204]. Тем не менее, из-за субстратной специфичности ферментов в некоторых случаях химический синтез является единственным рациональным подходом [205].

Высокая термостабильность нуклеозидфосфорилаз позволяет проводить ферментативные процессы при повышенной температуре реакционной смеси. Это важно при работе с пуриновыми гетероциклическими основаниями и нуклеозидами, плохо растворимыми в водных буферных растворах при комнатной температуре, и значительно ускоряет процедуру получения нуклеозидов реакцией трансгликозилирования.

Нуклеозидфосфорилазы из разных организмов давно используются для синтеза новых нуклеозидов, и в настоящее время активно изучаются механизмы протекания

катализа этими ферментами [206]. Применение PNP не ограничено природными и модифицированными пуриновыми гетероциклами [207, 208]: она также способна синтезировать нуклеозиды разнообразных 1,2,4-триазолов [209], бензимидазолов [210], трициклических аналогов пуринов [211] и других азотсодержащих гетероциклов [212]. При помощи PNP возможно получение нуклеозидов, меченных изотопами ^{13}C , с высоким выходом и чистотой [213].

Такой широкой субстратной специфичностью обладает PNP *E. coli*, а PNP человека не так универсальна [214]. Ферменты PNP термофильных бактерий *Deinococcus geothermalis*, *Geobacillus thermoglucosidasius* эффективны при работе с малорастворимыми в воде гетероциклами [215] за счет повышения температуры реакционной смеси до 70 °C. Однако расплачиваться за это приходится более узкой субстратной специфичностью. Ферментативный подход крайне удобен для получения рядов новых нуклеозидов и в последнее десятилетие обретает все большую популярность у исследователей по сравнению с химическим синтезом.

Интеграция химического и ферментативного синтеза позволяет разрабатывать новые серии нуклеозидов. Этот метод комбинированного синтеза позволяет получить соединения различной химической структуры. Полученные методами такого синтеза нуклеозиды имеют перспективу для исследования в медицинских целях. В частности, они могут быть исследованы в терапии онкологических заболеваний как цитостатические противоопухолевые агенты (аналоги кладрибина). Такие новые нуклеозиды имеют потенциал как противовирусные агенты. Их взаимодействие с клеточными механизмами может подавлять вирусные процессы и снижать репликацию вирусов. Также новые аналоги аденозина могут стать агонистами аденозиновых рецепторов определенных подтипов.

В целом, комбинация химического и ферментативного синтеза открывает перспективные пути для создания молекул с уникальными биологическими свойствами. Эти новые нуклеозиды представляют интерес как потенциальные компоненты терапевтических стратегий против онкологических заболеваний и вирусных инфекций, а также как модуляторы аденозиновых рецепторов, обладающие способностью воздействовать на разнообразные биологические процессы.

2. Обсуждение результатов

Модифицированные нуклеозиды обладают широким спектром биологической активности. Производные аденозина могут выступать в качестве агонистов аденозиновых рецепторов с различной селективностью и аффинностью; 2-галогенпроизводные аденозина, такие как кладрибин или флударабин, обладают цитостатическим действием. Работа направлена на расширение спектра производных и исследование свойств новых аналогов аденозина и 2'-дезоксаденозина, замещенных по пуриновому гетероциклу. Благодаря структурному разнообразию синтезируемых нами нуклеозидов возможно определить наиболее активные соединения, изучить механизмы их действия и получить новые биологически активные соединения.

Цель работы – разработка химико-ферментативного метода синтеза новых модифицированных аденозиновых нуклеозидов ряда рибозы и 2-дезоксирибозы. Сочетание химического и ферментативного синтеза позволяет методами химического синтеза внести модификации по гетероциклическому основанию, а методом ферментативного синтеза проводить замену стабильной в условиях химического синтеза рибозы на менее стабильную 2-дезоксирибозу.

Комплекс экспериментальных работ по синтезу и изучению свойств новых модифицированных нуклеозидов аденозина можно подразделить на следующие основные направления:

1. Синтез серии 2,6-дизамещенных аналогов аденозина с применением методов классического химического синтеза;
2. Проведение ферментативного синтеза 2'-дезоксирибонуклеозидов из синтезированных ранее рибозидов при помощи реакции трансгликозилирования с использованием пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*;
3. Проведение ферментативного синтеза новых аналогов аденозина из модифицированных по N⁶-положению аденинов при помощи реакции трансгликозилирования с использованием пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*.

2.1. Синтез серии 2-хлор-N⁶-замещенных аналогов аденозина с применением методов классического химического синтеза и исследование биологической активности полученных соединений

Растворимость соединения в водных растворах – важная составляющая успеха применения этого соединения. Применение многих нуклеозидов ограничено их низкой растворимостью в воде, а значит, ее увеличение может способствовать их большей биодоступности и расширению сферы применения. Введение аминокислоты в молекулу биологически активного соединения изменяет ее биологические свойства. В частности, это было показано при создании 5'-аминокислотных эфиров нуклеозидов [216]. Дополнительная аминогруппа увеличивает количество потенциальных водородных связей, которые могут быть образованы с пуриновым циклом [217]. Синтез ряда нуклеозидов N-(пурин-6-ил)аминокислот и их производных представляет научный интерес, так как заместитель в виде аминокислоты по С6 положению пурина влияет на физиологическую и биологическую активность соединения [61, 62, 64, 68].

Одной из задач работы стало совместить модификации С2 и С6 положений пурина и синтезировать ряд новых 2-хлорпуриновых рибонуклеозидов, содержащих в С6 положении остатки хиральных аминокислот и их аналогов.

2.1.1. Получение аналогов 2-хлораденозина: реакция нуклеофильного замещения в цикле (S_NAr)

Химическую модификацию пуриновых гетероциклов целесообразно проводить при помощи нуклеофильного ароматического замещения, которое протекает в мягких условиях при использовании в качестве хорошей уходящей группы хлора в шестом положении гетероцикла. Известно, что введение атома хлора во второе положение пуринового гетероцикла приводит к появлению устойчивости соединения к действию внутриклеточной аденозиндезаминазы, а благодаря наличию электроноакцепторного заместителя упрощается реакция нуклеофильного ароматического замещения по шестому атому углерода гетероцикла.

В качестве ключевого интермедиата для синтеза новых пуриновых рибонуклеозидов был выбран защищенный по гидроксильным группам углеводного остатка 2,6-дихлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)пурин **1**, устойчивый при хранении и хорошо растворимый в органических растворителях.

Это соединение получали трехстадийным синтезом с высокими выходами из доступного природного гуанозина **2** (Схема 10). Ацилирование гуанозина проводилось по

модифицированной методике [218] с получением ацелированного производного **3**. Наши опыты показали, что при использовании полуторакратного избытка уксусного ангидрида и двуступенчатом повышении температуры реакционной смеси сначала до 50 °С, а затем до 72 °С реакция протекает более полно, с выходом нуклеозида **3** после очистки до 92%. Получение 6-хлорпроизводного **4** осуществлялось по той же методике [218], но условия выделения были оптимизированы.

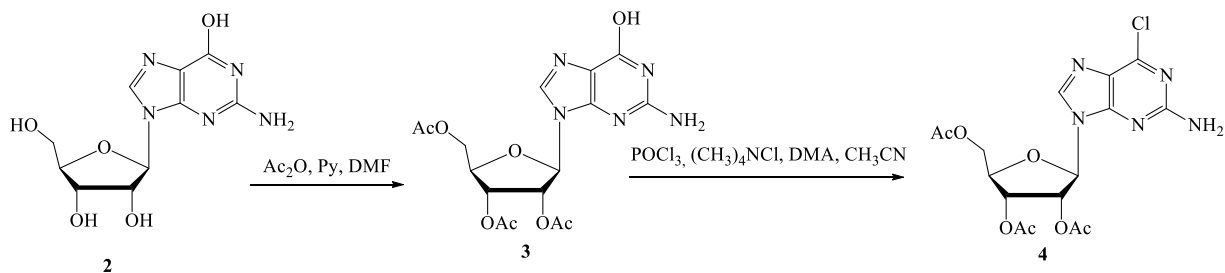


Схема 10 – Синтез 2-амино-6-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)пурина

Введение атома хлора во второе положение гетероциклического основания нуклеозида **3** осуществлялось с применением реакции диазотирования 2-NH₂ группы гуанозина (Схема 11). В литературе описан метод получения 2,6-дихлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)пурина с использованием треххлористой сурьмы [219, 220]. Несмотря на высокий выход, недостаток описанного способа заключается в применении треххлористой сурьмы, обладающей токсичными и сильными коррозионными свойствами. Другой метод – диазотирование в концентрированном растворе соляной кислоты [161] – давал невысокий выход 44%. Модифицированный метод диазотирования 2-амино-6-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)пурина **3** трет-бутилнитритом (ТВН) в присутствии хлоргидрата пиридина и хлорокси фосфора POCl₃ позволяет получить желаемый продукт **1** с высоким выходом 75%.

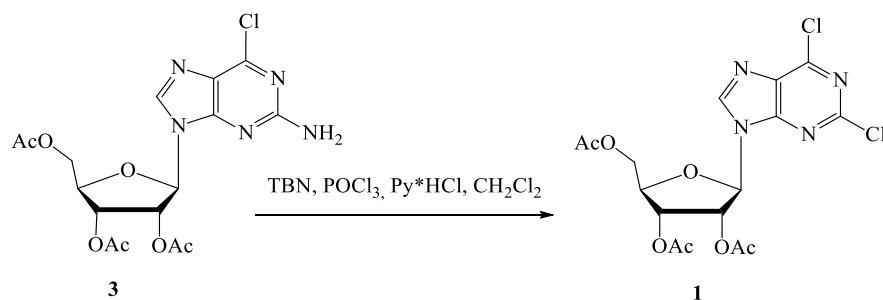


Схема 11 – Синтез 2,6-дихлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)пурина

В качестве заместителей по С6 положению пуринового гетероцикла были выбраны остатки природных *L*-аминокислот и их аналогов, которые вводили при помощи реакции нуклеофильного замещения. Даже α-аминогруппа аминокислот, обладающая слабой

нуклеофильностью, способна вступать в реакции нуклеофильного замещения с хлорпуринами [68, 70]. Нуклеофильное замещение протекает исключительно по шестому положению пуринового цикла, не затрагивая второе, как отмечалось и в работах [171, 175].

Нуклеофильная компонента выбиралась с учетом природы бокового радикала аминокислоты. Были взяты как алифатические, так и ароматические, полярные и неполярные аминокислоты. Опыты по синтезу цистеинового производного осложнялись высокой лабильностью и реакционной способностью свободной тиольной группы, поэтому для синтеза был взят соответствующий тиометилловый эфир (гидрохлорид метилового эфира S-метилцистеина).

Также для планируемого изучения агонистической активности по отношению к аденозиновым рецепторам использовались производные бета-аланина и аминокислот, как линейной структуры (этанолламин, бутанолламин, гексанолламин), так и разветвленной (бета-аминоизобутиловый спирт), а также аминокислот, являющихся восстановленными формами аминокислот (аланинол, валинол, серинол), и их аналогов (циклогексилаланинол). Дополнительно был запланирован синтез известного агониста аденозиновых рецепторов типа A_1 – 2-хлор- N^6 -циклопентил аденозина (ССРА) [221].

Для конъюгирования с нуклеозидной компонентой использовались коммерчески доступные гидрохлориды метиловых эфиров аминокислот, хорошо растворимые в органических растворителях. Реакция проводилась в присутствии триэтиламина в качестве основания для увеличения нуклеофильности аминокислоты, а также для связывания HCl, образующегося в ходе реакции.

Исследовались условия проведения реакции нуклеофильного замещения в различных растворителях (ДМФА, ацетонитрил, диоксан, ТГФ). В ДМФА быстрее растворялись компоненты реакционных смесей, и сама реакция протекала быстрее. Однако, при удалении из реакционной смеси более высококипящего ДМФА наблюдалась рацемизация *L*-аминокислот (по данным LC-MS), поэтому предпочтение было отдано ацетонитрилу.

Была синтезирована серия нуклеозидов 2-хлораденозина с остатками хиральных аминокислот, аминокислот и их аналогов в S_6 положении гетероциклического основания (Схема 12, Таблица 1).

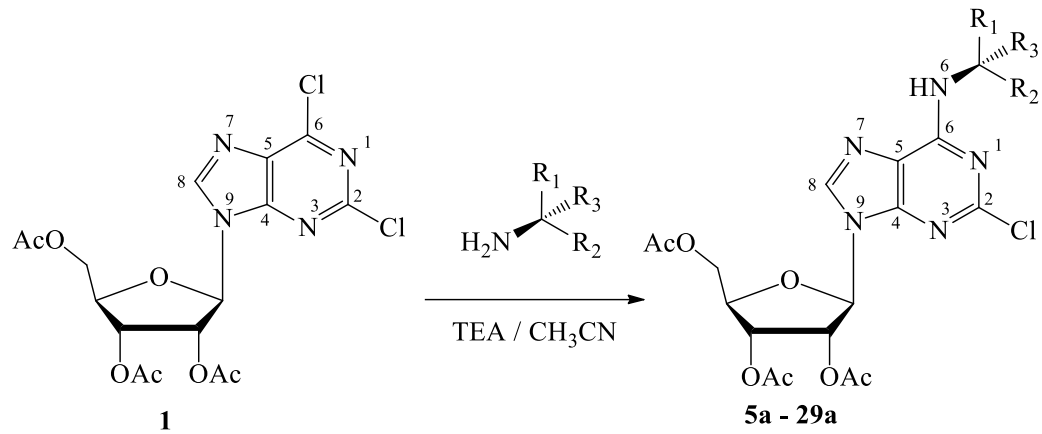


Схема 12 – Общая схема синтеза рибозидов **5a–29a**: нуклеофильное замещение в цикле

Реакции протекали быстро и селективно. По данным ЯМР, не было обнаружено побочных продуктов замещения хлора в С2 положении пуринового гетероцикла, а также побочных продуктов нуклеофильного замещения по боковым гидроксигруппам аминокислот серина, треонина или аминок спиртов. В случае образования *D*-аминокислотных производных по данным LC-MS наблюдались бы два близкостоящих пика *L*- и *D*-энантиомеров одинаковой массы, но такого зафиксировано не было. Данный способ удобен для получения аминокислотных и аминок спиртовых аналогов аденозина с хорошими выходами (Таблица 1).

Таблица 1 – Первый этап синтеза: нуклеофильное замещение в цикле

Соед.	Заместитель при С6 положении	R ₁	R ₂	R ₃	Выход после выделения, %
5a	Gly	H	COOCH ₃	H	95
6a	<i>L</i> -Ala	CH ₃			90
7a	<i>L</i> -Val	CH(CH ₃)CH ₃			89
8a	<i>L</i> -Leu	CH ₂ CH(CH ₃) ₂			79
9a	<i>L</i> -Ile	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃			98
10a	<i>L</i> -Ser	CH ₂ OH			95
11a	<i>L</i> -Thr	CH(OH)CH ₃			96
12a	<i>L</i> -Met	CH ₂ CH ₂ SCH ₃			86
13a	<i>L</i> -SMe-Cys	CH ₂ SCH ₃			83
14a	<i>L</i> -Phe	CH ₂ C ₆ H ₅			49
15a	<i>L</i> -Tyr	CH ₂ C ₆ H ₄ OH			97
16a	<i>L</i> -Trp	CH ₂ (β-индолил)			90
17a	<i>L</i> -Lys	(CH ₂) ₄ NH ₂			60
18a	Этаноламин	CH ₂ OH			H
19a	Бутаноламин	(CH ₂) ₃ OH	96		
20a	Гексаноламин	(CH ₂) ₅ OH	63		
21a	β-Ala	CH ₂ COOCH ₃	88		
22a	N ^ε - <i>L</i> -Lys	(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)COOCH ₃ (<i>S</i>)	87		

23a	<i>D</i> -Ser	COOCH ₃	CH ₂ OH		94
24a	<i>S</i> -Аланинол	CH ₃			70
25a	<i>S</i> -Валинол	CH(CH ₃) ₂			98
26a	Циклогексил- <i>S</i> -аланинол	CH ₂ C ₆ H ₁₁			95
27a	Серинол	CH ₂ OH			96
28a	ССРА	(CH ₂ CH ₂) ₂			95
29a	β-NH ₂ -изобутиловый спирт	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	67

При использовании гидрохлорида метилового эфира лизина вследствие высокой нуклеофильности ε-аминогруппы лизина получался преимущественно N^ε-замещенный продукт **22a** с высоким выходом, а также небольшое количество N^α,N^ε-дизамещенного производного **22a-bis** (Схема 13). Чтобы предотвратить вступление более нуклеофильной ε-аминогруппы *L*-лизина в реакцию нуклеофильного замещения, было взято его NH^ε-Вос защищенное производное. Реакция прошла селективно по α-аминогруппе с получением соединения **17a-Вос**. Вос-защиту затем снимали в мягких условиях по стандартной методике (трифторуксусная кислота, хлористый метилен) без расщепления гликозидной связи. Указан суммарный по двум стадиям выход нуклеозида **17a** (Таблица 1).

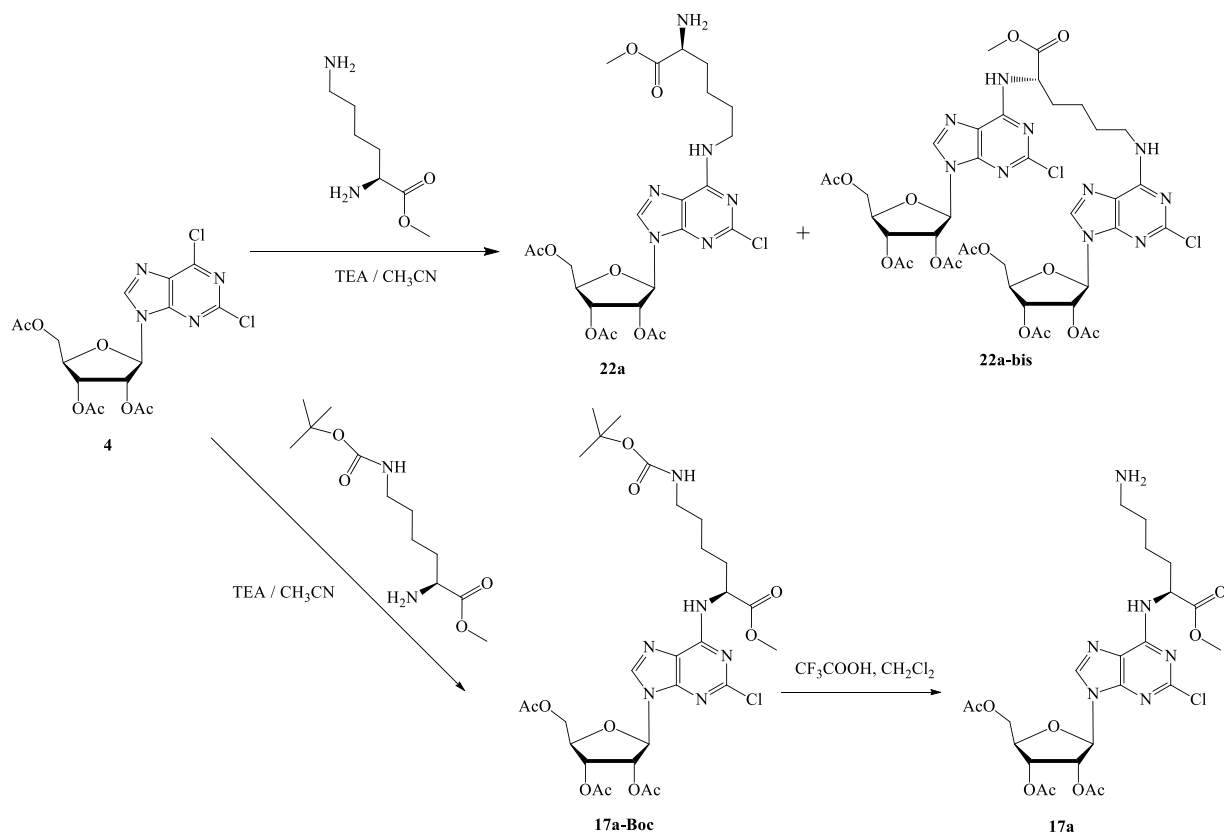


Схема 13 – Синтез производных лизина

2.1.2. Получение аналогов 2-хлораденозина: аммонолиз ацетильных защит

Для удаления ацетильных защит с остатка рибозы и аммонолиза метиловых эфиров аминокислот полученные триацетаты рибозидов **5a–29a** обрабатывали насыщенным раствором аммиака в метаноле при пониженной температуре (4 °C) (Схема 14), получая соответствующие нуклеозиды **5b–29b** (Таблица 2).

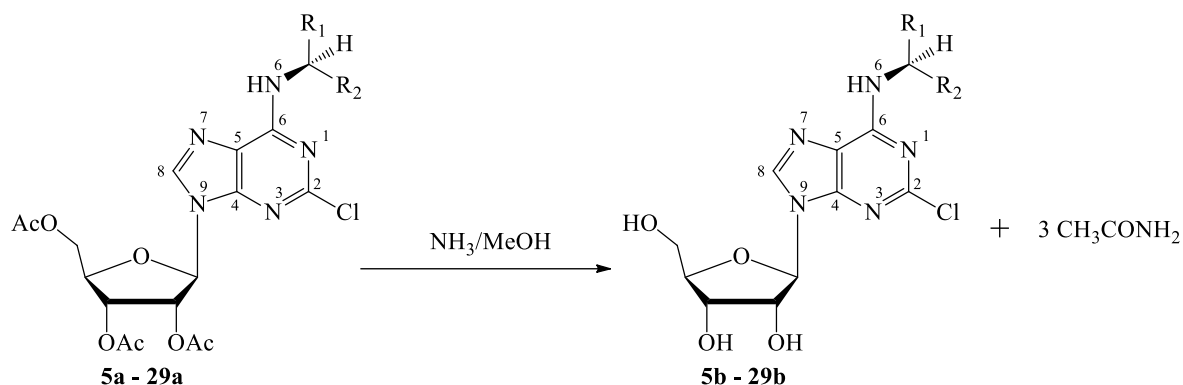


Схема 14 – Второй этап синтеза: аммонолиз ацетильных защит

Таблица 2 – Второй этап синтеза: аммонолиз ацетильных защит

Соединение	Заместитель при С6 положении	R ₁	R ₂	R ₃	Выход после выделения, %		
5b	Gly	H	CONH ₂	H	95		
6b	<i>L</i> -Ala	CH ₃			93		
7b	<i>L</i> -Val	CH(CH ₃)CH ₃			90		
8b	<i>L</i> -Leu	CH ₂ CH(CH ₃) ₂			90		
9b	<i>L</i> -Ile	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃			8		
10b	<i>L</i> -Ser	CH ₂ OH			83		
11b	<i>L</i> -Thr	CH(OH)CH ₃			93		
12b	<i>L</i> -Met	CH ₂ CH ₂ SCH ₃			93		
13b	<i>L</i> -S-Me-Cys	CH ₂ SCH ₃			80		
14b	<i>L</i> -Phe	CH ₂ C ₆ H ₅			66		
15b	<i>L</i> -Tyr	CH ₂ C ₆ H ₄ OH			94		
16b	<i>L</i> -Trp	CH ₂ (β-индолил)			71		
17b	<i>L</i> -Lys	(CH ₂) ₄ NH ₂			53		
18b	Этаноламин	CH ₂ OH			H		53
19b	Бутаноламин	(CH ₂) ₃ OH					87
20b	Гексаноламин	(CH ₂) ₅ OH					79
21b	β-Ala	CH ₂ COOCH ₃					96
22b	N ^ε -Lys	(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)CONH ₂ (<i>S</i>)	89				
23b	<i>D</i> -Ser	CONH ₂	CH ₂ OH				90
24b	<i>S</i> -Аланинол	CH ₃			95		
25b	<i>S</i> -Валинол	CH(CH ₃) ₂			49		
26b	Циклогексил- <i>S</i> -аланинол	CH ₂ C ₆ H ₁₁			82		
27b	Серинол	CH ₂ OH			93		

28b	ССРА	$(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$			63
29b	β -NH ₂ - изобутиловый спирт	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	84

В некоторых случаях происходило неполное образование амида аминокислоты, и в реакционной смеси оставался метиловый эфир, например в случае аммонолиза производных изолейцина **9a**, триптофана **16a** и лизина **17a** (данные LC-MS). При подборе условий (время реакции, температура) удавалось добиться более высокого содержания амида в реакционной смеси. Если при выделении амида возможно было выделить метиловый эфир с чистотой достаточной для характеристики методом ЯМР, это вещество также описывалось.

В зависимости от растворимости в воде или хлороформе и хроматографической подвижности продукты выделяли из реакционных смесей колоночной хроматографией на силикагеле или обращенной фазе, или избавлялись от получающегося ацетамида многократной промывкой хлороформом с последующим декантированием раствора, содержащего ацетамид. Проводить кристаллизацию рибозидов **5b–29b** оказалось нецелесообразно. На примере *L*-серинового рибозида **10b** было обнаружено, что во время растворения и нагревания в воде (> 70 °C) образовывалось *D*-сериновое производное (обнаружено по данным LC-MS). При этом *D*-сериновый нуклеозид **23b**, обладающий худшей растворимостью в воде, выпадал в осадок, оставляя в маточном растворе *L*-производное. Однако при нагревании при температуре ниже 50 °C рацемизации не происходило.

Интересно отметить, что несмотря на щадящие условия выделения, в случае *S*-метил *L*-цистеинового продукта **13b** все равно отмечалось образование *D*-изомера на уровне 7% после упаривания целевых фракций с колоночной хроматографии.

Методом нуклеофильного замещения был синтезирован ряд аналогов 2-хлор-N⁶-замещенного аденозина, являющихся новым типом конъюгатов аминокислот и их производных с пуриновым нуклеозидом, Синтез протекал быстро, селективно и без образования побочных продуктов (по данным ЯМР, не обнаружено C6-кислородзамещенных производных, а также C2-замещенных производных). В случае лизина, нуклеофильное замещение происходило по обеим аминогруппам, поэтому для получения α -производного использовали ϵ -Вос-защищенный лизин. Соединения высокой чистоты синтезированы с хорошими выходами.

Интересно отметить, что в спектрах ЯМР полученных 2-хлор-N⁶-замещенных производных аденозина была обнаружена вторая форма на уровне 11–33% от основной.

Вещества были гомогенны по данным ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Это необычное явление более подробно описано в разделе «Изучение аномалии в спектрах ЯМР аналогов аденозина», стр. 92. Там же приведена теория возникновения второй формы и описаны подтверждающие ее эксперименты.

2.1.3. Определение цитотоксической активности аналогов аденозина *in vitro*

Были изучены токсикологические характеристики веществ. Исследования проводились на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета под руководством академика РАН, д.м.н., профессора А.А. Спасова. Эксперименты выполнялись старшим лаборантом кафедры фармакологии и биоинформатики М.С. Пшеничниковой под руководством доктора медицинских наук, доцента Д.С. Яковлева.

В результате изучения цитотоксичности соединений в МТТ-тесте на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) была рассчитана величина LC₅₀ (концентрация, летальная для 50% клеток) (Таблица 3).

Таблица 3 – Цитотоксическое действие тестируемых соединений в тесте МТТ на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2)

Соединение	Заместитель при С6	LC ₅₀ , мкМ
7b	<i>L</i> -Val	196.3
8b	<i>L</i> -Leu	>>100
10b	<i>L</i> -Ser	304.4
11b	<i>L</i> -Thr	>>100
13b	<i>L</i> -SMeCys	>>100
15b	<i>L</i> -Tyr	19.7
17b	<i>L</i> -Lys	>>100
18b	Этаноламин	>>100
19b	Бутаноламин	>>100
20b	гексаноламин	>>100
21b	β -Ala	>>100
24b	<i>S</i> -Аланинол	>>100
27b	Серинол	>>100
28b	ССРА	>>100
29b	β -NH ₂ -изобутиловый спирт	114.4
2-хлораденозин 30		0.2
Аденозин		>1000
Доксорубицин (положительный контроль)		43.67±2.73

В результате исследований было установлено, что цитотоксическое действие для всех изученных соединений, включая вещество сравнения ССРА **28b**, было выше максимальной изученной концентрации (LC₅₀>>100 мкмоль/л) а для производных **15b** и **29b** LC₅₀ составляла 19.7 и 114.4 мкМ, соответственно.

Значение LC₅₀ для аденозина превышало 1000 мкМ и находилось за пределами максимальных исследованных концентраций. При этом ввиду отсутствия значимого

влияния на жизнедеятельность клеток в максимальной исследованной концентрации 100 мкМ величину LC_{50} для веществ установить не удалось.

Цитотоксическая активность полученных рибозидов была также исследована О.С. Жуковой в лаборатории клеточного иммунитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ под руководством д.м.н., профессора М.В. Киселевского. Была изучена цитотоксическая активность на линии клеток рака толстой кишки человека LS174Т.

Для исследования выбрали четыре синтезированных модифицированных нуклеозида. Отбор проводили на основе ранее полученных данных об цитотоксичности соответствующих арабинозидов [201]. По этим данным, соединение с *L*-серинем показало дозозависимый цитотоксический эффект *in vitro* на опухолевых клетках линии Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (MOLT-4) и гистиоцитарной лимфомы (U937) [201].

В исследование цитотоксической активности были включены 2-хлораденозины, содержащие остатками аминокислот глицина **5b**, *L*-серина **10b**, *L*-треонина **11b** и *L*-тирозина **15b** по С6 положению пурина. Соединение считали активным, если его концентрация, вызывающая ингибирование роста клеток на 50% ($ИК_{50}$), была меньше или равна 100 мкМ. Максимально допустимая концентрация тестируемых соединений не превышала 100 мкМ. Результаты проведенных испытаний на клетках линии LS174Т (Таблица 4) показали, что соединения можно оценить как неактивные, так как значение IC_{50} для всех соединений близко или превышает 100 мкМ.

Таблица 4 – Исследование цитотоксичности модифицированных рибонуклеозидов на линии клеток LS174Т в концентрации 100 мкМ

Модифицированный рибонуклеозид	Остаток аминокислоты при С6-положении	Выживаемость клеток, %
5b	Gly	99.9
10b	<i>L</i> -Ser	100.1
11b	<i>L</i> -Thr	88.9
15b	<i>L</i> -Tyr	100.0

Установлено, что все изученные вещества не оказывают существенного влияния на показатели жизнедеятельности клеток линии HepG2 во всем диапазоне изученных концентраций 0.01 мкмоль/л-100 мкмоль/л. Полученные рибозиды обладают никакой токсичностью для клеток HepG2 и LS174Т, что позволяет проводить дальнейшие фармакологические исследования.

Токсикологические свойства исследуемых соединений делают их ценными объектами для исследований рецепторной активности аденозиновых рецепторов.

2.1.4. Изучение рецепторной активности аналогов аденозина *in vitro* на валидированной экспериментальной модели A₁ аденозиновых рецепторов

Поскольку аналоги аденозина могут выступать как селективные агонисты или антагонисты аденозиновых рецепторов различных типов, ряд соединений был передан на исследование агонистической активности по отношению к A₁AR. Полученные нуклеозиды являются структурными аналогами известного агониста A₁AR 2-хлораденозина **30** [222], который также был добавлен в исследование. Гуанозин был добавлен в исследование как известный слабый агонист AR [223]. Для исследования селективности модели *in vitro* были также оценены некоторые из 2,6-дизамещенных пуриновых нуклеозидов: 6-метоксигуанозин **31**, неларабин (2-амино-9-β-D-арабинофуранозил-6-метоксипуриин) **32** и 2-амино-6-хлор-9-β-D-рибофуранозилпуриин **33** (Рисунок 26). Исследования проводились на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета под руководством академика РАН, д.м.н., профессора А.А. Спасова. Эксперименты выполнялись старшим лаборантом кафедры фармакологии и биоинформатики М.С. Пшеничниковой М.С. под руководством доктора медицинских наук, доцента Д.С. Яковлева на валидированной экспериментальной модели A₁AR-зависимого изменения ритма сокращений изолированных предсердий мышей *in vitro* [224].

На первом этапе биологических экспериментов активность синтезированных соединений как агонистов A₁AR оценивали по снижению скорости сокращения изолированных предсердий мыши. После определения ведущих соединений нужно было подтвердить, что эффект зависит от A₁AR, путем добавления селективного антагониста A₁AR, 8-циклопентил-1,3-дипропилксантина (DPCPX, Рисунок 8).

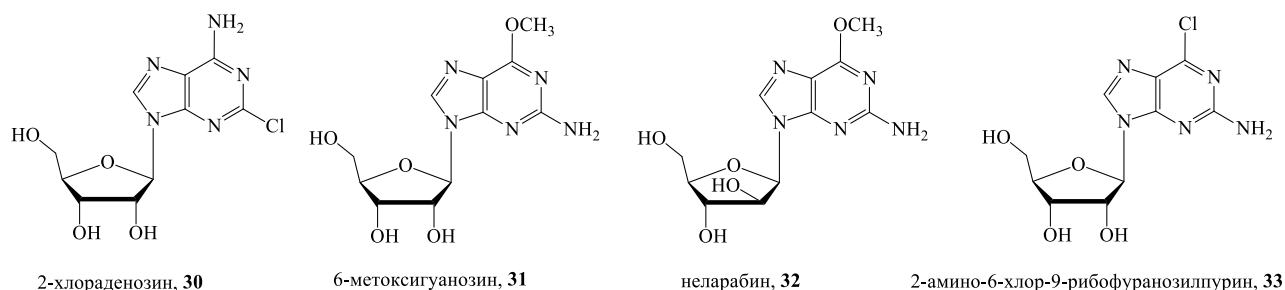


Рисунок 26 – Нуклеозиды, добавленные в биологические испытания в качестве контроля для проверки модели: известный агонист A₁AR **30** и аналоги гуанозина **31–33**

В тканях предсердия с высокой плотностью экспрессированы A_1AR . Ткани предсердия сохраняют способность к функциональной A_1AR -зависимой хронотропной реакции не менее 2.5–4 ч при жизнеобеспечении в аппарате для изолированных тканей. На первом этапе исследования в кювету, содержащую препарат предсердия, вводили аденозин или тестируемые соединения в концентрации 10 мкМ. Наблюдалось изменение хронотропизма изолированных предсердий, работающих в собственном ритме (без стимуляции). Уменьшение частоты сокращения предсердий характерно для стимуляции A_1AR (Таблица 5). Влияние исследуемых соединений проводилось в две серии независимых опытов. Значения для препарата сравнения (аденозина) находились в пределах статистического отклонения, а новые соединения оценивались в сравнении с аденозином. Полученные данные требовали дальнейшего уточнения в дозозависимом исследовании с расчетом pEC_{50} .

Таблица 5 – Влияние тестируемых соединений на хронотропизм изолированных предсердий мыши в концентрации 10 мкМ ($M \pm SEM$) в двух сериях проведенных исследований

Соед.	МНН*/нуклеозид или заместитель при С6	Изменение хронотропизма, %	Соед.	МНН*/нуклеозид или заместитель при С6	Изменение хронотропизма, %
Серия 1			Серия 2		
30	2-хлораденозин	84.5±1.41	18b	Этаноламин	95.6±4.1
24b	<i>S</i> -Аланинол	83.1±3.65	27b	Серинол	95.2±4.4
29b	β -NH ₂ - изобутиловый спирт	73.2±6.25	28b	ССРА	94.9±3.2
	Аденозин	64.7±2.66	30	2-хлораденозин	86.9±3.2
10b	<i>L</i> -Ser	37.4±13.25	19b	Бутаноламин	69.0±13.2
7b	<i>L</i> -Val	32.4±6.96	29b	β -Ala	59.5±6.5
31	6-О-метилгуанозин	31.6±2.75	20b	Гексаноламин	53.6±6.6
15b	<i>L</i> -Тур	22.0±4.34	17b	<i>L</i> -Lys	48.6±6.7
23b	<i>D</i> -Ser	17.8±3.12		Аденозин	46.4±6.8
5b	Gly	15.9±2.21	13b	<i>L</i> -SMeCys	46.0±4.2
12b	<i>L</i> -Met	14.9±2.68	8b	<i>L</i> -Leu	25.0±5.0
33	2-амино-6-хлор-9- β - <i>D</i> - рибофуранозилпурин	10.6±4.11	11b	<i>L</i> -Thr	16.1±3.5
6b	<i>L</i> -Ala	7.8±4.91			
22b	N ^ε -Lys	6.4±2.06			
32	Неларабин	3.4±1.89			
	Гуанозин	2.4±1.45			

*МНН – международное непатентованное название для препаратов

Производные бета-аланина **29b** и *L*-лизина **17b** оказывали относительно слабое стимулирующее влияние на аденозиновые A_1 рецепторы. A_1AR -стимулирующая активность других производных амидов аминокислот была заметно ниже и не превышала активность аденозина.

Известные агонисты аденозиновых рецепторов ССРА **28b** и 2-хлораденозин **30** проявили высокую стимулирующую способность, значительно превышающую таковую для аденозина. Результаты изучения стимулирующей A_1AR активности 2-хлораденозина **30** коррелируют с известными данными [52]. Для гуанозина и его производных **3**, **31–33** стимулирующая A_1AR активность была значительно ниже, чем у производных аденозина, что подтверждает адекватность модели, использованной в исследованиях.

Для производных восстановленных аналогов аминокислот – аминоспиртов этаноламина **18b** (восстановленная форма глицина) и серинола **27b** (восстановленная форма серина) показана значительная стимулирующая аденозиновые рецепторы типа A_1 активность, превосходящая даже активность известного агониста A_1 ССРА **28b**. С увеличением длины неразветвленной цепи аминоспиртового заместителя (этанол **18b** – бутанол **19b** – гексанол **20b**) отмечается снижение активности, однако она все еще превосходит активность аденозина.

Можно сделать вывод, что введение в молекулу аденозина аминоспиртового заместителя увеличивало активность, причем производные представителей восстановленных форм аминокислот, обладающие высокой гидрофильностью, оказались лучшими агонистами аденозиновых рецепторов типа A_1 , чем известные агонисты, а активность аланинового производного была несколько ниже, чем активность ССРА.

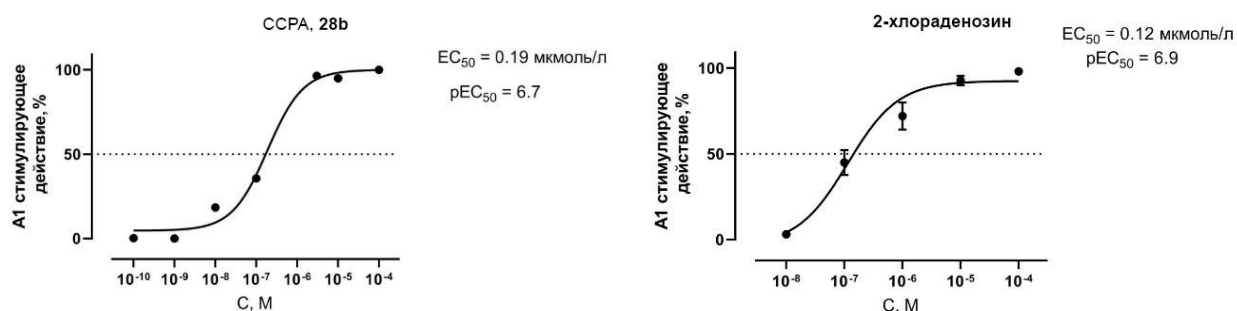
Учитывая косвенный характер применяемой тест-системы (изменение A_1AR -опосредованного изменения хронотропного эффекта изолированных предсердий мыши) для подтверждения механизма действия наиболее активных соединений было изучено взаимодействие соединений с A_1 антагонистом DPCPX. На втором этапе исследования было обеспечено подтверждение стимулирующей активности A_1AR для активных веществ. Проводили предварительное введение в кювету селективного антагониста A_1AR DPCPX в концентрации 0.1 мкМ. После трехминутной инкубации добавляли аденозин или испытуемые соединения в концентрации 10 мкМ. Оценивали изменения хронотропизма изолированных препаратов предсердий мышей, работающих в собственном ритме (без стимуляции) (Таблица 6). Стимулирующая A_1AR активность веществ заметно уменьшалась или пропадала. Это свидетельствует о том, что исследуемые вещества проявляли свойства агонистов A_1AR . Стимулирующее A_1AR действие, которое проявляет

2-хлораденозин **30** в присутствии DPSPX, снижается на 98.2%, а для аденозина эта величина составляет 95.0%. Из данного тестирования видно, что антагонист аденозиновых A₁ рецепторов DPSPX подавляет активность соединений **27b** и **18b** на 81.9% и 68.8%, соответственно.

Таблица 6 – Влияние исследуемых соединений в концентрации 10 мкМ на хронотропизм изолированных предсердий мыши при предварительном введении антагониста A₁AR DPSPX (0.1 мкМ)

Соединение	Нуклеозид или заместитель при С6	Изменение хронотропизма, %
7b	<i>L</i> -Val	3.1
10b	<i>L</i> -Ser	2.6
15b	<i>L</i> -Tyr	0.8
30	2-хлораденозин	1.8
31	6-метилгуанозин	4.7
	Аденозин	5.0±1.04
24b	<i>S</i> -Аланинол	5.2±0.45
29b	β-NH ₂ -изобутиловый спирт	3.5±1.23
27b	Серинол	18.17±0.09
18b	Этаноламин	31.19±9.69

По результатам проведённого скрининга были выявлены наиболее активные соединения: производные аланинола **24b**, β-аминоизобутилового спирта **29b**, серинола **27b** и этаноламина **18b**. Для данных соединений и веществ сравнения (хлораденозин **30**, ССРА **28b**, аденозин) было проведено дозозависимое исследование активности в концентрациях 0.0001 мкмоль/л – 10 мкмоль/л. Полученные данные представлены ниже (Рисунок 27, Рисунок 28, Таблица 7).



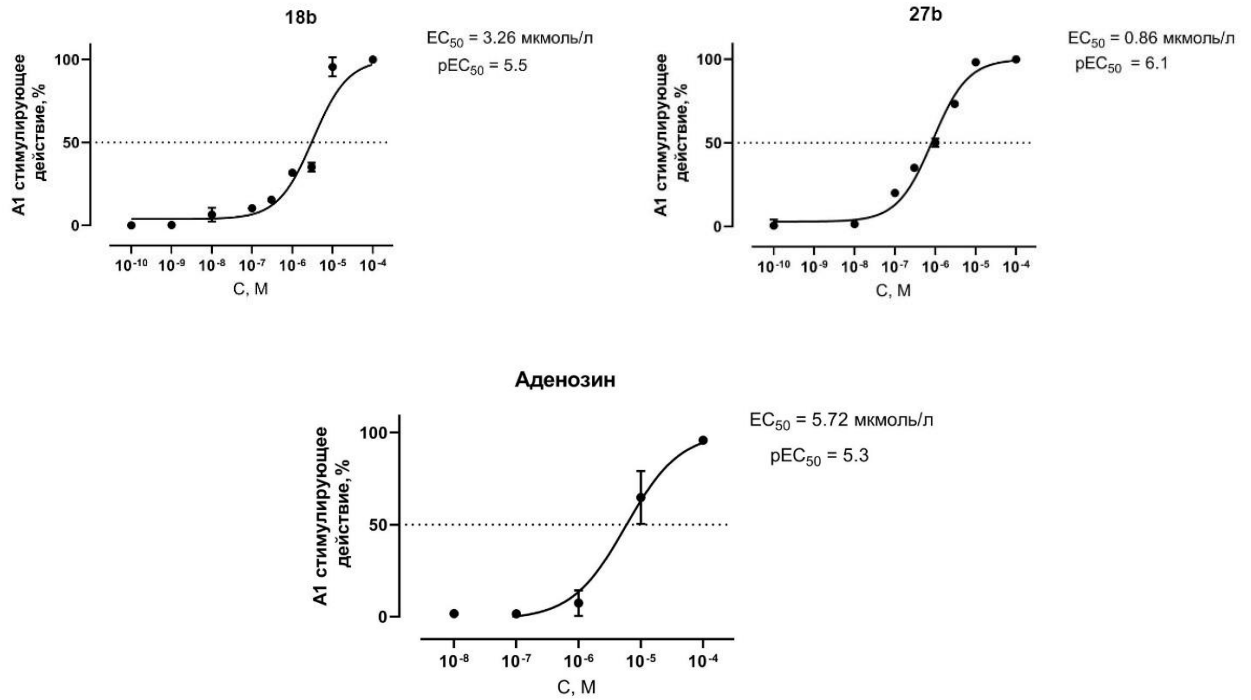


Рисунок 27 – Серия опытов 1. Влияние соединений ССРА, 2-хлораденозина **30** и аденозина, а также исследуемых соединений **30**, **18b** и **27b** на хронотропизм предсердий мыши (A_1AR -опосредованная стимулирующая активность) в диапазоне концентраций 100–0.01 мкМ.

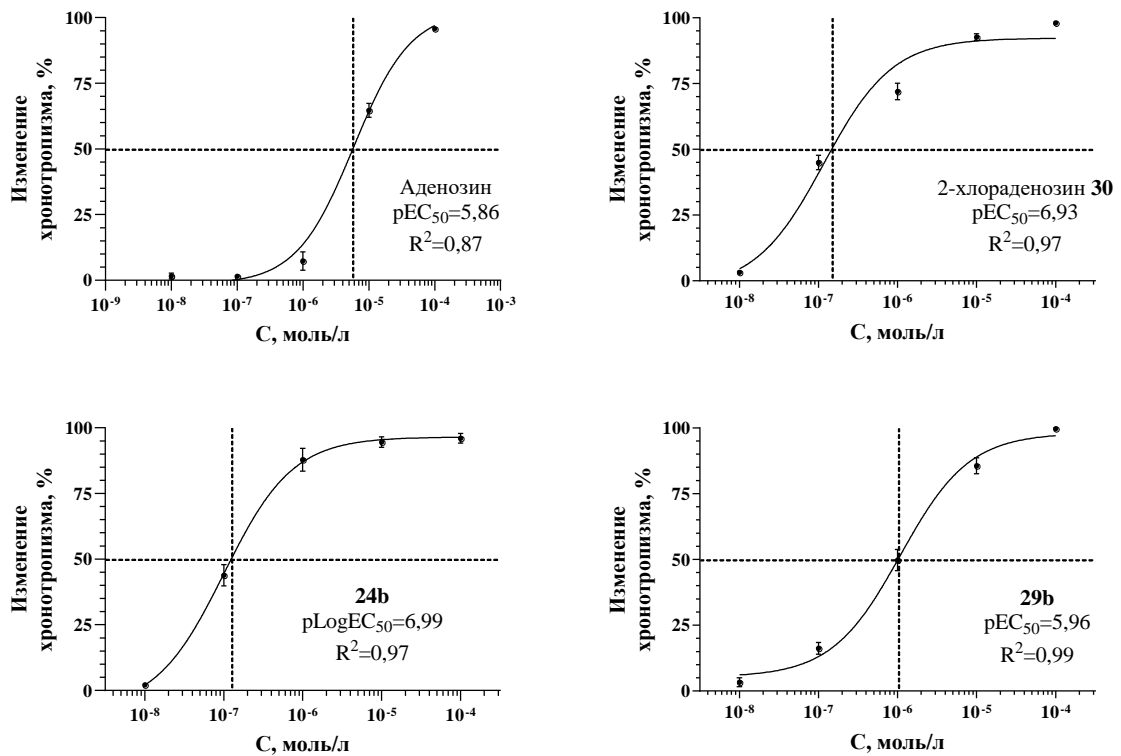


Рисунок 28 – Серия опытов 2. Влияние соединений 2-хлораденозина и аденозина, а также исследуемых соединений **24b** и **29b** на хронотропизм предсердий мыши (A_1AR -опосредованная стимулирующая активность) в диапазоне концентраций 100–0.01 мкМ.

Таблица 7 – Средняя эффективная концентрация (EC_{50}) и ее отрицательная логарифмированная величина (pEC_{50}) A_1 -стимулирующего действия наиболее активных соединений, тестируемых в концентрациях 0.0001 мкмоль/л – 10 мкмоль/л. Данные веществ, полученные в обеих сериях опытов, приведены через косую черту

Соединение (заместитель при С6)	EC_{50} , мкмоль/л	pEC_{50}
24b (<i>S</i> -аланинол)	0.10	6.99
30 (2-хлораденозин)	0.12 / 0.11	6.90 / 6.93
28b (ССРА)	0.19	6.70
27b (серинол)	0.86	6.10
29b (β - NH_2 -изобутиловый спирт)	1.10	5.96
18b (этаноламин)	3.26	5.50
Аденозин	5.72 / 1.38	5.30 / 5.86

Наибольшую рецепторную активность среди изученных соединений проявляют соединения **27b** и **18b**. По величине EC_{50} исследованные соединения и вещества сравнения располагаются в следующем порядке: **24b** \approx 2-хлораденозин **30** \approx ССРА **28b** $>$ **27b** \approx **29b** $>$ **18b** $>$ аденозин. Механизм стимулирующего A_1AR действия веществ был подтвержден в опытах с воздействием на предсердия антагониста A_1 аденозиновых рецепторов DPCPX.

В результате комплекса проведенных экспериментальных работ была получена серия замещенных по N^6 -положению аналогов 2-хлораденозина, содержащих в структуре амиды хиральных аминокислот и аминокислоты, являющиеся или не являющиеся восстановленными формами аминокислот. Полученные соединения обладают низкой цитотоксичностью для клеток HepG2 и LS174T и являются частичными агонистами аденозиновых рецепторов типа A_1 , причем активность нуклеозидов, имеющих в структуре восстановленные аналоги аминокислот аланина и серина, превосходит активность известного селективного агониста аденозиновых рецепторов типа A_1 ССРА или близка к ней, что было показано на валидированной модели изолированных предсердий мыши.

Полученные результаты выборочно опубликованы в статье Berzina M. Ya. et al. Synthesis of 2-chloropurine ribosides with chiral amino acid amides at C6 and their evaluation as A_1 adenosine receptor agonists //Bioorganic Chemistry. – 2022. – Т. 126. – С. 105878.

2.2. Химическая модификация пуринового основания: азид-алкиновое присоединение

Модифицированные пуриновые нуклеозиды представляют большой интерес в качестве флуорофоров и зондов-маяков. Известно, что 2-аминопурин является широко используемым флуорофором [135] (также см. 1.3 Флуоресцентные нуклеозиды, стр. 36), а триазолил-замещенные производные пуриновых нуклеозидов активно исследуются в качестве новых флуорофоров. Однако до сегодняшнего времени, насколько можно судить по вышедшей литературе, не было осуществлено синтеза соединений, сочетающих в себе две эти функциональные группы, а именно 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)замещенных пуриновых нуклеозидов, и исследования их флуоресцентных свойств.

Были оценены два варианта синтеза целевых соединений **35b**, **36b** (Схема 15). Первый путь включал в себя синтез триазолил-замещенных нуклеозидов **35a**, **36a** с применением триацетата рибонуклеозида соответствующего азида **34**, чья растворимость позволяла проводить реакцию в органических растворителях, и последующее снятие ацетильных защит. Второй путь синтеза основывался на предварительном снятии ацетильных защит с получением рибозида 2-амино-6-хлорпурина **33**, замещении атома хлора на азидную группу с получением соединения **38** и проведении клик-реакции в водном растворе. Однако при проведении пробных реакций содержание целевого продукта **36b** в реакционной смеси при использовании второго пути по данным LC-MS составляло всего 7%, а основным продуктом оказался продукт восстановления **38** – нуклеозид 2,6-диаминопурина **39**. Для синтеза был выбран первый вариант.

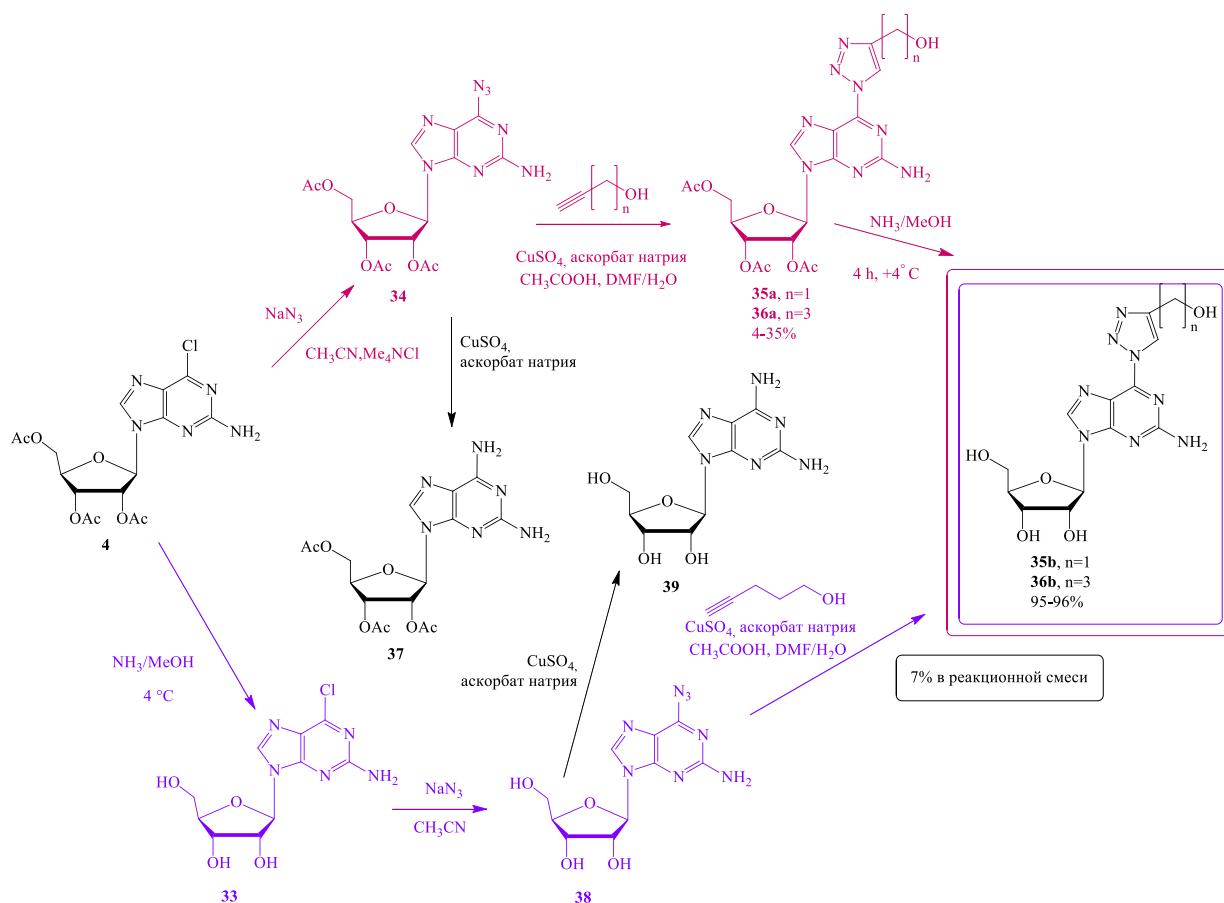


Схема 15 – Синтез 6-1,2,3-триазол-1-ил-замещенных производных пуринов

Для осуществления синтеза был использован полученный ранее в нашей лаборатории из природного гуанозина 2-амино-6-азидо-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)пуридин **34**, выступающий в роли азидной компоненты. В качестве алкильной компоненты использовались спирты с терминальной алкильной группой. Реакции азид-алкильного [3+2] циклоприсоединения проводились по ранее описанным методикам [69, 175] с учетом подбора подходящих растворителей для защищенного рибонуклеозида и алкильной компоненты.

Из литературных источников известно, что азидопуридин нестабилен на свету, при нагревании или в присутствии восстанавливающих реагентов [148, 151, 179], поэтому все реакции проводились при комнатной температуре с защитой реакционной смеси от света (в темной комнате или с укрытием реакционной колбы светонепроницаемыми материалами). Однако, присутствие в реакционной смеси аскорбата натрия и солей одновалентной меди, которые являются восстановителями, приводило к частичному восстановлению 6-азидной группы до аминной с образованием триацетата 2,6-диаминопуринрибонуклеозида **37** (данные LC-MS) (Таблица 8), причем с помощью

отдельно поставленных опытов было показано, что восстанавливающее действие одновалентной меди проявлялось сильнее.

Таблица 8 – Синтез 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2,3,5-три-*O*-ацетил- β -*D*-рибофуранозил)пуринов

Азид-алкиновое циклоприсоединение					Аммонолиз		
Соед.	Содержание 2,6-диамина 37 в реакционной смеси (данные ВЭЖХ), %	Содержание целевого продукта в реакционной смеси (данные ВЭЖХ), %	Выход после очистки, %	Чистота, %	Соед.	Выход после очистки, %	Чистота, %
35a	12.5	75.0	41.0	95.4	35b	87.0	93.6
36a	47.3	20.2	4.0	95.0	36b	96.7	95.0

При очистке защищенного нуклеозида **36a** оказалось, что его хроматографическая подвижность очень близка к 2,6-диамино-9-(2,3,5-три-*O*-ацетил- β -*D*-рибофуранозил)пурину **37**, присутствующему в реакционной смеси на уровне 40%, что затрудняло его выделение из реакционной смеси и приводило к низкому итоговому выходу (4%). В случае **35a** такой проблемы не было, реакция проходила быстрее, количество диамина было менее 15%, и продукт легко очищали при помощи колоночной хроматографии, получая целевой продукт с выходом более 40%.

Снятие ацетильных защит проводилось методом аммонолиза при обработке соединений **35a** и **36a** насыщенным аммиаком метанолом при пониженной температуре (Схема 15, первый путь). Интересно, что при этом не происходило замещения 1,2,3-триазольной группы, хотя ранее было описано, что в случае 2,6-бис-триазолилзамещенных пуринов *S*₆-триазолил является хорошей уходящей группой [146]. Целевые соединения **35b** и **36b** были выделены с высокими выходами (Таблица 8).

При оценке прохождения реакций методом ТСХ на пластинках Silufol (UV254) пятна визуализировали облучением ультрафиолетовым светом с длиной волны 254 нм. Зоны УФ-поглощения исходного триацетата 2-амино-6-азидо-пуринового рибозида и полученных соединений выглядели как слабо светящиеся пятна нежно-голубого цвета, что косвенно подтверждало наличие флуоресценции. Дальнейшее исследование флуоресценции этих соединений и соответствующих им 2'-дезоксирибонуклеозидов описано далее (Изучение фотофизических свойств триазолил-замещенных пуринов, стр. 89).

2.3. Ферментативный синтез новых аналогов аденозина из модифицированных аденинов при помощи реакции трансгликозилирования

Модификация различных биологически активных соединений путем введения в их структуру аминокислотных фрагментов является одним из важнейших подходов к достижению оптимальных фармакокинетических и фармакодинамических характеристик потенциальных лекарственных средств [225]. В последнее время значительный интерес вызвало изучение аминокислотсодержащих азотистых оснований как ингибиторов роста микобактерий; сообщалось, что некоторые соединения пурина с производными аминокислот обладают антибактериальными свойствами [226-229]. Некоторые производные пурина и 6-аминопурина проявляют высокую активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis* [61], хотя точный механизм антимикобактериальной активности производных пурина в настоящее время остается неизвестным. Было установлено, что N-(2-аминопурин-6-ил)аминокислоты и дипептиды, а также N-(пурин-6-ил)аминокислоты и дипептиды обладают антимикобактериальной активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis* [61]. Однако, замещенные пурины обладают крайне ограниченной растворимостью в воде, что ограничивает их биодоступность, поэтому такие соединения удобно использовать в форме рибозида. Наличие в молекуле гидрофильного рибозидного остатка положительно влияет на растворимость соединений в воде по сравнению с соответствующими гетероциклами, а также позволяет проводить ферментативный синтез новых нуклеозидов при высоких концентрациях исходных рибозидов. Известно, что пурииннуклеозидфосфорилаза *E. coli* способна гликозилировать не только природные, но и модифицированные углеводные остатки: арабинофуранозы [230-232], 2-дезоксидеокси-2-фтор-арабинозы [233], 2- и 3-дезоксидеоксирибозы [234, 235].

За основу была взята серия замещенных по С6 положению аминокислотами или дипептидами пуринов, которые ранее показали антимикробную активность [61]. Эти соединения были любезно предоставлены лабораторией асимметрического синтеза Института органического синтеза имени И.Я.Постовского Уральского отделения Российской академии наук под руководством д.х.н., профессора В. П. Краснова.

При помощи ферментативной реакции трансгликозилирования (Схема 16) проводили рибозилирование производных пурина и 2-аминопурина, содержащих при С6 положении остаток глицина в виде кислоты (**40-НС**) или амида (**42-НС**, **43-НС**), или дипептид глицил-глутаминовая кислота (**41-НС**).

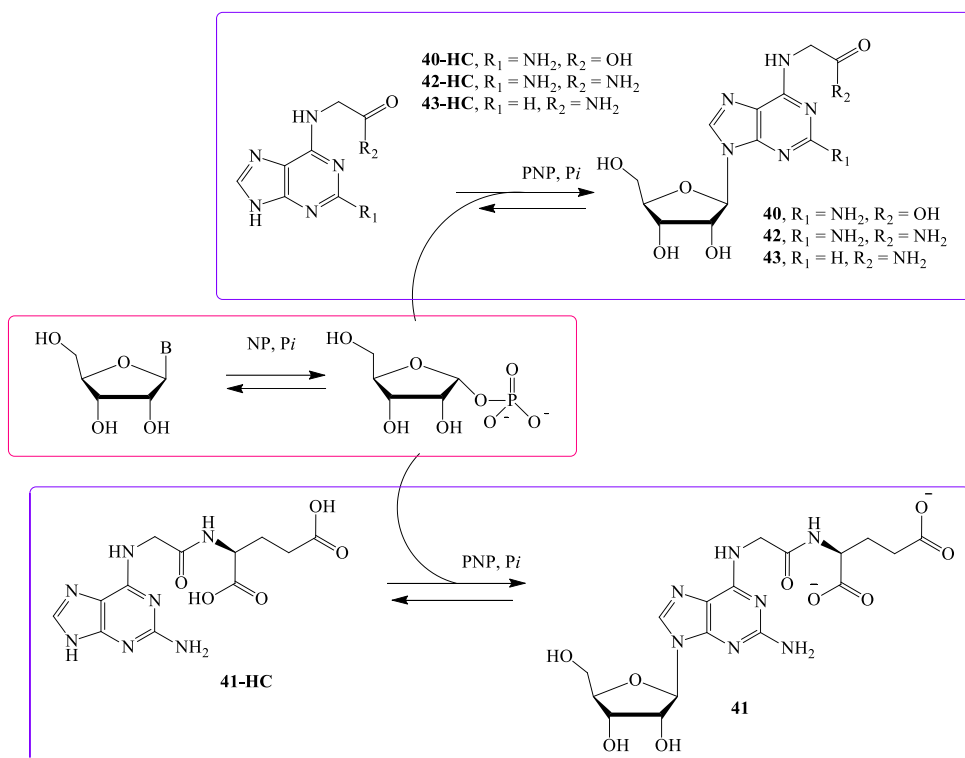


Схема 16 – Гликозилирование 6-замещенных пуринов

Процесс гликозилирования и фосфоролита гликозидной связи под действием нуклеозидфосфорилаз обратим. В связи с этим проводится тщательный подбор условий синтеза для смещения равновесия в сторону образования целевого гликозида. На это смещение влияют соотношение концентраций модифицированного нуклеозида и фосфата углеводного остатка, который образуется из донора углеводного остатка (природного нуклеозида) при фосфоролите. Поэтому в каждом случае необходим тщательный подбор соотношения донора углеводного остатка и модифицированного пурина, а также необходимо подобрать соотношение количества фермента (или ферментов, если донор – пиримидиновый нуклеозид) для достижения оптимальной скорости реакции трансгликозилирования. При использовании в реакции гетероциклов двух типов равновесие будет смещаться в зависимости от соотношения разных нуклеозидфосфорилаз, и реакция будет в большей мере регулироваться одной из них.

Оптимизация условий для ферментативного синтеза нуклеозидов осуществлялась по следующим параметрам. В общем виде алгоритм подбора условий реакции трансгликозилирования включал следующие шаги:

- проверка субстратной специфичности PNP по отношению к выбранному модифицированному пурину;
- выбор наилучшего донора рибозы;
- подбор оптимального соотношения реагентов;

- подбор оптимального соотношения и количества ферментов.

Сначала проводилась пробная реакция трансгликозилирования, целью которой было установить, является ли модифицированный пурин субстратом для PNP *E. coli*, а также определить условия аналитического определения продуктов реакции методом ВЭЖХ. Стандартные условия реакции: объем реакционной смеси – 1 мл, концентрация калий-фосфатного буфера (рН 7.0) – 2 мМ, концентрация модифицированного пурина – 1 мМ, концентрация уридина – 2 мМ, пуриинуклеозидфосфорилаза PNP и уридинфосфорилаза UP вводились в количестве 1.4 ед. акт. и 1.7 ед. акт., температура проведения реакции – 50 °С.

О прохождении реакции судили по появлению новых пиков на ВЭЖХ в подобранном в каждом отдельном случае изократическом режиме, где %В варьировался от 0 до 20%. Критерием приемлемости являлось разрешение пиков исходного пурина и его рибозида в отсутствие наложения пиков природного нуклеозида и его гетероциклического основания на пики модифицированного гетероцикла и соответствующего нуклеозида. В качестве донора углеводного остатка на этом этапе выбирали уридин. Пример хроматограммы для соединения **40** приведен на рисунке (Рисунок 29). Урацилу и уридину соответствуют пики с временами удержания 2.1 и 2.3 минуты, исходному гетероциклу – 3.2 минуты, рибозилированному продукту – 4.8 минуты.

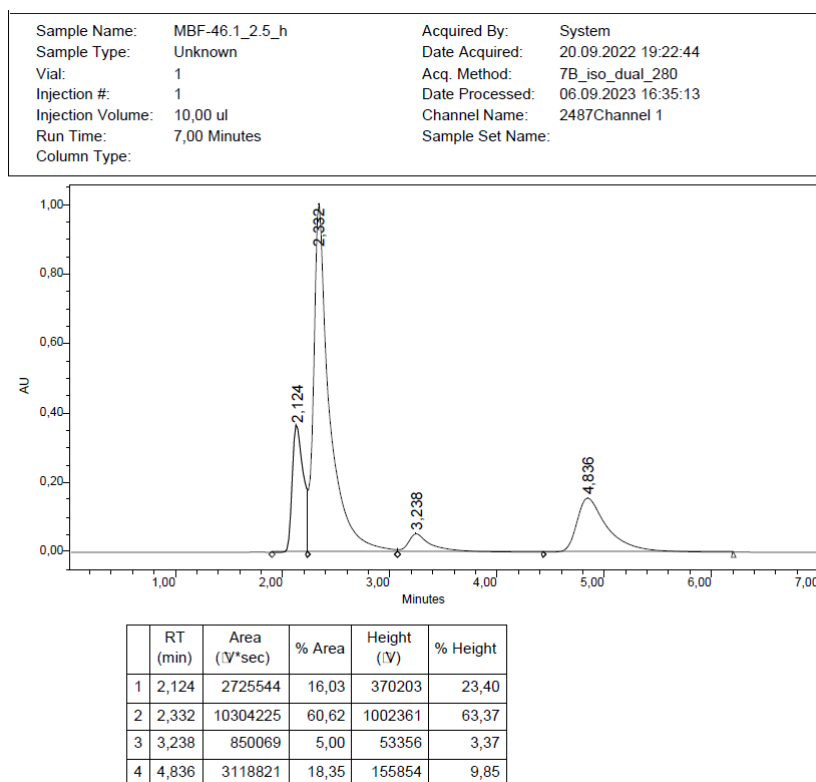


Рисунок 29 – Хроматограмма реакционной смеси синтеза рибонуклеозида **40**

На следующем этапе оптимизации условий синтеза проводился выбор донора углеводного остатка. Ферменты подвергают фосфорилизу разные типы доноров углеводного остатка с разной скоростью, и от этого зависит необходимая для успешного протекания реакции концентрация 1-альфа-фосфата углеводного остатка. В реакцию вводили коммерчески доступные пуриновые (аденозин Ado, инозин Ino и гуанозин Guo) и пиримидиновые (уридин Urd) нуклеозиды. Прохождение реакции оценивали по конверсии модифицированного основания в нуклеозид по данным ВЭЖХ, рассчитанной по формуле:

$$\text{конверсия} = \frac{\text{площадь пика нуклеозида}}{\text{площадь пика нуклеозида} + \text{площадь пика гетероциклического основания}} * 100\%.$$

Условия реакции для выбора наилучшего донора рибозы: объем реакционной смеси – 1 мл, концентрация калий-фосфатного буфера (pH 7.0) – 2 мМ, концентрация модифицированного пурина – 1 мМ, концентрация природного нуклеозида – 2 мМ, температура проведения реакции – 50 °С. При использовании в качестве донора углеводного остатка пуринового нуклеозида (Ado, Guo, Ino) вводили в реакцию только PNP в количестве 2.8 единиц активности. Если же в качестве донора использовали уридин, то в реакцию вводили два фермента: 1.4 единиц активности PNP и 1.7 единиц активности UP. Данные представлялись в виде графика зависимости конверсии от времени (Рисунок 30).

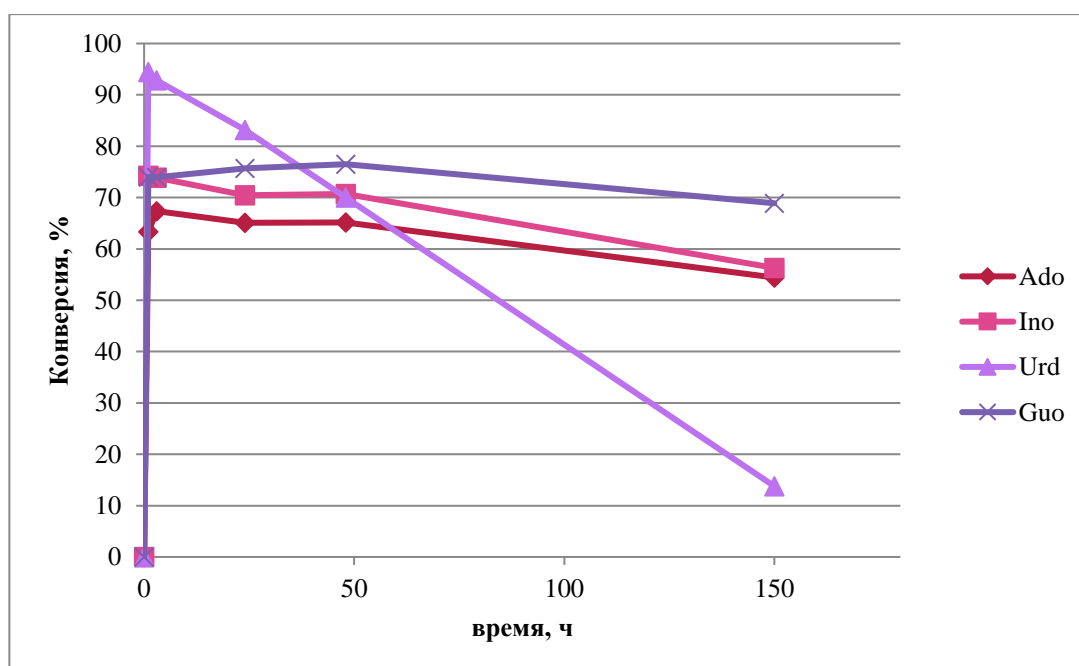


Рисунок 30 – Конверсия гетероциклического основания **40-НС** в рибонуклеозид в зависимости от донора остатка рибозы, синтез рибозида **40**

Максимальная конверсия в рибонуклеозид в первые часы с момента начала реакции при использовании в качестве донора рибозы уридина составляет 94%, тогда как при использовании других доноров, таких как аденозин, инозин или гуанозин, максимальная конверсия составила 63, 79, 53%, соответственно. В качестве донора остатка рибозы был выбран уридин, так как он показывал наибольшую конверсию в рибонуклеозид по сравнению с другими донорами углеводного остатка на третьем часу проведения реакции, хотя при его использовании через 150 часов происходит уменьшение количества продукта в реакционной смеси.

Третий этап – выбор оптимального соотношения природного нуклеозида, выступающего донором углеводного остатка, и модифицированного рибозида. Чем больше концентрация донора, тем сильнее смещение равновесия в сторону образования продукта, но ограничителем выступает экономическая целесообразность (использовать донор в заведомо завышенной концентрации невыгодно, даже если это донор природного углеводного остатка), а также усложнение очистки полученной реакционной смеси. В каждом конкретном случае эта задача решается индивидуально.

Условия реакции для выбора оптимального соотношения между модифицированным пурином и природным нуклеозидом: объем реакционной смеси – 1 мл, концентрация модифицированного пурина – 1 мМ, температура проведения реакции – 50 °С, PNP и UP вводились в количестве 1.4 ед. акт. и 1.7 ед. акт., концентрация природного нуклеозида (уридина) – 2, 4, 6 мМ, концентрация калий-фосфатного буфера (рН 7.0) – 6 мМ. Данные представлялись в виде графика зависимости конверсии от времени (Рисунок 31).

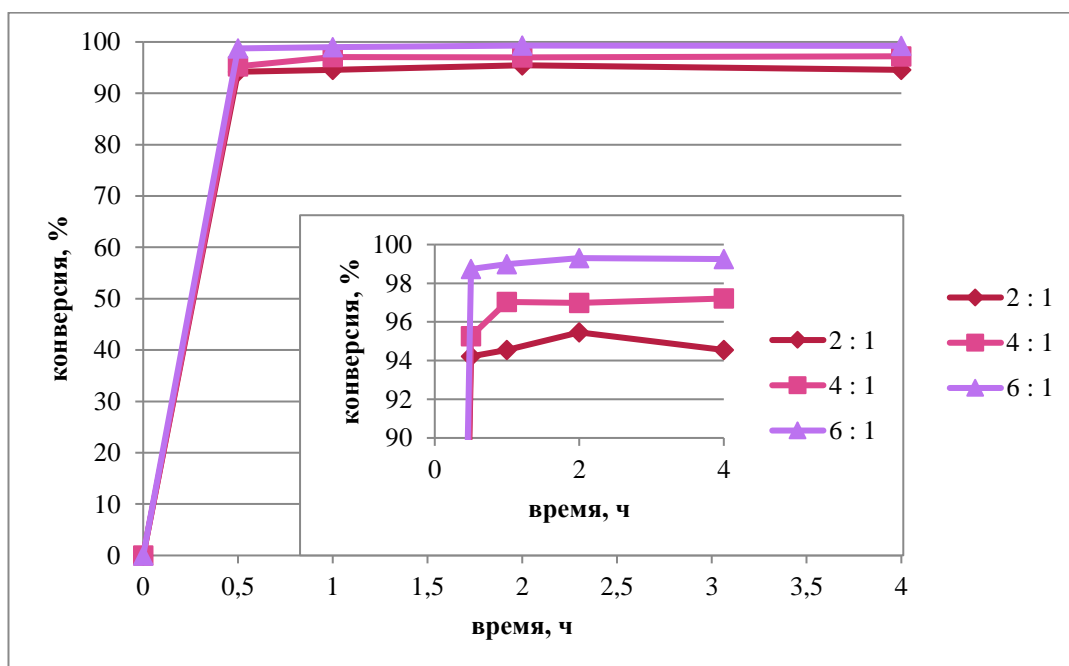


Рисунок 31 – Конверсия гетероциклического основания в рибонуклеозид в зависимости от соотношения Urd : **40-НС**, синтез рибозида **40**

Конверсия в рибонуклеозид в реакциях с различными соотношениями реагентов отличается. Наибольшая конверсия достигается при соотношении уридин : модифицированный гетероцикл **40-НС** 1:6 и составляет 99% на втором часу проведения реакции. Для сравнения, при соотношении 1:2 конверсия составляла 95%. Остаточные количества гетероцикла не только снижают выход, но и могут значительно затруднить выделение целевого нуклеозида, особенно при работе с заряженными соединениями. Для дальнейшей работы было выбрано соотношение 1:6.

Третий этап – подбор оптимального количества ферментов. Количество каждого фермента подбирается эмпирически. При больших количествах ферментов равновесие реакции устанавливается быстро, что удобно при выборе типа донора и его количества. Использование меньших количеств ферментов замедляет протекание обратной реакции, и необходимо подбирать удобное для проведения анализа время протекания реакции. В целом, логика подбора количества и соотношения ферментов походит на логику выбора оптимального соотношения донора углеводного остатка и модифицированного нуклеозида, за исключением более строгих ограничений на максимально использованные количества фермента, поскольку ферменты – это более ценный ресурс.

В случае природного нуклеозида пиримидинового типа в реакции используются два фермента, и удобно проводить подбор их соотношения и количества в виде таблицы (к примеру, 3x2), где количества обоих ферментов варьируются от минимального до максимального, использовавшегося для предыдущих этапов оптимизации (Таблица 9, Рисунок 32).

Таблица 9 – Нумерация реакций 1–6 и их условия при подборе оптимального количества ферментов PNP и UP, синтез рибозида **40**

	PNP, ед. акт.		
UP, ед. акт.		0.85	1.40
	0.50	1	2
	1.00	3	4
	1.70	5	6

Условия реакции для выбора оптимального соотношения ферментов: объем реакционной смеси – 1 мл, концентрация модифицированного пурина – 1 мМ, температура проведения реакции – 50 °С, количества PNP и UP варьировались (Таблица 9), концентрация уридина – 2 мМ, концентрация калий-фосфатного буфера (рН 7.0) – 2 мМ. Результаты представлены в виде графиков зависимости конверсии от времени (Рисунок 32).

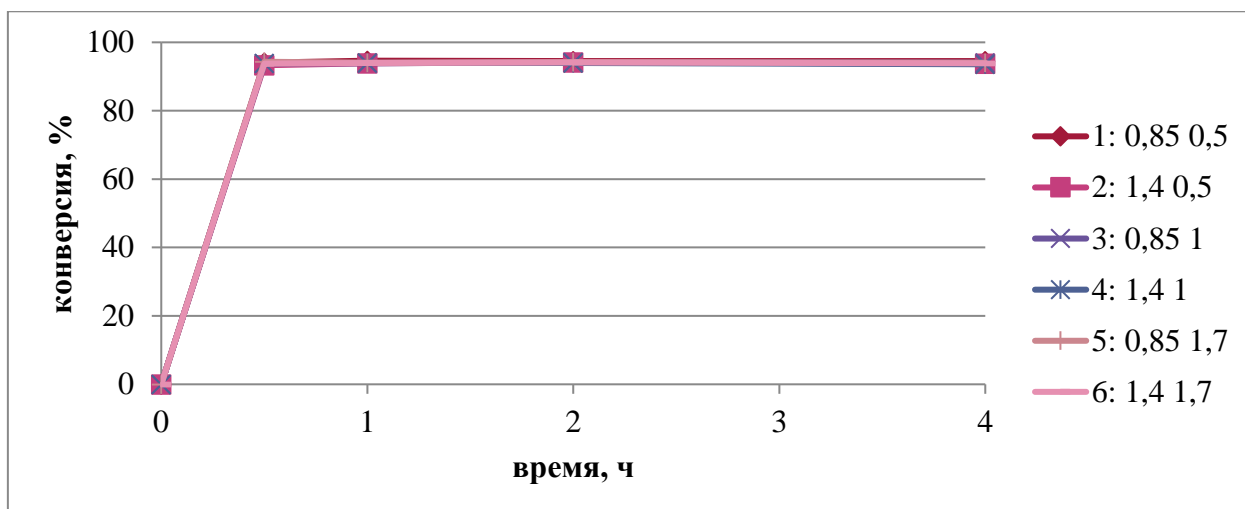


Рисунок 32 – Конверсия гетероциклического основания в рибонуклеозид в зависимости от количества ферментов в реакционной смеси (единицы активности PNP и единицы активности UP), синтез рибозиды **40**

Из приведенных на рисунке данных следует, что даже при сокращении количества нуклеозидфосфорилаз содержание продукта в реакционной смеси практически не меняется. Была проведена дополнительная оптимизация по этому параметру (Рисунок 33).

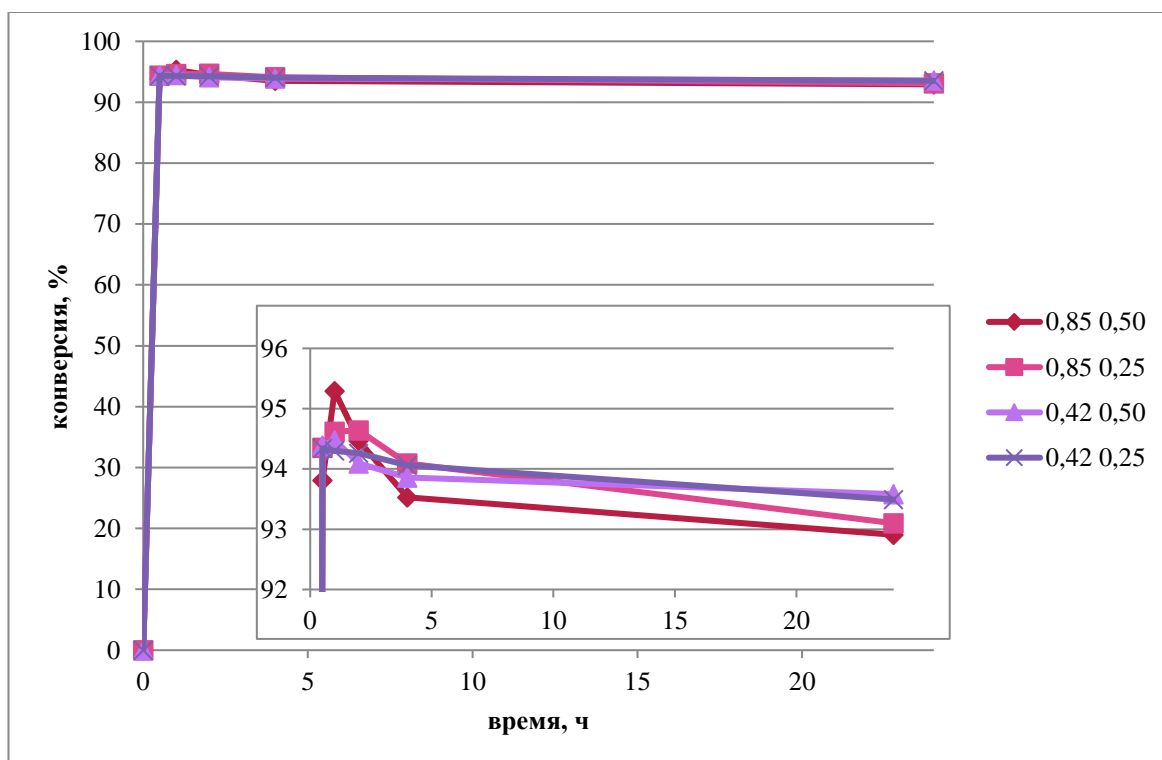


Рисунок 33 – Конверсия гетероциклического основания в рибонуклеозид в зависимости от количества ферментов в реакционной смеси (единицы активности PNP и единицы активности UP), синтез рибозиды **40**

Как видно из графика, дальнейшее уменьшение количества ферментов тоже не оказывает значимого влияния на скорость протекания реакции. Конверсия исходного

соединения в продукт после первых 3 часов реакции остается неизменной. Оптимальными были сочтены количества PNP 0.42 единиц активности и UP 0.25 единиц активности на 1 мл реакционной смеси. Подобранные оптимизированные условия для соединений **40–43** приведены в таблице (Таблица 10).

Таблица 10 – Оптимизированные условия реакций трансгликозилирования

Соед. д.	Заместитель по С2 положению	Заместитель по С6 положению	Донор	Мольный избыток донора по отношению к модифицированному пурину	PNP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси	UP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси*	Конверсия, %
40	NH ₂	глицин	уридин	6	0.42	0.25	99
41	NH ₂	глицилглутаминовая кислота		6	0.42	0.25	98
42	NH ₂	глицин амид		2	0.70	0.85	99
43	H	глицин амид	инозин	7	0.14	–	91

*при использовании пиримидинового основания в качестве донора

После определения всех ключевых условий протекания реакции проводили препаративный синтез целевого соединения. При растворимости модифицированного гетероцикла более 1 мМ, концентрации реагентов при масштабировании синтеза могли отличаться от концентраций во время подбора условий для уменьшения объемов реакционных смесей. В таком случае концентрации ферментов, буфера и природного нуклеозида увеличивали кратно концентрации модифицированного пурина. Стандартное изменение конверсии в препаративном синтезе показано на рисунке (Рисунок 34).

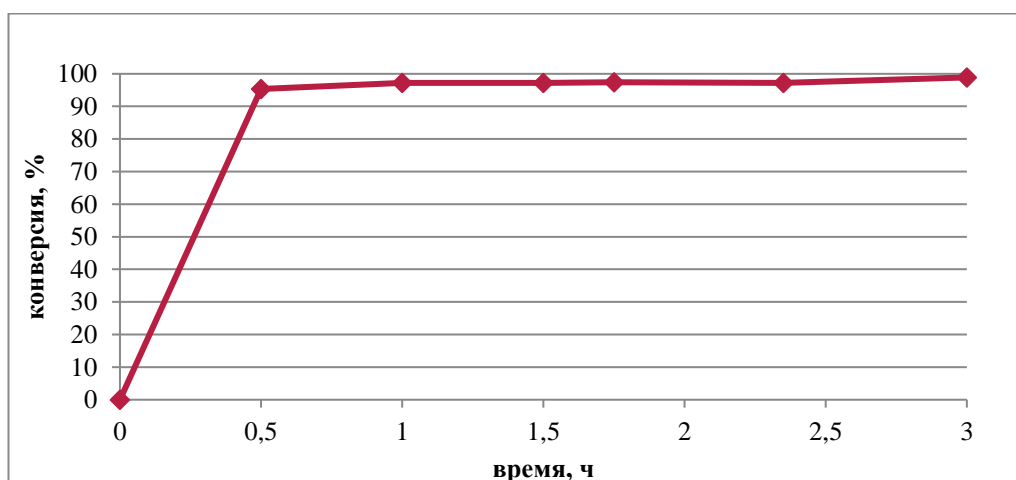


Рисунок 34 – Конверсия гетероциклического основания в рибонуклеозид при оптимизированных условиях, препаративный синтез рибозида **40**

Незаряженные соединения (производные амидов аминокислот) **42** и **43** выделяли при помощи обращенно-фазовой колоночной хроматографии. Очистка заряженных соединений, содержащих свободные кислоты (**40** и **41**), проводилась в два этапа. Целевой продукт вначале выделяли ионообменной хроматографией, а затем очищали обращенно-фазовой хроматографией или перекристаллизацией. Продукты были получены с приемлемыми выходами (Таблица 11).

Таблица 11 – Выходы продуктов реакции трансгликозилирования

Соед.	Заместитель по С2 положению	Заместитель по С6 положению	Выход после выделения, %
40	NH ₂	глицин	22
41	NH ₂	глицилглутаминовая кислота	19
42	NH ₂	глицин амид	49
43	H	глицин амид	69

После оптимизации условий реакции процесс синтеза проходил быстро и с высокой конверсией, причем образовывался исключительно природный N⁹-изомер пурина, что подтверждено данными спектроскопии ЯМР.

Результаты настоящего исследования показывают, что при помощи ферментативного синтеза возможно получение ряда 2-Н и 2-амино-6-аминокислотных производных пуриновых рибонуклеозидов, как в виде свободной кислоты, так и в виде амида.

2.4. Ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов из синтезированных ранее рибонуклеозидов при помощи реакции трансгликозилирования

В предыдущем разделе было описано использование реакции трансгликозилирования для переноса углеводного фрагмента с природного нуклеозида на модифицированное основание. Однако эту реакцию можно использовать и для обмена углеводными фрагментами между нуклеозидами. В этом случае донором углеводного остатка служит природный нуклеозид (например, 2'-деоксиуридин), а акцептором – модифицированное пуриновое основание в составе рибонуклеозида.

Одной из задач этой части работы была замена остатка рибозы на 2-дезоксирибозу 2-хлор-N⁶-замещенных аденозинов, синтезированных ранее. Для решения этой задачи также использовалась реакция трансгликозилирования.

Следующая задача заключалась в синтезе 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)замещенных пуриновых 2'-дезоксирибозидов. Ранее был описан подход к химической модификации 2'-дезоксирибонуклеозидов с получением их триазолил-замещенных производных [149]. В настоящей работе описан другой путь: получение рибозидов 2-

амино-6-триазол-1-ил замещенных пуринов и осуществление ферментативной реакции с получением новых 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)замещенных пуриновых 2'-дезоксирибозидов.

2.4.1. Ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов 2-хлор-N⁶-замещенных аденозинов

Процесс трансгликозилирования представляет собой протекание в одной реакционной смеси нескольких обратимых процессов образования и фосфолиза гликозидной связи в доноре углеводного остатка (природном нулеозиде) и модифицированном нуклеозиде. Этот процесс протекает в обоих направлениях, поэтому необходим тщательный подбор соотношения донора углеводного остатка и модифицированного пуринового рибонуклеозида, а также соотношения и количества ферментов для достижения оптимальной скорости реакции трансгликозилирования (Схема 17). Прохождение реакции оценивали по конверсии модифицированного рибонуклеозида в 2'-дезоксирибонуклеозид по данным ВЭЖХ, рассчитанной по формуле:

$$\text{конверсия} = \frac{\text{площадь пика 2'-дезоксирибонуклеозида}}{\text{площадь пика 2'-дезоксирибонуклеозида} + \text{площадь пика рибонуклеозида} + \text{площадь пика гетероцикла}} * 100\%.$$

Для синтеза 2'-дезоксирибонуклеозидов были выбраны несколько синтезированных ранее 2-хлораденозинов, замещенных по N⁶-положению остатками как гидрофобных (*L*-валин **7b**), так и гидрофильных (*L*-серин **10b**, *L*-треонин **11b**) аминокислот, *D*-аминокислот (**23b**), аминокислот (**24b**, **29b**) и бета-аланина (**21b**).

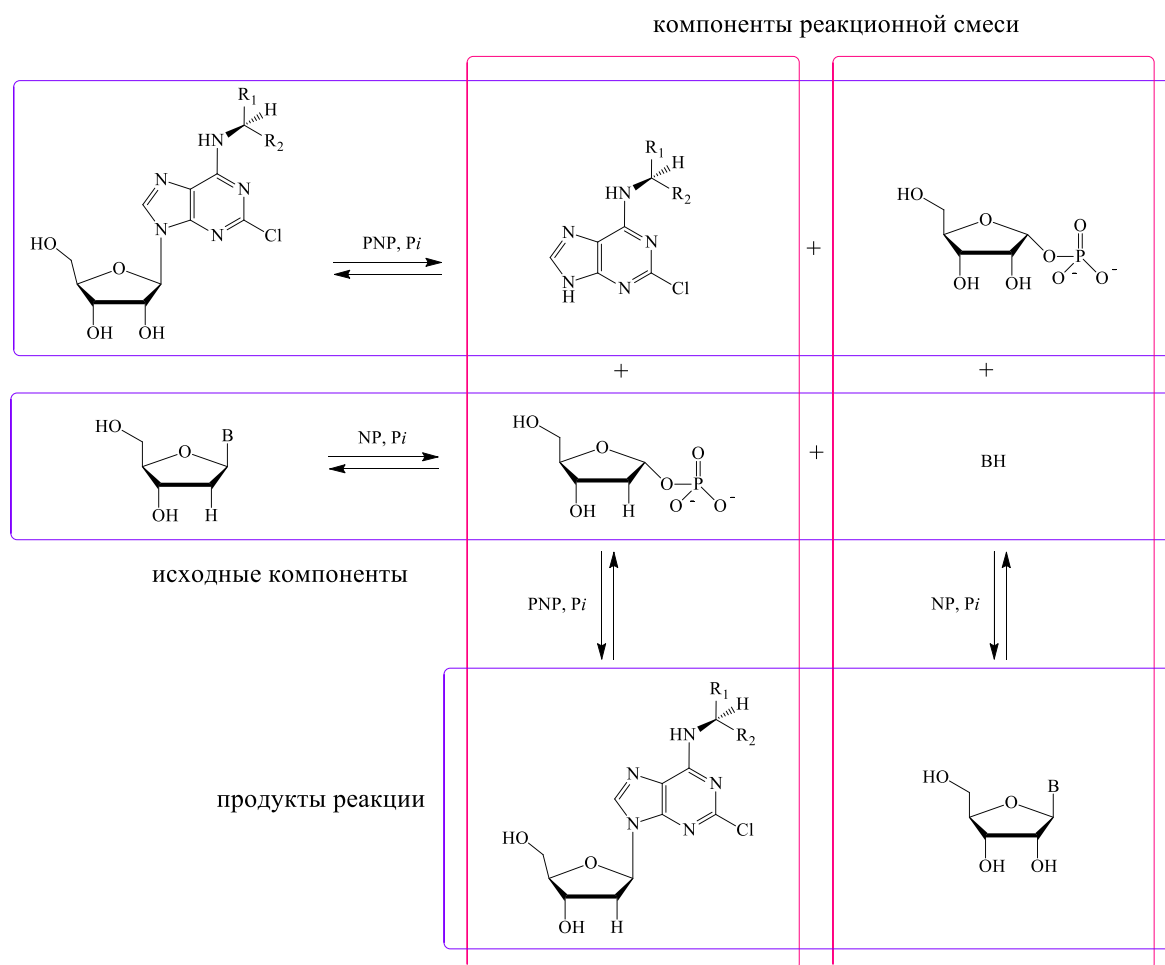


Схема 17 – Схема реакции трансгликозилирования

Синтез 2'-дезоксирибозидов осложнен тем, что 1-фосфат 2-дезоксирибозы нестабилен и со временем разрушается с образованием неорганического фосфата и 2-дезоксирибозы, которая не является субстратом нуклеозидфосфорилаз. Выведение 2-дезоксирибозы из сферы реакции смещает равновесие в сторону исходных продуктов. На практике это выражается постепенным снижением содержания целевого продукта в реакционной смеси после достижения плато (Рисунок 35). Таким образом, при синтезе 2'-дезоксирибонуклеозидов необходимо не только выбрать оптимальные доноры углеводного остатка, соотношения природного и модифицированного нуклеозида и подобрать количество и соотношение ферментов, но и определить оптимальное время прохождения синтеза и проводить тщательный контроль с использованием ВЭЖХ, чтобы остановить прохождение реакции после максимума конверсии исходного соединения в продукт, до наступления «отката».

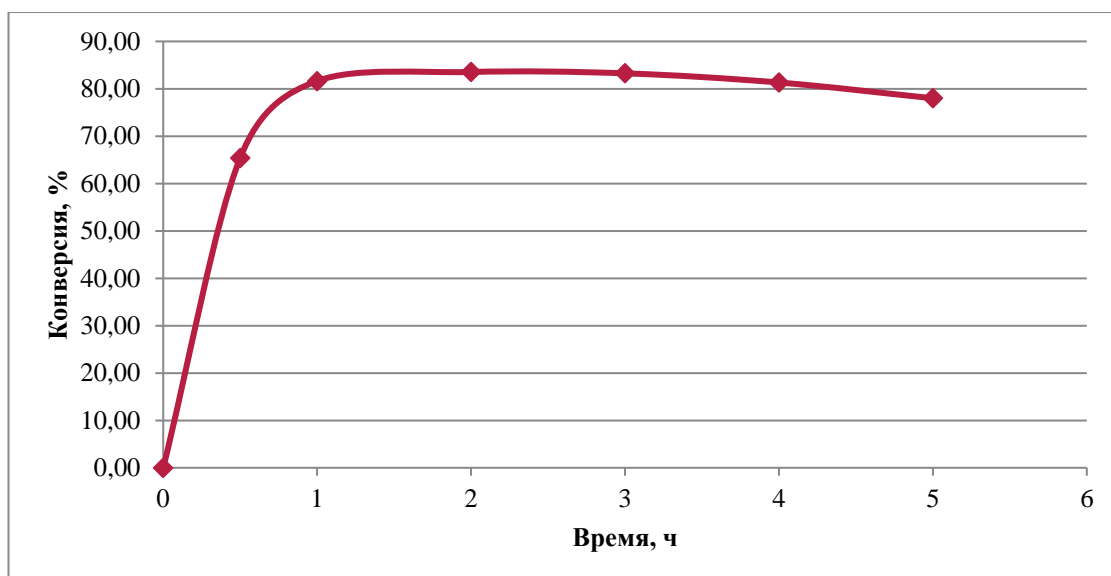


Рисунок 35 – Прохождение реакции трансгликозилирования рибозиды **7b** в дезоксирибозид **7c** с использованием донора 2-дезоксирибозы (dUrd)

Также при проведении оптимизации количеств и соотношений ферментов была обнаружена следующая закономерность: протекание реакции (конверсия в 2'-дезоксирибонуклеозид) при применении стартовых условий оптимизации в большей степени зависело от количества UP, а при изменении количеств PNP практически не менялось (Рисунок 36). На графике зависимости конверсии продукта от времени видны отдельные «кластеры», в пределах которых не происходит заметного изменения конверсии (например, графики, соответствующие соотношению ферментов PNP : UP (0.42; 0.70; 1.40) : 1.70 единиц активности в 1 мл реакционной смеси. Это позволило провести дальнейшую оптимизацию в сторону уменьшения количества PNP и использовать в препаративном синтезе меньшее количество фермента.

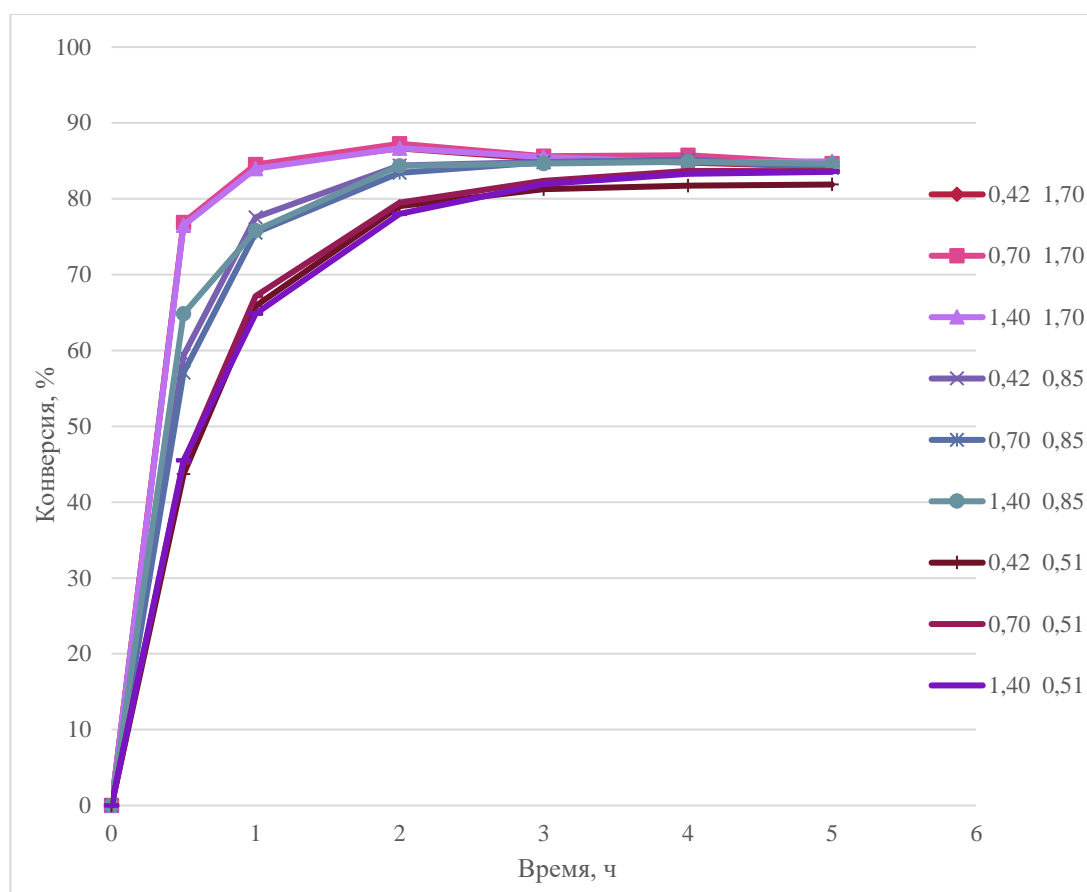


Рисунок 36 – Конверсия рибонуклеозида **7b** в 2'-дезоксирибонуклеозид **7c** в зависимости от количества ферментов в реакционной смеси (указаны единицы активности PNP и единицы активности UP, соответственно)

После оптимизации всех перечисленных параметров осуществляется масштабирование ферментативного процесса с последующим выделением и очисткой целевого продукта. Принцип подбора условий реакции трансгликозилирования принципиально не отличается от подробно описанного в предыдущем разделе, поэтому здесь не описан. Результаты такого подбора – оптимальные условия реакций трансгликозилирования – приведены в таблице ниже (Таблица 12).

Таблица 12 – Оптимизированные условия реакций трансгликозилирования

Соед.	Заместитель по С6 положению	Донор	Мольный избыток донора по отношению к модифицированному пурин-рибозиду	Количество PNP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси	Количество UP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси*	Конверсия, %
5c	глицин	2'-дезоксидин	5	0.42	0.85	88
6c	L-аланин		5	0.14	0.51	89
7c	L-валин		7	0.14	0.85	97
10c	L-серин		6	0.50	0.51	83
11c	L-треонин		7	0.28	0.30	82

12с	<i>L</i> -метионин		7	0.42	0.51	81
15с	<i>L</i> -тирозин	2'- дезоксаде нозин	7	0.07	–	78
21с	β -Ala	2'- дезоксиур идин	5	0.42	0.85	83
29с	β -NH ₂ - изобутилов ый спирт		5	0.42	0.85	88
23с	<i>D</i> -серин		5	0.42	0.85	83

*при использовании 2'-дезоксиуридина в качестве донора

Условия для масштабированных синтезов приведены в экспериментальной части. Они отличаются от условий тестовых реакций в сторону увеличения концентраций субстратов, если растворимость исходного рибозида это допускала, в целях уменьшения объемов реакционных смесей и упрощения процесса их обработки.

Продукты реакции трансликозилирования – 2'-дезоксирибонуклеозиды – были выделены при помощи обращенно-фазовой колоночной хроматографии и получены с высокой чистотой и приемлемыми выходами (Таблица 13).

Таблица 13 – Выходы продуктов реакции трансликозилирования

Соединение	Заместитель по С6 атому пурина	Выход после выделения, %
5с	глицин	38
6с	<i>L</i> -аланин	53
7с	<i>L</i> -валин	47
10с	<i>L</i> -серин	45
11с	<i>L</i> -треонин	32
12с	<i>L</i> -метионин	52
15с	<i>L</i> -тирозин	24
21с	β -Ala	73
29с	β -NH ₂ -изобутиловый спирт	37
23с	<i>D</i> -серин	38

В некоторых случаях выделение продукта осложнялось близкой хроматографической подвижностью рибонуклеозида и 2'-дезоксирибонуклеозида, что уменьшало итоговый выход. Все соединения были охарактеризованы при помощи масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР.

Результаты настоящего исследования показывают, что при помощи химического синтеза возможно получение широкого ряда 2-хлор-6-аминокислотных производных природных пуриновых рибонуклеозидов, а ферментативный синтез позволяет получить на их основе 2'-дезоксирибонуклеозидные аналоги.

2.4.2. Ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)-пуринов

Отдельная задача – получение 2'-дезоксирибонуклеозидов 6-триазолил-замещенных 2-аминопуринов при помощи реакции трансгликозилирования. Необходимо было проверить субстратную специфичность таких соединений по отношению к нуклеозидфосфорилазам, которая до этого момента не исследовалась, и провести оптимизацию условий для трансгликозилирования таких объектов. Схема реакции трансгликозилирования приведена на схеме (Схема 18).

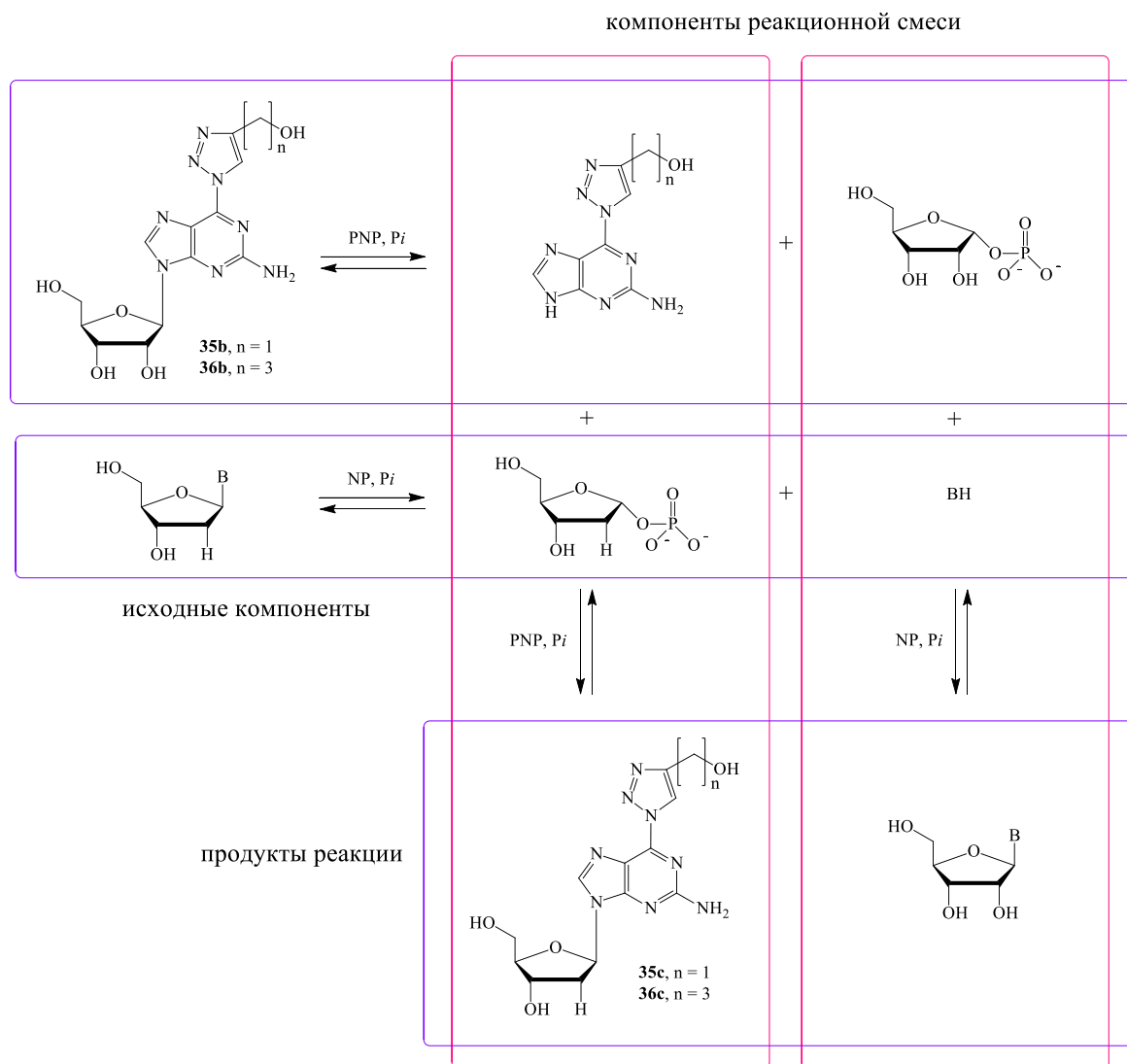


Схема 18 – Ферментативный синтез триазолил-замещенных пуринов

Оказалось, что триазолил-замещенные пурины являются субстратами для PNP (данные LC-MS), что позволило перейти к этапу подбора условий реакции трансгликозилирования. Подбор условий проводился по тем же алгоритмам, что и для предыдущей серии (Таблица 14). Продукты выделяли при помощи обращенно-фазовой колоночной хроматографии. Получили соединения **35c** и **36c**, которые были

охарактеризованы методами масс-спектрометрии, одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР.

Таблица 14 – Оптимизированные условия реакций трансгликозилирования для 2-амино-6-триазолилных производных пурина и выход после выделения

Соед.	Донор	Мольный избыток донора по отношению к модифицированному пуририбозиду	Количество PNP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси	Количество UP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси	Конверсия, %	Выход после выделения, %
35c	2'-	10	0.43	0.52	88	46
36c	дезоксиридин	7	0.28	0.51	79	26

Данные спектров ЯМР подтвердили наличие исключительно N9-замещенного изомера пурина. Это подтверждает селективность протекания реакции трансгликозилирования соединений 2-аминопурина с триазольным заместителем в С6 положении.

2.5. Изучение фотофизических свойств триазолил-замещенных пуринов

Были исследованы фотофизические свойства серий триацетатов рибозидов, рибозидов и 2'-дезоксирибозидов 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)-замещенных пуринов **35(a, b, c)** и **36(a, b, c)**, а также 2-амино-6-азидо-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)пурин **34**. Изучаемые соединения растворяли в ацетонитриле и в 7% растворе ацетонитрила в воде из-за ограниченной растворимости ацетил-защищенных рибозидов **35a** и **36a** в водных растворах. Концентрация исследуемых растворов составляла 0.5 мкМ.

Природа углеводного остатка не оказывала значительного влияния на спектр флуоресценции. Максимум спектров эмиссии полученных соединений в 7% растворе ацетонитрила в воде находился при 430 нм, а максимумы возбуждения находились при 225 и 330 нм. Общий вид спектра возбуждения и эмиссии был схожим для всех исследованных соединений (Рисунок 37).

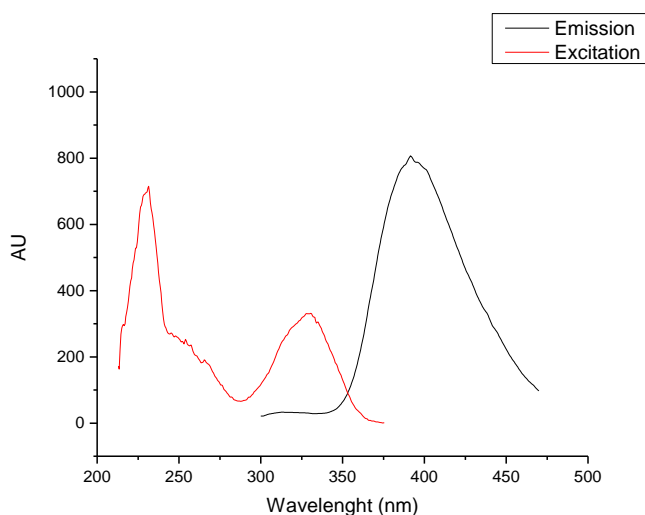


Рисунок 37 – Спектр возбуждения и эмиссии соединения **36b**

В спектрах исследованных соединений был обнаружен большой стоксов сдвиг, рассчитанный как разница между длиной волны, соответствующей более коротковолновому пику возбуждения, и длиной волны соответствующей максимуму эмиссии (Таблица 15).

Таблица 15 – Фотофизические свойства соединений в различных растворителях

Соединение		Растворитель	λ возбуждения, нм	λ эмиссии, нм	$\Delta \lambda$, нм
35a	2-амино-6-(4-(3-гидроксипропил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	225	425	200
		Ацетонитрил	230	390	160
35b	2-амино-6-(4-(3-гидроксипропил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9- β -D-рибофуранозилпурин	7% ацетонитрил в воде	230	430	200
		Ацетонитрил	230	390	160
35c	2-амино-6-(4-(3-гидроксипропил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2-дезоксид- β -D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	230	425	195
		Ацетонитрил	230	405	175
36a	2-амино-6-(4-(3-гидроксиэтил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	230	427	197
		Ацетонитрил	230	405	175
36b	2-амино-6-(4-(3-гидроксиэтил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9- β -D-рибофуранозилпурин	7% ацетонитрил в воде	230	430	200
		Ацетонитрил	230	410	180

36с	2-амино-6-(4-(3-гидрокси-метил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2-дезоксид-β-D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	230	430	200
		Ацетонитрил	230	405	175
34	2-амино-6-азидо-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	273	437	164
		Ацетонитрил	295	330	35

В растворах 7% ацетонитрила в воде соединения показали флуоресценцию с максимумом на длине волны 425–430 нм, причем длина волны максимума флуоресценции не зависела от природы углеводного остатка и оставалась приблизительно одинаковой для рибозидов, 2'-дезоксирибозидов или 2',3',5'-три-О-ацетилрибозидов. Природа заместителя при триазолильном фрагменте также не оказала влияния на флуоресценцию.

В ацетонитрильных растворах максимум эмиссии для большинства соединений смещался до 405–410 нм. Для рибозида **35b** и триацетил-защищенного рибозида 3-гидроксипропил-триазол-замещенного производного **35a** максимум флуоресценции сместился в коротковолновую область и оказался при длине волны 390 нм. Длина волны максимума возбуждения при этом не изменялась и составляла 230 нм.

Все соединения показали значительный стоксов сдвиг относительно длины волны возбуждения 230 нм. В растворах 7% ацетонитрила в воде стоксов сдвиг достигал 200 нм, а в ацетонитрильных – 180 нм. Также были изучены фотофизические свойства исходного соединения – 2-амино-6-азидо-пуринового рибозида **34**, стоксов сдвиг составил 164 нм в водном растворе и 35 нм в ацетонитрильном растворе.

Впервые были получены соединения – производные 2-амино-9-β-D-рибофуранозил-6-(1,2,3-триазол-1-ил)- и 2-амино-9-(β-D-2'-дезоксирибофуранозил)-6-(1,2,3-триазол-1-ил)-замещенных пуринов, которые являются структурными аналогами известного флуорофора 2-аминопурина и содержат сопряженную систему триазол-пурин, которая также обладает способностью к флуоресценции. Были исследованы фотофизические свойства полученных рибонуклеозидов и 2'-дезоксирибонуклеозидов, которые показали значительный (до 200 нм) стоксов сдвиг в растворах 7% ацетонитрила в воде.

2.6. Разработка способа получения 2'-дезоксид-2'-фтор-арабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина

Среди препаратов, используемых в клинике, клофарабин занимает особое место в силу уникальных антипролиферативных свойств. Представлялось интересным разработать подход к химико-ферментативному способу получения новых аналогов 2'-дезоксид-2'-фтор-арабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина. Ранее в лаборатории Биотехнологии ИБХ РАН был разработан способ получения 2-дезоксид-2-фтор- α -D-арабинофуранозил-1-фосфата **44** из 1,3,5-три-О-бензоил-2-дезоксид-2-фтор-арабинофуранозы **45** по методу, представленному на схеме (Схема 19).

В расплав кристаллической фосфорной кислоты при 50 °С при перемешивании добавляли бромистый ацетил и 1,3,5-три-О-бензоил-2-дезоксид-2-фторарабинозу **45**, получая смесь аномеров соответствующего 1-бромида **46**. Реакционную смесь выливали в диоксан и добавляли три-*n*-бутиламин. Затем добавляли суспензию гидроксида лития, отфильтровывали мелкодисперсный осадок фосфата лития на воронке Бюхнера с несколькими слоями фильтровальной бумаги, три-*n*-бутиламин экстрагировали хлороформом. Омыление бензоатов проводили доведением рН водной фазы до 11 гидроксидом лития, контролируя прохождение реакции по ТСХ, а затем высаживали желаемый продукт **44** в виде литиевой соли в системе метанол-ацетон. После центрифугирования получали белый мелкодисперсный порошок, содержащий смесь α -фосфата **44** и его β -аномера (1:1 в соответствии с данными ¹H спектроскопии ЯМР), содержащую примесь сложноотделяемого хлорида лития. Реальное содержание фосфата 2-дезоксид-2-фтор-арабинозы **44** в препарате составляло 20-25%.

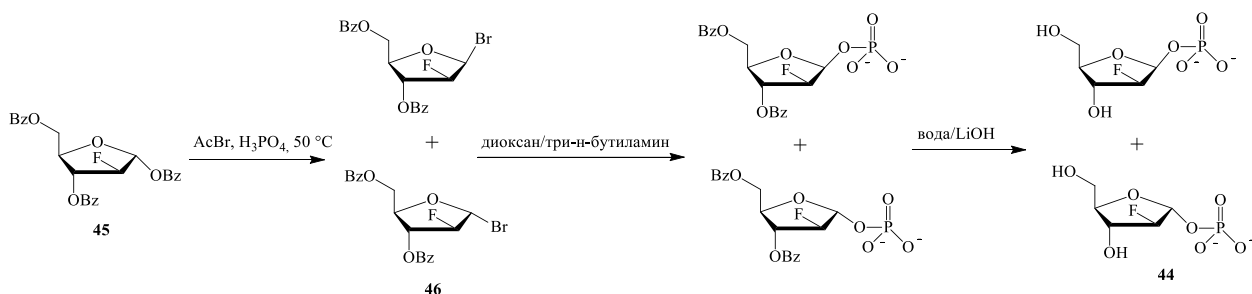


Схема 19 – Химический синтез 2-дезоксид-2-фтор- α -D-арабинофуранозил-1-фосфата

Была введена дополнительная стадия кристаллизации фосфата **44** из смеси растворителей вода-метанол-ацетон, которая позволила избавиться от сопутствующего хлорида лития, который мешал работе пуриннонуклеозидфосфорилазы. Был получен чистый фосфат **44** для проведения пробных синтезов 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-арабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина.

Для подтверждения возможности проведения ферментативного синтеза были проведены пробные реакции трансгликозилирования с модельным соединением – природным аденозином, а также с двумя ранее синтезированными рибонуклеозидами – производными с заместителями амидами валина **7b** и серина **10b** (Схема 20).

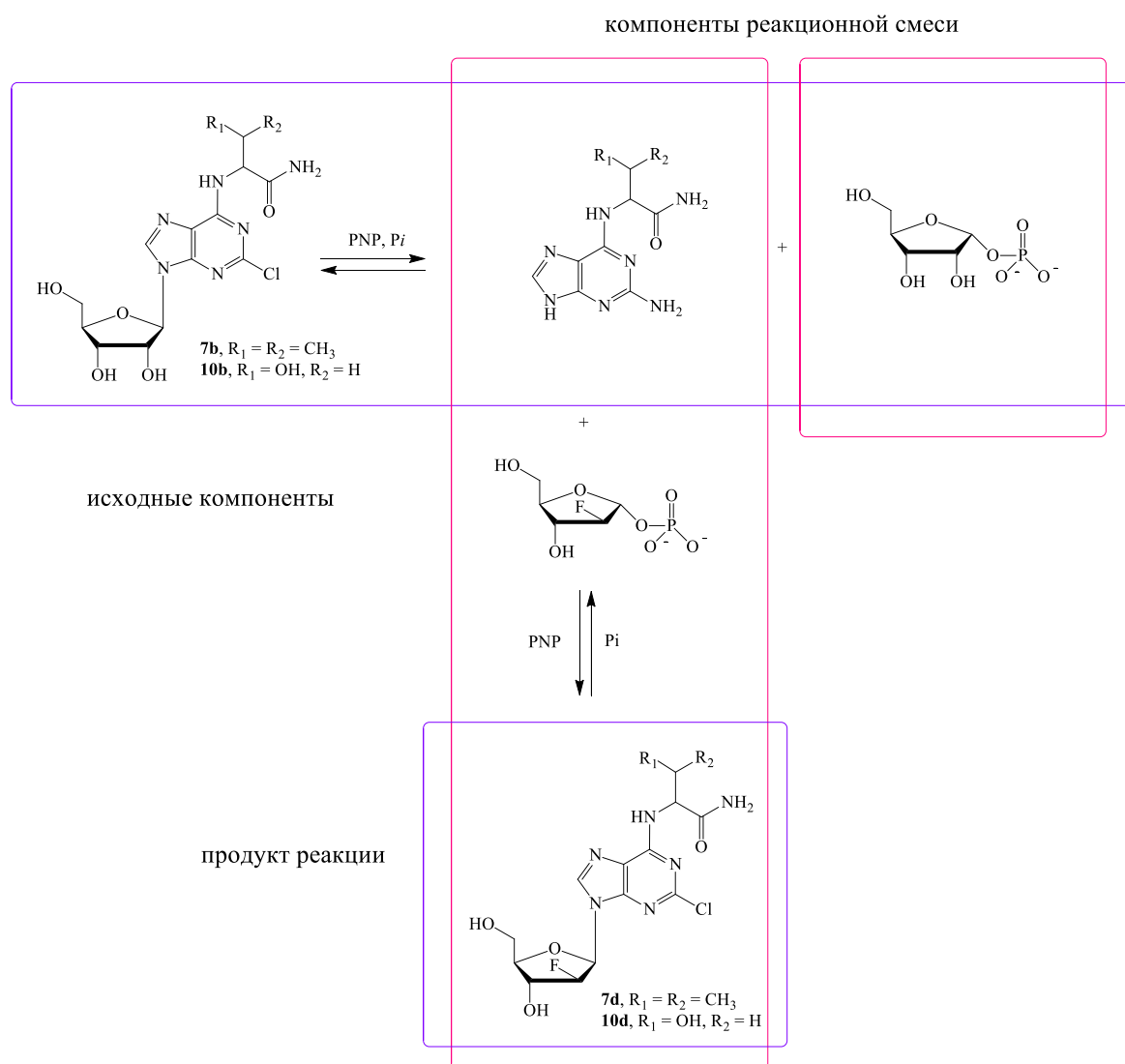


Схема 20 – Ферментативный синтез 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-арабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина **7d** и **10d**

Объем реакционной смеси составил 1 мл, концентрация модифицированных нуклеозидов – 1 мМ, концентрация 2-дезоксидеокси-2-фтор-α-D-арабинофуранозил-1-фосфата **44** – 10 мМ, температура проведения реакции – 50 °С. В реакцию вводили 14 единиц

активности PNP. Время протекания реакции составляло 24 часа. В результате проведения реакций до данным LC-MS было зафиксировано образование продуктов – новых 2'-дезоксидеокси-2'-фторарабинозидов N⁶-замещенных 2-хлорпуринов (Таблица 16).

Таблица 16 – Экспериментальные данные конверсии N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина в 2'-дезоксидеокси-2'-фторарабинозиды

Соединение	Заместитель по С6 положению	Конверсия в 2'-дезоксидеокси-2'-фторарабинозид, %	m/z расч. [M+H] ⁺	m/z, [M+H] ⁺
Аденозин	–	37.3	304.0613	304.0607
7d	<i>L</i> -валин	24.2	403.1297	403.1314
10d	<i>L</i> -серин	28.3	391.0933	391.0910

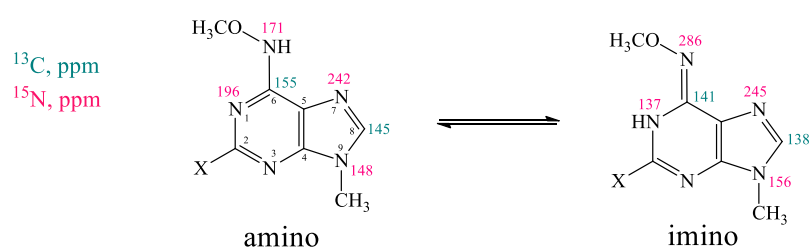
Проведенные эксперименты очевидно доказали, что реакцию трансгликозилирования можно с успехом использовать для получения 2'-дезоксидеокси-2'-фторарабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина – новых аналогов клофарабина.

Полученные экспериментальные данные частично приведены в статье M.I. Kharitonova, K.V. Antonov, I.V. Fateev, **M.Ya. Berzina**, A.L. Kaushin, A.S. Paramonov, S.K. Kotovskaya, V.L. Andronova, I.D. Konstantinova, G.A. Galegov, V.N. Charushin, A.I. Miroshnikov. Chemoenzymatic Synthesis of Modified 2'-Deoxy-2'-fluoro-β-*D*-arabinofuranosyl Benzimidazoles and Evaluation of Their Activity Against Herpes Simplex Virus Type 1. // Synthesis. – 2017. – V. 49. – No 05. – P. 1043. DOI: 10.1055/s-0036-1588625 IF_{wos} 3.157 (Q2)

2.7. Изучение аномалии в спектрах ЯМР аналогов аденозина

При анализе спектров ЯМР N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина было обнаружено, что нуклеозиды существуют в двух формах: раздваивается сигнал протона N⁶HСН и протонов ближайшего окружения. Разница в химсдвигах сигнала этого протона была значительна и составляла больше 0.5 м.д. Это явление не зависело от хиральности (проявлялось в спектрах как в *L*-, так и *D*-аминокислот, *S*-аминоспиртов, а также соединений, являющимися оптически неактивными) или природы углеводного остатка (рибозид, 2'-дезоксирибонуклеозид, триацетат рибонуклеозида). Однако такая аномалия не была обнаружено ни в одном из производных бета-аминоизобутилового спирта **29a**, **29b** и **29c**, а также в производных N⁶-замещенного аденозина **43** или 2-аминоаденозина **40–42**.

Явление образования второй формы наблюдается в спектрах ЯМР C6-замещенных аденозинов не впервые. В литературе было выдвинуто несколько теорий, объясняющих наличие нескольких форм производных аденина или аденозина. Так, для C6-замещенных аденинов и аденозиновых нуклеозидов характерно явление amino-имино таутомерии [236-240]. Аmino-форма аденина в растворе является основной, однако введение дополнительного заместителя в аденозин может сместить таутомерное amino-имино равновесие [241]. Введение электроноакцепторного заместителя в C2 положение пурина смещало равновесие в сторону amino формы (Рисунок 38).



X	Содержание amino-таутомера, %
Cl	100
OCH ₃	92
NHCH ₃	28
H	20
CH ₃	18

Рисунок 38 – Amino- и иминотаутомеры 6-метоксиаминопуринов: химические сдвиги существенно зависят от заместителя X [236-238]

Наличие второй формы было отмечено в спектрах ЯМР пуринов с более сложными заместителями, например у кинетина и его производных [241, 242]. Novotná и соавторы предположили, что при комнатной температуре в растворе 2-хлор-N⁶-фурфурил-аденозин существует в двух формах: amino- и имино-таутомеров. При этом в твердом состоянии по

данным рентгеноструктурного анализа присутствует только амино-форма [242] (Рисунок 39).

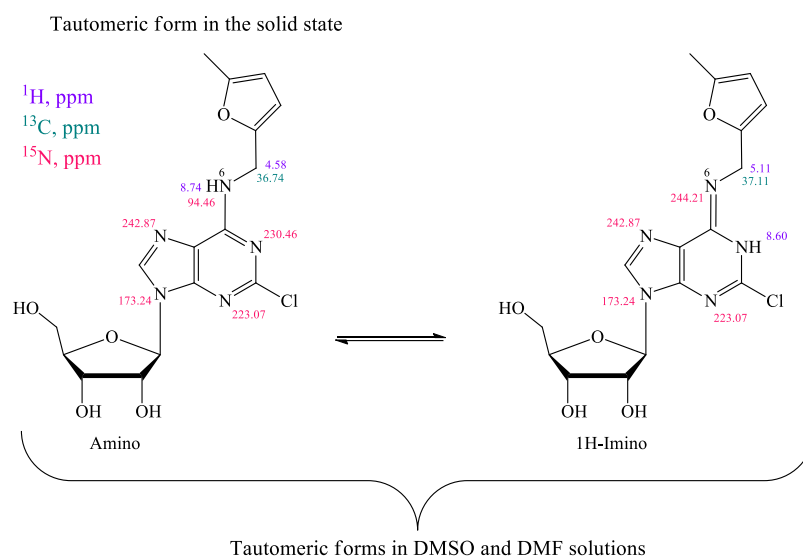


Рисунок 39 – Предлагаемые таутомерные формы 2-хлор-N⁶-(5-метилфурфурил)-аденозина, полученные в результате рентгеноструктурного анализа и ЯМР спектроскопии (данные из источника [242])

Еще один возможный вариант причины возникновения второй формы – заторможенное вращение. Martin и соавтор [243] в 1967 году впервые описали наличие второй формы N⁶,N⁶-диметилированного аденозина при охлаждении и предположили, что она возникла из-за затрудненного вращения заместителя при С6 относительно пуринового основания. Engel и соавт. обнаружили, что два различных изомера 6-метиламино (ротамеры) связаны с *син*- и *анти*-конформациями заместителя относительно N1 пуринового гетероцикла. Основной формой соответствовала *син*-конформация [244] (Рисунок 40).

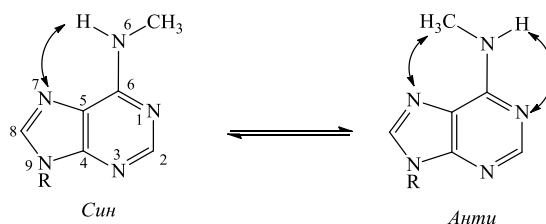


Рисунок 40 – Предполагаемая внутримолекулярная водородная связь в N⁶-замещенных пуринах (данные из источников [244, 245])

Engel и соавторы [244] провели очень красивый опыт по подавлению сигнала N⁶H от главной и второй формы путем размещения сильного поля облучения в положении резонансной частоты аминных протонов главной и миниформ с исчезновением соответствующих дублетов и тем самым показали наличие двух различных изомеров (ротамеров) при низкой температуре. Они установили, что две формы связаны с наличием

син- и *анти*-конформаций по отношению к атому N1 пуринового цикла, а также сделали вывод о том, что основная форма – *син* вследствие стерического взаимодействия метиламиногруппы с несвязывающей орбиталью N7. Наличие стерических взаимодействий с несвязывающей орбиталью атома N1 оказывает меньший вклад.

Dodin и соавторы [245] описывают дополнительное взаимодействие NH: возникающая внутримолекулярная водородная связь между атомом водорода экзоциклической аминогруппы и N7 является возможной причиной преобладания *син*-ротамеров. Стабилизация ротамера возникает за счет двух конкурирующих водородных связей и стерического эффекта: *син*-конформацию стабилизирует связь N⁶-H...N7, тогда как *анти*-форма стабилизируется водородной связью N⁶-H...N1, но дестабилизируется стерическим взаимодействием с метильной группой (Рисунок 40).

Природа заместителя в положении C2 пурина также влияет на наличие сигналов второй формы в спектре ЯМР. В спектрах ЯМР замещенных аденозинов вторая форма обычно не видна, или она регистрируется в виде уширенных сигналов протона N⁶HCH [246-250]. В спектрах ЯМР соединений с электроноакцепторным заместителем (Cl, F) в C2 положении отмечалось наличие второй формы при комнатной температуре [241], причем зачастую авторы не описывают наличие второй формы, однако ее можно обнаружить при анализе сопроводительных данных при их наличии (Supplementary information или Supporting Materials) [68, 251-254]. В случае C2-NH₂ вторую форму не регистрировали [68, 255]. Были получены различные C2-замещенные пурины с оптически активными заместителями при C6 положении, и наличие второй формы не зависело от природы заместителя (*R* или *S*) [251].

При исследовании данных низкотемпературного ЯМР было показано, что сигналы второй формы также регистрируются в спектрах C2-H и C2-NH₂ замещенных пуринов при охлаждении до 0 °С и хорошо видны при минус 25 °С [241] (Рисунок 41). Стоит отметить, что обычно спектры ЯМР снимаются при комнатной температуре (300 или 303 К), и вторую форму у аналогичных соединений (аналогов аденозина и гуанозина) не регистрировали. Кроме того, в разных случаях различались условия записи спектров (CDCl₃ вместо DMSO-*d*₆, 100 °С вместо 30 °С) [68], а относительное количество второй формы в DMSO выше, чем в CDCl₃ [256]. У 7-дезазакинетина второй формы не регистрировали даже при охлаждении, откуда можно сделать вывод, что N7-атом вносит ключевой вклад в затрудненное вращение вокруг связи C6-N⁶ [241].

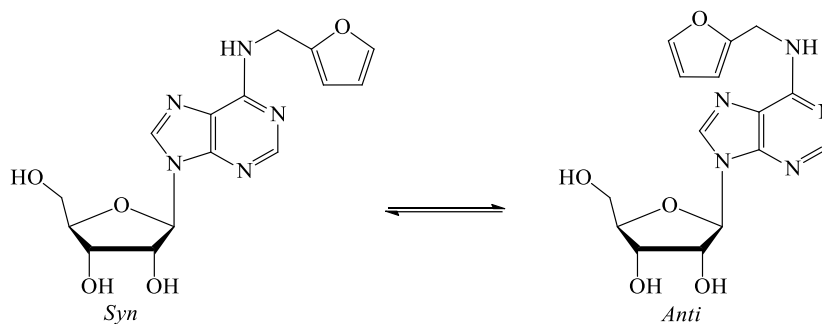
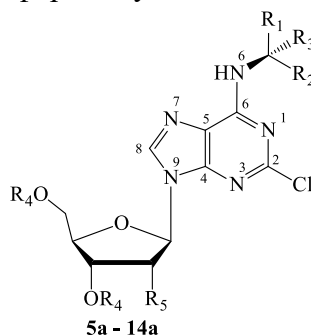


Рисунок 41 – Равновесие ротамеров кинетина при пониженной температуре (данные из источника [241])

Таким образом, в литературе описано несколько моделей возникновения заторможенной структуры в молекулах пуринов, что отражается в спектрах ЯМР в виде появления второй формы нуклеозида. В спектрах ЯМР описанных выше производных 2-хлораденозина **5a–28a**, **5b–28b**, **5c–7c**, **10c–12c**, **15c**, **21c**, **23c** присутствовал второй набор сигналов, соответствующий второй форме, причем следует отметить, что по данным ВЭЖХ и LC-MS все продукты были гомогенны. Для удобства описания этой формы был введен термин «мини-форма», поскольку содержание этой формы, зарегистрированное при помощи спектров ЯМР, не превышало содержания основной формы и варьировалось от 11 до 33% (Таблица 17).

Наиболее вероятным выглядело предположение о возникновении внутримолекулярной водородной связи, тормозящей вращение заместителя в С6 положении относительно пурина. Необходимо было определить локализацию предполагаемой водородной связи и подтвердить эту теорию данными ЯМР двумерной гетероядерной спектроскопии.

Таблица 17 – Количество мини-формы нуклеозидов по данным ЯМР, %



Со ед.	Заместитель по С6 положению	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Процент мини-формы
ТРИАЦЕТИЛ-РИБОНУКЛЕОЗИДЫ							
5a	Gly	H	COOCH ₃	H	Ac	OAc	21
6a	L-Ala	CH ₃					21
7a	L-Val	CH(CH ₃)CH ₃					32

8a	L-Leu	CH ₂ CH(CH ₃) ₂					26
9a	L-Ile	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃					28
10a	L-Ser	CH ₂ OH					21
11a	L-Thr	CH(OH)CH ₃					25
12a	L-Met	CH ₂ CH ₂ SCH ₃					25
13a	L-SMe-Cys	CH ₂ SCH ₃					21
14a	L-Phe	CH ₂ C ₆ H ₅					25
15a	L-Tyr	CH ₂ C ₆ H ₄ OH					25
16a	L-Trp	CH ₂ (β-индолил)					25
17a	L-Lys	(CH ₂) ₄ NH ₂					22
18a	Этаноламин	CH ₂ OH	Н				18
19a	Бутаноламин	(CH ₂) ₃ OH					21
20a	Гексаноламин	(CH ₂) ₅ OH					21
21a	β-Ala	CH ₂ COOCH ₃					16
22a	N ^ε -L-Lys	(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)COOCH ₃ H ₃ (S)					22
23a	D-Ser	COOCH ₃	CH ₂ OH				22
24a	S-Аланинол	CH ₃					11
25a	S-Валинол	CH(CH ₃) ₂					33
26a	Циклогексил- S-аланинол	CH ₂ C ₆ H ₁₁					25
27a	Серинол	CH ₂ OH					25
28a	ССРА	(CH ₂ CH ₂) ₂					27
29a	β-NH ₂ - изобутиловый спирт	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃			0
РИБОНУКЛЕОЗИДЫ							
5b	Gly	Н	CONH ₂	Н	Н	ОН	15
6b	L-Ala	CH ₃					20
7b	L-Val	CH(CH ₃)CH ₃					19
8b	L-Leu	CH ₂ CH(CH ₃) ₂					24
9b	L-Ile	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃					20
10b	L-Ser	CH ₂ OH					19
11b	L-Thr	CH(OH)CH ₃					15
12b	L-Met	CH ₂ CH ₂ SCH ₃					11
13b	L-SMe-Cys	CH ₂ SCH ₃					18
14b	L-Phe	CH ₂ C ₆ H ₅					21
15b	L-Tyr	CH ₂ C ₆ H ₄ OH					21
16b	L-Trp	CH ₂ (β-индолил)					20
17b	L-Lys	(CH ₂) ₄ NH ₂					23
9b- O Me	L-Ile OMe	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	COOMe				27
16b - O Me	L-Trp OMe	CH ₂ (β-индолил)					26
18b	Этаноламин	CH ₂ OH	Н				19
19b	Бутаноламин	(CH ₂) ₃ OH					22
20b	Гексаноламин	(CH ₂) ₅ OH					21
21b	β-Ala	CH ₂ COOCH ₃					20
22b	N ^ε -L-Lys	(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)CON H ₂ (S)					13
23b	D-Ser	CONH ₂	CH ₂ OH				15
24b	S-Аланинол	CH ₃					20

25b	Валинол	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$					30
26b	Циклогексил-S-аланинол	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_{11}$					26
27b	Серинол	CH_2OH					20
28b	ССРА	$(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$					27
29b	β -NH ₂ -изобутиловый спирт	CH_2OH	CH_3	CH_3			0
2'-ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДЫ							
5c	Gly	H	CONH ₂	H	H	H	15
6c	L-Ala	CH_3					17
7c	L-Val	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$					21
10c	L-Ser	CH_2OH					24
11c	L-Thr	$\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$					18
12c	L-Met	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$					20
15c	L-Tyr	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$					23
21c	β -Ala	CH_2CONH_2	H				17
23c	D-Ser	CONH ₂	CH_2OH				12
29c	β -NH ₂ -изобутиловый спирт	CH_2OH	CH_3	CH_3			0

В спектре ЯМР каждого соединения (за исключением производных бета-аминоизобутилового спирта) были зарегистрированы сигналы мини-формы этого нуклеозида. Мини-форма гомологична основному компоненту, имеет такой же набор сигналов, но отличается от основного компонента химическими сдвигами протона $^{\alpha}\text{CH}$ аминокислоты (или ее аналога) и близких к ней групп.

Сигнал протона $\text{N}^{\delta}\text{CH}$ мини-формы значительно сдвинут в слабое поле (Таблица 18). Например, химический сдвиг протона $\text{N}^{\delta}\text{HCH}$ основного компонента **7b** составляет 4.52 м.д., тогда как сигнал второго компонента сдвинут в область слабого поля: 5.33 м.д. Чем дальше протоны от группы $\text{N}^{\delta}\text{HCH}$, тем менее выражен этот эффект.

В слабopольную область также смещены сигналы углерода $\text{N}^{\delta}\text{CH}$ и азота $\text{N}^{\delta}\text{H}$. Тяжелые атомы пуринового гетероцикла также смещены либо в слабое ($\text{N}7$, $\text{C}4$), либо сильное ($\text{C}8$, $\text{C}5$, $\text{C}2$) поле, без очевидной закономерности. Химические сдвиги протонов амидной группы смещены в сильное поле. В таблице они не показаны, так как трудно вычислить разницу химических сдвигов между двумя формами двойного набора сигналов амидной группы. Исключение составляет протон $\text{N}^{\delta}\text{H}$. Его химсдвиг смещался как в сильное, так и в слабое поле.

Таблица 18 – Разница химических сдвигов мини-формы и основной формы. Фиолетовое затенение указывает на сдвиг сигналов мини-формы в слабое поле, а розовое – на сдвиг в сильное поле

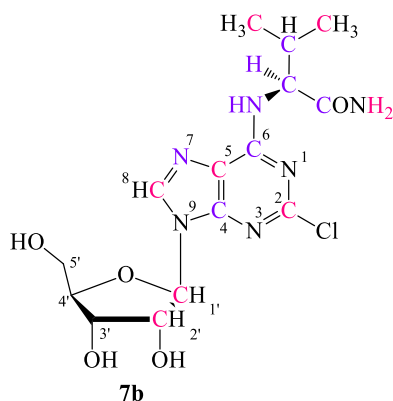
Соед.	Заместитель по С6 положению	$\Delta\delta$ N ⁶ CH, м.д.	$\Delta\delta$ N ⁶ H, м.д.	$\Delta\delta$ C8H, м.д.	$\Delta\delta$ N ⁶ CH, м.д.	$\Delta\delta$ N ⁶ H, м.д.	$\Delta\delta$ N7, м.д.	$\Delta\delta$ C4, м.д.
ТРИАЦЕТИЛ-РИБОНУКЛЕОЗИДЫ								
5a	Gly	0.42	-0.20	-0.06	2.46	–*	–	–
6a	<i>L</i> -Ala	0.72	-0.17	-0.07	2.4	6.6	–	–
7a	<i>L</i> -Val	1.04	-0.13	-0.07	1.22	4.1	–	–
8a	<i>L</i> -Leu	0.82	-0.17	-0.06	2.51	7.1	0.4	1.86
9a	<i>L</i> -Ile	1.01	-0.13	-0.06	2.00	5.7	0.8	1.87
10a	<i>L</i> -Ser	0.73	-0.05	-0.07	2.57	7.9	1.4	1.91
11a	<i>L</i> -Thr	0.79	0.03	-0.09	2.45	6.9	4.4	1.97
12a	<i>L</i> -Met	0.72	-0.19	-0.07	2.13	6.4	–	–
13a	<i>L</i> -S-Me-Cys	0.86	-0.14	-0.04	2.93	7.1	–	1.83
14a	<i>L</i> -Phe	0.83	-0.12	-0.05	2.47	6.7	1.7	1.97
15a	<i>L</i> -Tyr	0.83	-0.10	-0.06	2.96	6.6	1.4	1.91
16a	<i>L</i> -Trp	0.77	-0.10	-0.08	2.47	6.7	1.0	1.84
17a	<i>L</i> -Lys	0.75	-0.16	-0.07	2.43	7.6	–	1.80
18a	Этаноламин	0.42	-0.06	–	2.80	7.3	2.6	–
19a	Бутаноламин	0.42	-0.09	–	2.05	7.6	2.8	–
20a	Гексаноламин	0.41	-0.09	–	2.44	9.3	2.9	–
21a	β -Ala	0.40	-0.04	-0.08	2.14	–	–	–
22a	N ⁶ -Lys	0.40	-0.04	-0.08	2.14	–	–	–
23a	<i>D</i> -Ser	0.73	-0.05	-0.08	2.60	7.5	1.2	1.88
24a	<i>S</i> -Аланинол	0.65	–	–	2.41	–	2.2	–
25a	<i>S</i> -Валинол	0.73	0.08	-0.03	1.86	8.0	3.6	2.2
26a	Циклогексил- <i>S</i> -аланинол	0.65	–	-0.01	0.65	8.1	3.1	2.2
27a	Серинол	0.65	0.09	–	1.74	8.0	3.2	2.2
28a	ССРА	0.63	–	–	2.23	7.3	2.9	–
РИБОНУКЛЕОЗИДЫ								
5b	Gly	0.47	-0.39	-0.03	2.54	20.5	–	2.21
6b	<i>L</i> -Ala	0.85	-0.18	-0.03	1.11	6.5	–	2.28
7b	<i>L</i> -Val	0.79	0.11	–	2.1	7.6	2.4	2.23
8b	<i>L</i> -Leu	0.86	0.10	-0.01	2.42	–	–	2.16
9b	<i>L</i> -Ile	0.80	0.31	–	2.07	–	2.1	–
9b-OMe	<i>L</i> -Ile OMe	1.03	-0.11	-0.04	1.94	5.2	–	1.87
10b	<i>L</i> -Ser	0.74	0.07	-0.03	2.27	8.0	–	2.36
11b	<i>L</i> -Thr	0.82	0.07	-0.03	2.26	7.8	–	2.21
12b	<i>L</i> -Met	0.71	–	-0.01	9.85	7.5	–	2.28

13b	<i>L</i> -S-Me-Cys	0.78	0.11	–	2.46	8.8	–	1.97
14b	<i>L</i> -Phe	0.74	0.13	–	2.56	8.2	–	2.10
15b	<i>L</i> -Tyr	0.73	0.16	–	2.27	8.5	–	2.04
16b	<i>L</i> -Trp	0.72	0.19	-0.01	2.43	8.5	–	2.15
16b-OMe	<i>L</i> -Trp OMe	0.80	-0.10	-0.07	2.47	6.7	1.1	1.88
17b	<i>L</i> -Lys	0.79	-0.17	-0.05	2.35	–	–	1.85
18b	Этаноламин	0.43	-0.06	–	2.39	8.1	2.6	–
19b	Бутаноламин	0.44	-0.12	0.03	2.12	6.84	–	–
20b	Гексаноламин	0.43	-0.10	0.02	2.65	6.91	–	–
21b	β -Ala	0.41	-0.09	0.03	2.55	7.1	–	–
22b	N ^ε -Lys	0.72	–	-0.02	2.49	–	–	1.85
23b	<i>D</i> -Ser	0.74	0.08	-0.03	2.38	8.1	1.4	2.29
24b	<i>S</i> -Аланинол	0.65	–	–	2.16	7.4	–	–
25b	<i>S</i> -Валинол	0.76	0.08	-0.02	1.88	8.2	3.7	2.25
26b	Циклогексил- <i>S</i> -аланинол	0.71	-0.03	–	2.10	7.8	2.9	2.23
27b	Серинол	0.69	0.08	–	2.05	8.4	3.3	–
28b	ССРА	0.60	–	–	2.23	8.0	2.5	2.34
2'-ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДЫ								
5c	Gly	0.46	-0.26	-0.03	2.59	8.0	–	–
6c	<i>L</i> -Ala	0.71	–	–	2.23	–	–	–
7c	<i>L</i> -Val	0.79	0.34	–	2.16	8.0	–	2.20
10c	<i>L</i> -Ser	0.75	–	-0.03	2.24	–	–	2.33
11c	<i>L</i> -Thr	0.80	0.07	-0.04	2.36	8.1	–	–
12c	<i>L</i> -Met	0.71	–	–	2.31	7.7	–	–
15c	<i>L</i> -Tyr	0.73	0.17	–	2.58	8.3	2.6	2.13
21c	β -Ala	0.41	-0.09	0.03	2.54	7.7	–	–
23c	<i>D</i> -Ser	0.76	-0.08	0.04	2.88	8.2	–	–

* Сигнал мини-формы перекрывается сигналом основной формы

Наиболее разрешенными были спектры валинового производного **7b**, поэтому с ним были проведены дополнительные эксперименты ЯМР. Одномерные и двумерные спектры ЯМР записывали повторно после приготовления образца с повышенной концентрацией производного валина **7b** (770 мг/мл) для поиска внутримолекулярной водородной связи. Мини-форма имела тот же набор сигналов, что и основная форма в спектрах COSY, ¹³C-НМВС и ¹⁵N-НМВС. Различия в химических сдвигах атомов основной и мини-форм приведены в таблице (Таблица 19).

Таблица 19 – Разница химических сдвигов мини-формы и основной формы нуклеозида **7b**. Фиолетовое затенение указывает на сдвиг в слабое поле, а розовое затенение – на сдвиг в сильное поле



Атом соединения 7b	Химсдвиг сигналов основной формы, м.д.	Химсдвиг сигналов мини- формы, м.д.	Разница между химсдвигами сигналов мини-формы и основной формы, м.д.
NH	7.67	7.78	0.11*
H8	8.42	-	-
NH- <u>CH</u>	4.54	5.33	0.79
NH- <u>CH</u>	59.57	61.67	2.10
NH- <u>CH-CH</u>	30.92	31.04	0.12
<u>CH</u> ₃ -Val (1)	19.54	19.39	-0.15
<u>CH</u> ₃ -Val (2)	18.46	17.94	-0.52
<u>CONH</u> ₂	172.75	173.95	1.20
C2	153.56	153.25	-0.31
C4	150.06	152.31	2.25
C5	118.95	117.97	-0.98
C6	155.26	155.92	0.66
C8	140.85	140.31	-0.54
C _{1'}	88.36	88.14	-0.22
C _{2'}	74.38	74.25	-0.13
N7	237.3	242.6	5.3
<u>NH</u>	93.5	101.1	7.6

Химический сдвиг протона ^αСН остатка валина изменился на 0.79 м.д. по данным спектра ¹Н ЯМР (Рисунок 42). Химический сдвиг протона СН основной формы **7b** составил 4.54 м.д., а сигнал мини-формы был смещен в слабое поле до 5.33 м.д. Чем дальше находились протоны от заместителя N^δСН, тем менее выражен был этот эффект.

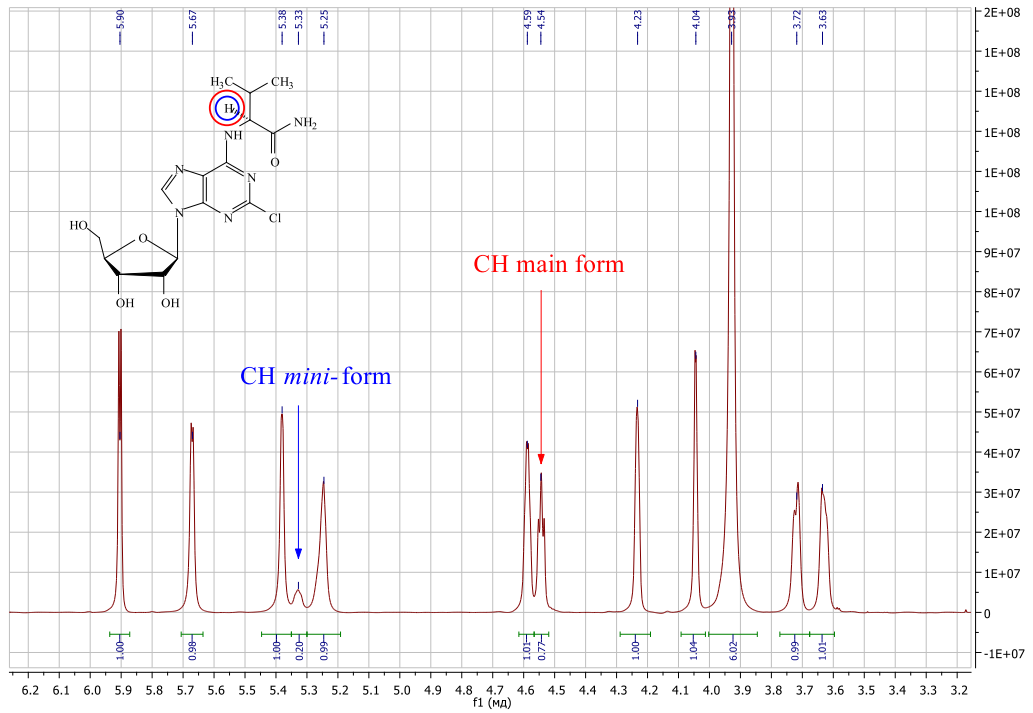


Рисунок 42 – Фрагмент спектра ^1H ЯМР производного валина **7b**

Двойной набор сигналов представлен также для протонов аминной и амидной групп (Рисунок 43). Отдельный набор сигналов мини-формы нуклеозида зарегистрирован и в спектрах ЯМР ^{13}C (Рисунок 44).

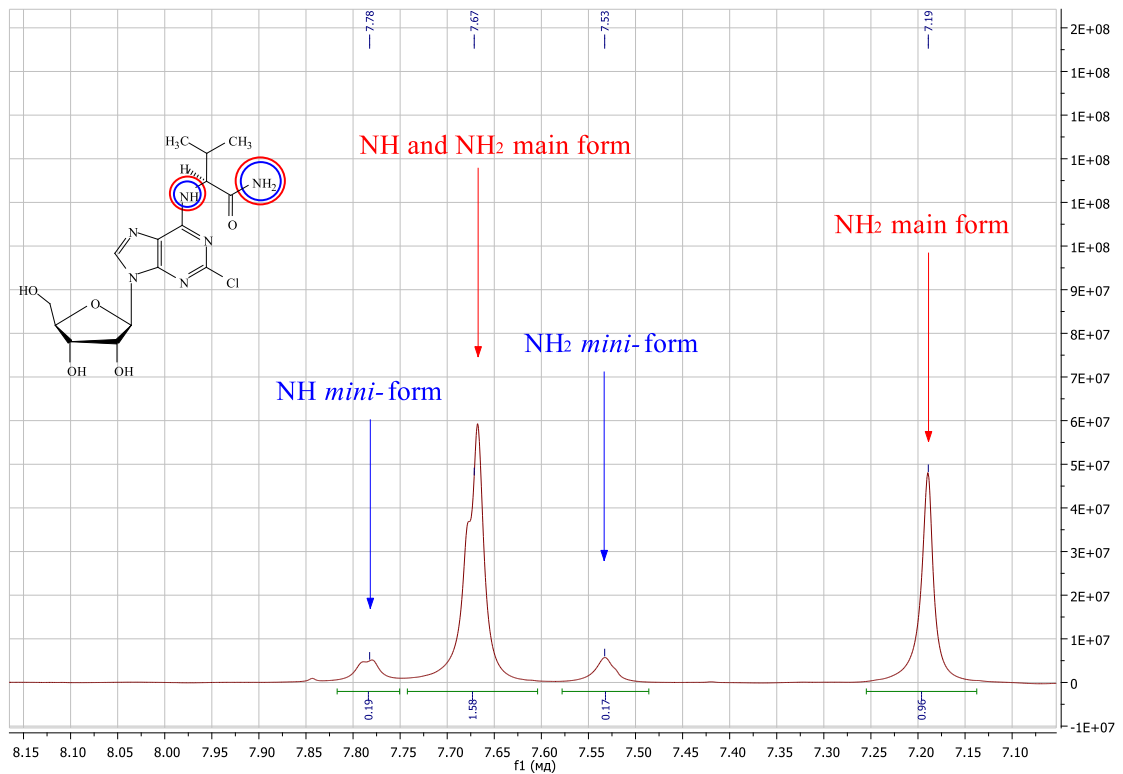


Рисунок 43 – Фрагмент спектра ^1H ЯМР производного валина **7b**

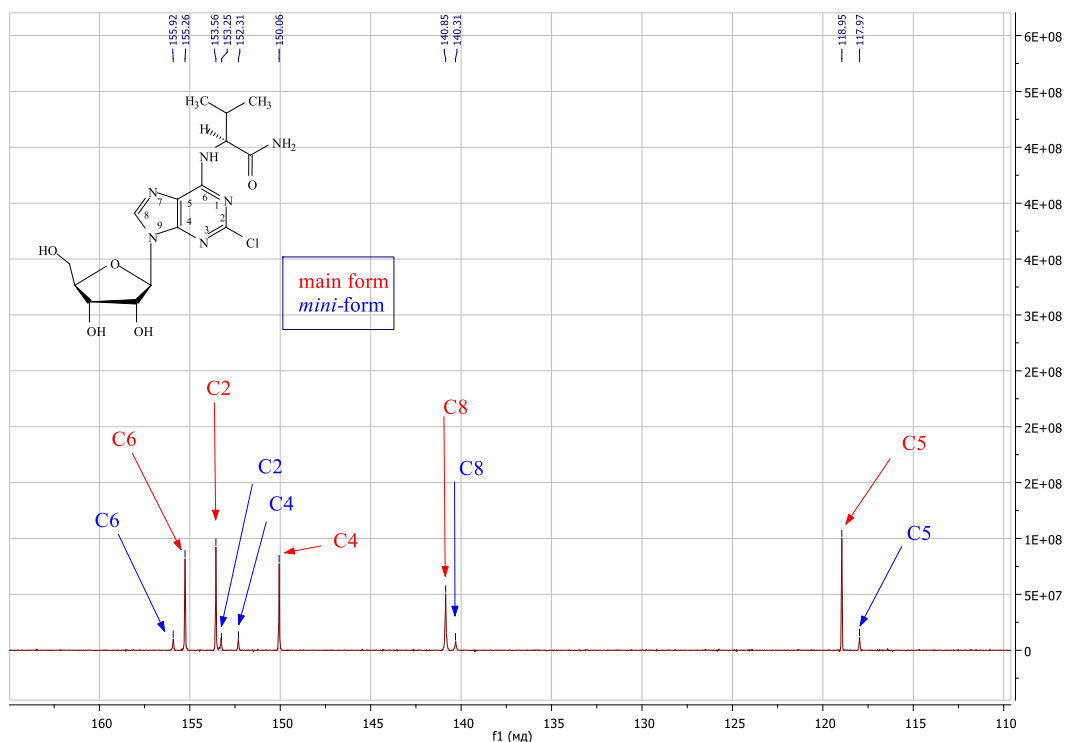


Рисунок 44 – Фрагмент спектра ^{13}C ЯМР производного валина **7b**

Сигналы мини-формы наблюдались не только в спектрах рибозидов, но и в спектрах защищенных нуклеозидов и 2'-дезоксирибонуклеозидов. Для примера показан фрагмент спектра ЯМР ^1H триацетата метилового эфира валина **7a** (Рисунок 45). Появление сигналов мини-формы нуклеозида наблюдали и в случае амидов аминокислот, и в случае метиловых эфиров изолейцина **9b-OMe** и триптофана **16b-OMe**.

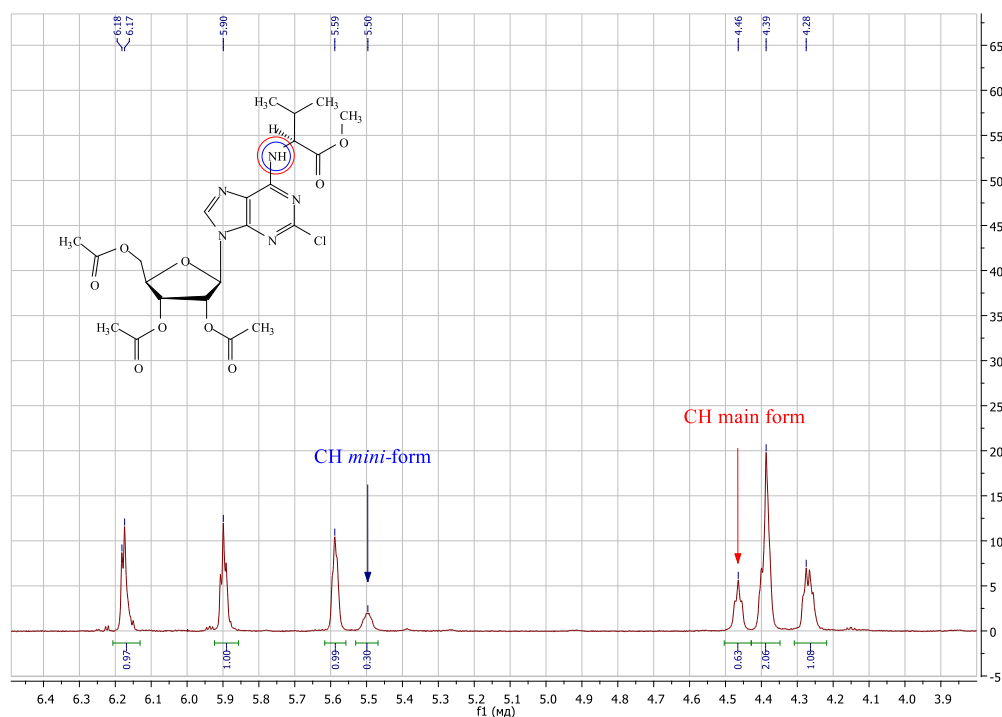


Рисунок 45 – Фрагмент спектра ^1H ЯМР производного валина триацетата **7a**

Были зарегистрированы спектры ЯМР ^1H при разных температурах (Рисунок 46) и изучено влияние температуры на формирование мини-формы (Рисунок 47). С повышением температуры от 293 до 313 К сигналы одних и тех же протонов основной и мини-формы уширялись. Такое уширение свидетельствует о процессе химического обмена, отслеживаемого при помощи спектроскопии ЯМР. Можно утверждать, что в растворе одновременно присутствуют две формы одного и того же вещества, а обмен мини-формы с основной формой происходит во время эксперимента. Сигналы ^1H основной формы и мини-формы не сливаются друг с другом (Рисунок 46). Вероятно, это происходит при более высоких температурах, недоступных для имеющегося в нашем распоряжении оборудования ЯМР. В опытах при 293–313 К содержание второй формы в спектрах ЯМР не изменялось.

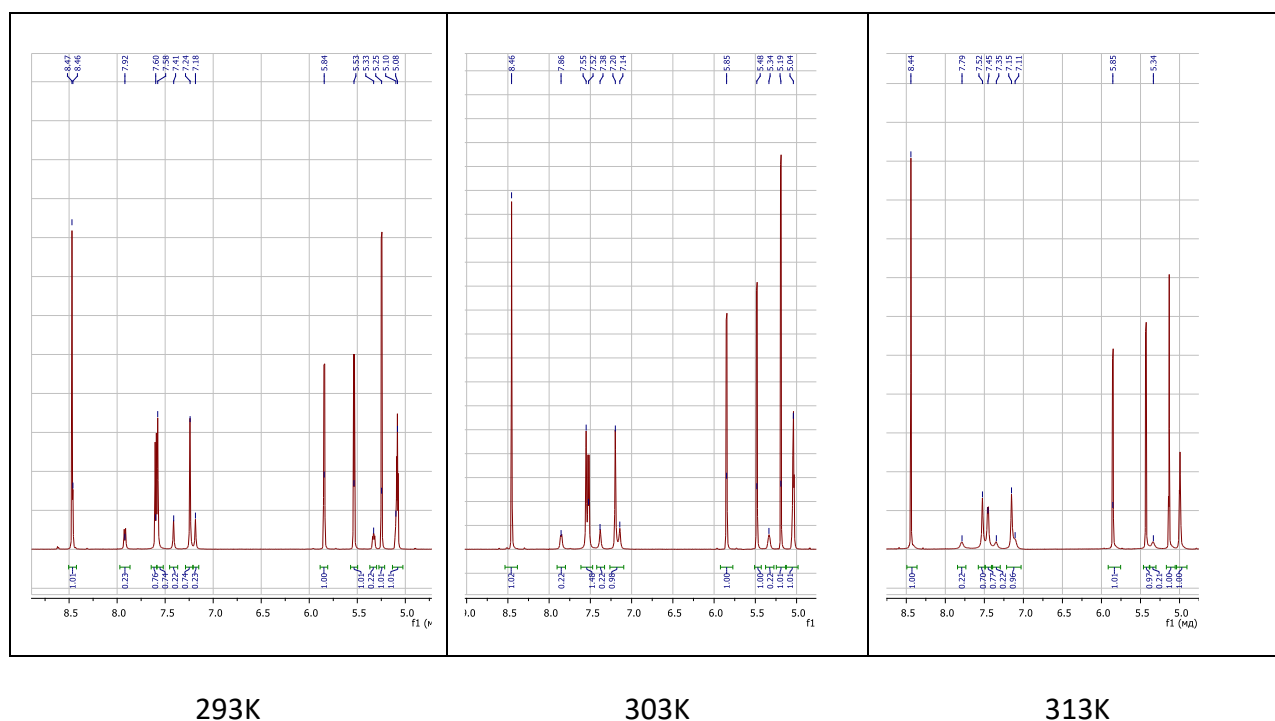


Рисунок 46 – Фрагменты спектров ^1H ЯМР соединения **7b** при различных температурах

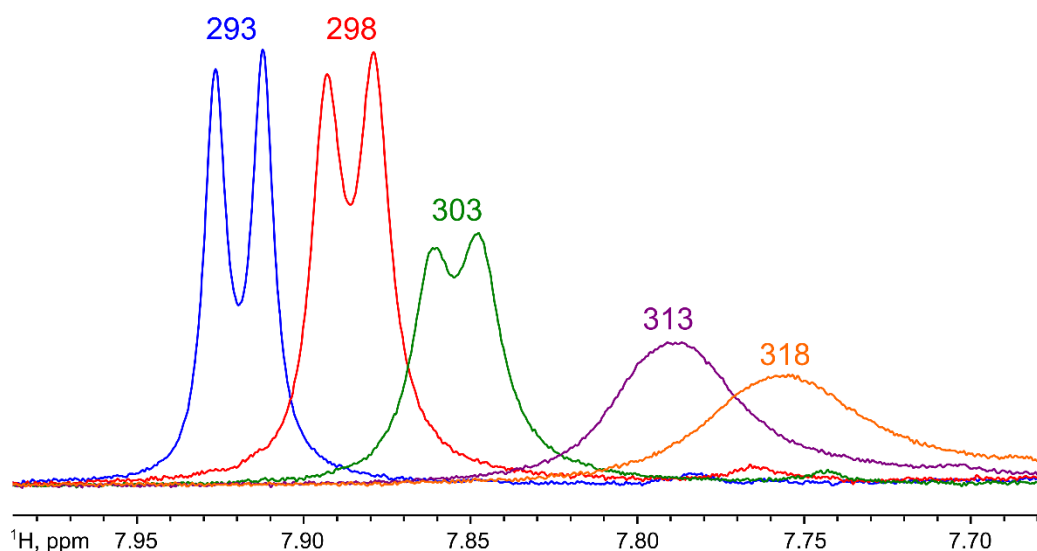


Рисунок 47 – Температурная зависимость формы и химического сдвига сигнала N⁶H в ¹H ЯМР мини-формы **7b**. Температура приведена в кельвинах

Химические сдвиги атомов соединений проявляют высокую чувствительность к любым изменениям в химической или пространственной структуре молекулы. Первоначальное предположение заключалось в том, что анализ данных ЯМР позволит выявить устойчивые закономерности в вариациях химического сдвига атомов, участвующих в формировании затрудненной структуры. К сожалению, наблюдаемые химические сдвиги (Таблица 18, стр. 101), не позволили сделать окончательные выводы о происходящем: структура с затрудненным вращением стабилизирована за счет образования внутримолекулярной водородной связи CH^{•••}N7 (гипотеза Н-связи) или вследствие amino-imine тавтомерии (Рисунок 48).

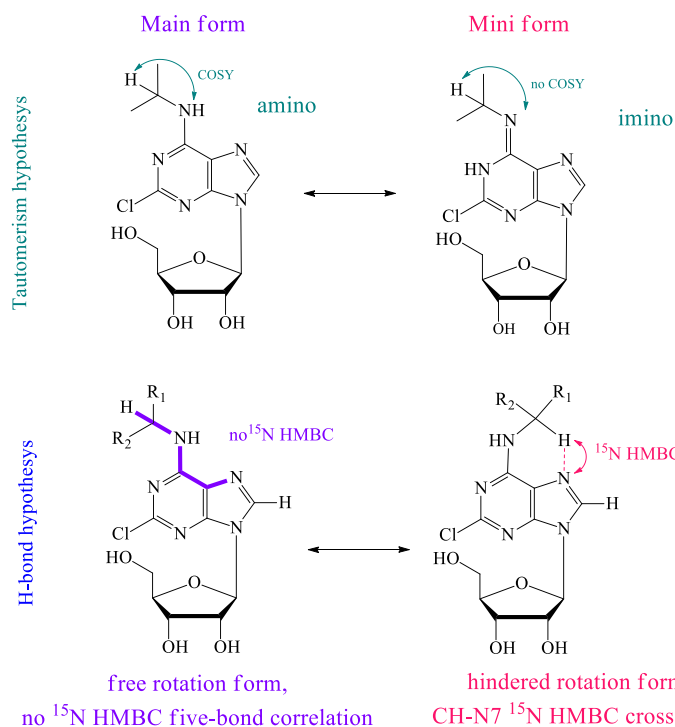


Рисунок 48 – Две гипотезы появления второй формы в спектрах ЯМР

В спектрах COSY различных 2-хлор-N⁶-замещенных производных аденозина наблюдались кросс-пики между сигналами протонов N⁶H и CH в как в основной, так и в мини-форме (Рисунок 49, для соединения **7b**). Сигнал протона N⁶H основной формы (7.67 м.д.) дает кросс-пик на сигнал протона основной формы N⁶HCH (4.54 м.д.), а сигнал протона N⁶HCH мини-формы (7.78 м.д.) дает кросс-пик на сигнал протона мини-формы N⁶HCH (5.33 м.д.). Это подтверждает наличие двух отдельных форм N⁶HCH, а также наличие NH протона в каждой из них, что заставило нас усомниться в гипотезе таутомерии.

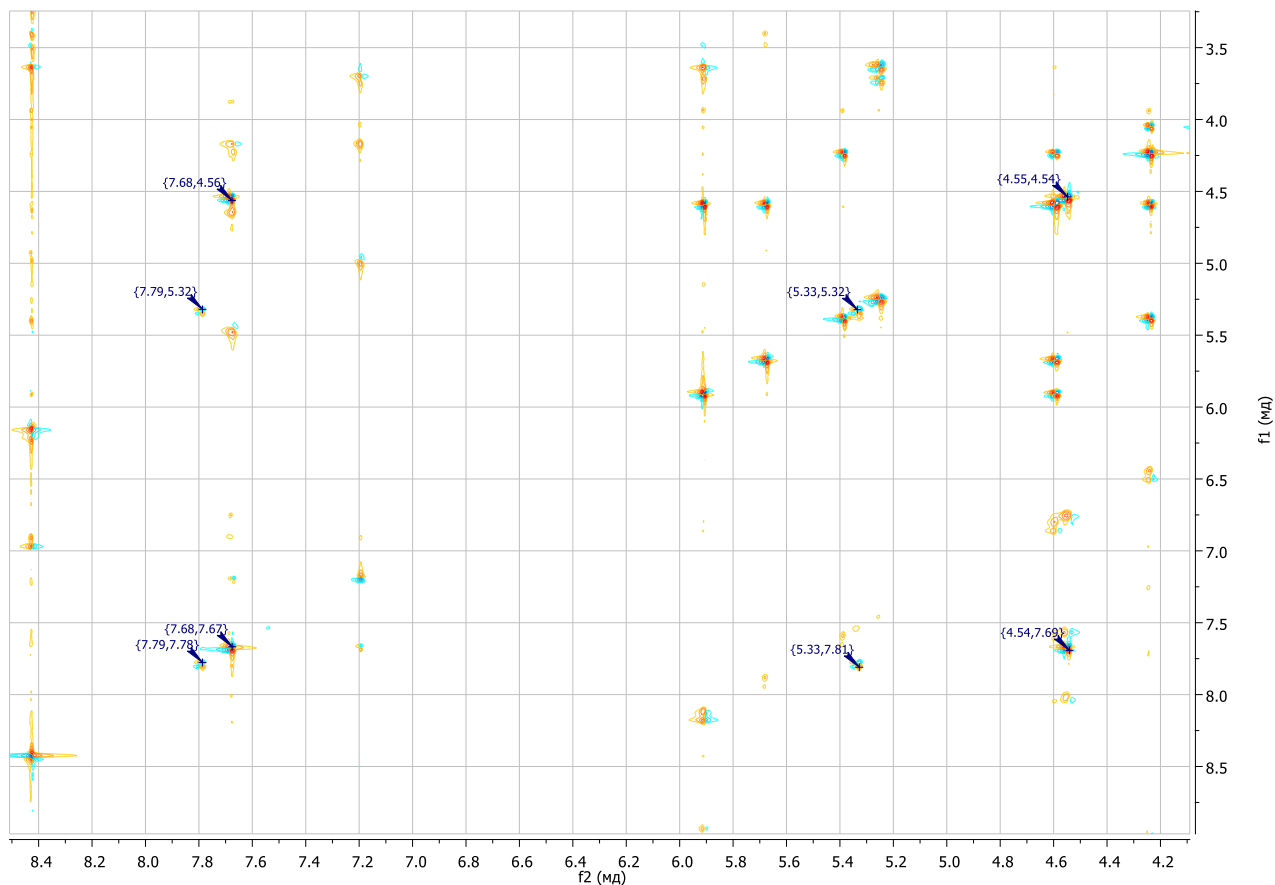


Рисунок 49 – Фрагмент спектра COSY ЯМР производного валина **7b**

Из литературных данных известно, что при наличии amino- и имино-форм химсдвиги N^6 значительно отличаются (примерно 90 и 244 м.д., соответственно) [242]. В спектрах ЯМР 2-хлорзамещенных аденозинов наблюдаемые химсдвиги N^6 составляли 101.1 (мини-форма) и 93.1 (основная форма) м.д. Из приведенных Novotná и соавторами данных [242] можно сделать вывод, что мини-форма присутствовала и для описанных в статье соединений. По приведенным данным, химсдвиг основного сигнала атома N^7 составил 242.87 м.д., а сигнал при 244.21 м.д. отнесен к 1H-имино форме. Однако этот сигнал скорее соответствует мини-форме сигнала N^7 пурина. В проанализированных спектрах ЯМР присутствует аналогичный соответствующий пик.

Кроме того, amino-иминотаутомерия должна сильно влиять на химический сдвиг в спектре ^{15}N ЯМР азота N^6H . На основании доступных экспериментальных данных и квантовых расчетов можно ожидать значительных изменений химического сдвига порядка сотни м.д. [257, 258]. Однако наши экспериментальные данные выявили изменения химического сдвига азота N^6H между основной и мини-формами в районе 4–20 м.д. (Таблица 18). Следовательно, гипотеза amino-иминотаутомерии, предложенная ранее

[242], была отвергнута как несогласующаяся с экспериментальными данными, полученными в настоящей работе.

Также была рассмотрена гипотеза таутомерии с образованием амидоподобной частичной двойной связи C6–N⁶ вместо двойной иминосвязи. Несмотря на то, что это объяснило бы устойчивую плоскую заторможенную структуру, в спектрах наших соединений химический сдвиг протона N⁶H претерпел бы существенные изменения, однако это не так (Таблица 18). Примечательно, что в разных соединениях сигнал протона N⁶H демонстрировал сдвиг как в сильное, так и в слабое поле. Поэтому эта гипотеза также была отвергнута.

Образование мини-формы можно объяснить затрудненным вращением, которое возникает не из-за стерических факторов, а из-за наличия стабилизирующей водородной связи. Допустим, в основной форме аминокислотный заместитель свободно вращается вокруг связи N⁶–C6, а в мини-форме структура находится в заторможенном состоянии (Рисунок 50, на примере валинового производного **7b**). Соединения-исключения, для которых мини-формы обнаружено не было – производные бета-аминоизобутилового спирта – не имеют в структуре протона N₆HCH₂, что наталкивает на мысль о вовлеченности этого протона в образование предполагаемой водородной связи.

Затрудненная структура может быть обусловлена образованием внутримолекулярной водородной связи между протоном N⁶CH и атомом пурина N7 с образованием стабильного шестичленного цикла. Изменение химических сдвигов атомов, затронутое образованием затрудненной структуры, показано на рисунке (Рисунок 50).

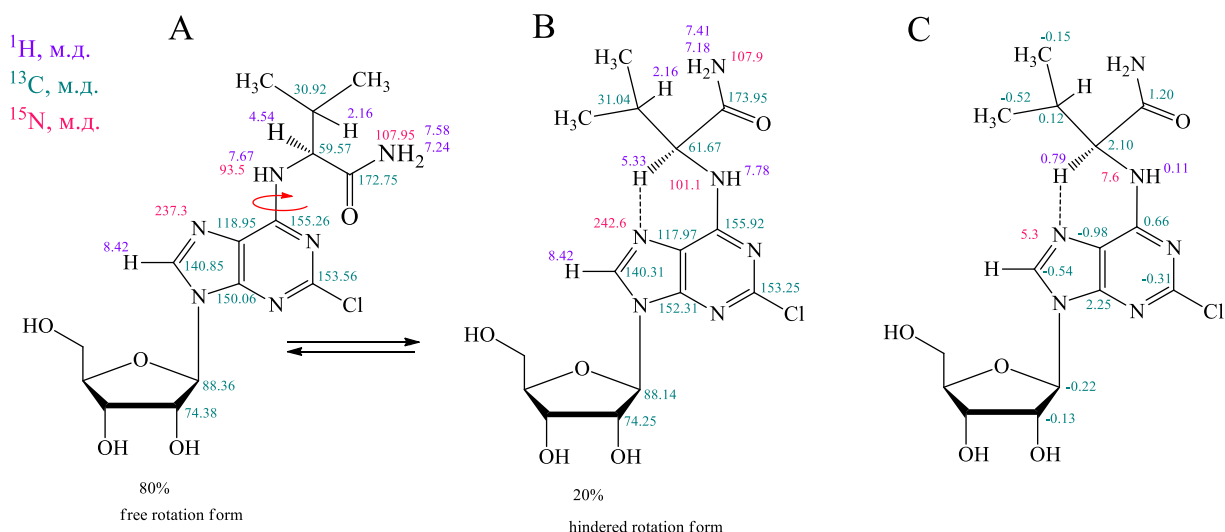


Рисунок 50 – Химические сдвиги основного компонента (A) и мини-формы с водородной связью N⁶CH[⋯]N7 (B) соединения **7b** и различия между ними (C). Показаны только химические сдвиги, которые различаются между формами

Известно, что наличие водородной связи можно обнаружить по спектру ЯМР как для пуринового гетероцикла в составе дуплексов [259], так и для аминокислот в белках [260]. Кросс-пики в многомерных спектрах ЯМР появляются либо из-за спин-спинового взаимодействия между двумя ядрами (взаимодействие через ковалентные связи), либо из-за эффектов кросс-релаксации в пространстве (пространственные взаимодействия в спектрах NOESY или ROESY). Подобные дальние связи используются в специально разработанных методах ЯМР, используемых для обнаружения водородных связей в белках [260] и парах оснований нуклеиновых кислот [259]. Эксперимент ^1H - ^{15}N НМВС был использован для подтверждения внутримолекулярной водородной связи $\text{O}-\text{H}\cdots\text{N}$ [258] или $\text{N}-\text{H}\cdots\text{N}$ [261]. В нескольких обзорах широко обсуждались многочисленные примеры различных водородных связей, подтвержденных ЯМР [262, 263]. Однако ранее не сообщалось об использовании эксперимента ЯМР ^{15}N НМВС для обнаружения описанной необычной водородной связи $\text{C}-\text{H}\cdots\text{N7}$. Такое взаимодействие должно проявиться как кросс-пик между протоном N^6CH и азотом N7 пуринового гетероцикла в спектре ^1H , ^{15}N -НМВС, зарегистрированном при высокой концентрации вещества.

Был получен спектр ^1H , ^{15}N -НМВС при повышенной концентрации вещества **7b** (770 мг/мл в $\text{DMSO}-d_6$). В этом спектре был обнаружен кросс-пик между сигналами пуринового атома N7 и протона N^6CH мини-формы (Рисунок 51), что указывает на наличие дальнего взаимодействия (Рисунок 50, Рисунок 48). Аналогичный кросс-пик для основной формы отсутствовал, несмотря на большую концентрацию основной формы по сравнению с мини-формой (Рисунок 51).

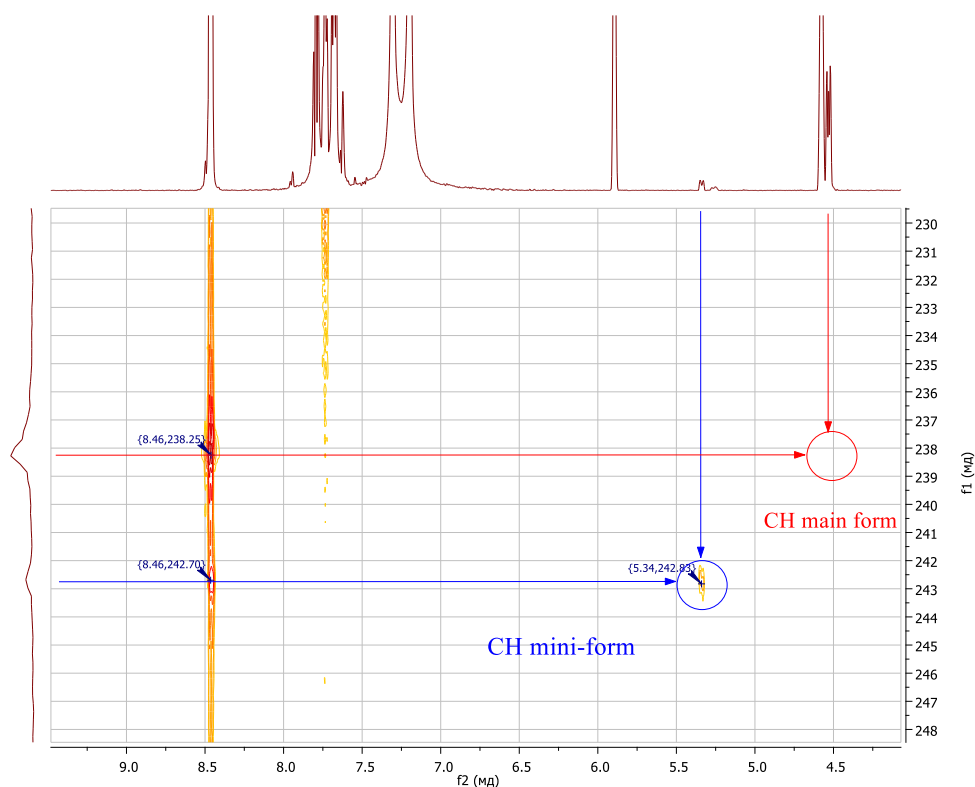


Рисунок 51 – Фрагмент спектра ^1H , ^{15}N -HMBC производного валина **7b** (293 K)

В случае гипотезы таутомерии этот кросс-пик можно объяснить только взаимодействием через пять связей (Рисунок 48, жирные линии), что маловероятно, и нельзя объяснить его отсутствие в основной форме. Следовательно, этот кросс-пик делает гипотезу возникновения водородной связи предпочтительной по сравнению с гипотезой таутомерии.

Эксперимент ЯМР ^{15}N HMBC выявил еще один кросс-пик, возникший из-за дальних спин-спиновых взаимодействий ядер ^1H и ^{15}N . Отчетливо наблюдался кросс-пик описанной ранее водородной связи между 5'-ОН и пурином N3 [264] в спектре (Рисунок 51, кросс-пик [5,26; 221,56]). Подтверждение пространственного сближения и возникновения водородной связи позволяют с точностью утверждать, что такие типы связи можно обнаружить в двумерном спектре HMBC ^1H - ^{15}N , если в снимаемом образце вещество находится в высокой концентрации.

Чтобы экспериментально подтвердить эту теорию, были синтезированы два модельных нуклеозида, не способных образовывать водородную связь $\text{N}^6\text{CH}\cdots\text{N}7$ из-за отсутствия протона N^6CH (N^6 -трет-бутил-2-хлораденозин **47**) или отсутствия азота N7 в гетероцикле 8-аза-7-дезапуринового производного **48** (Рисунок 52).

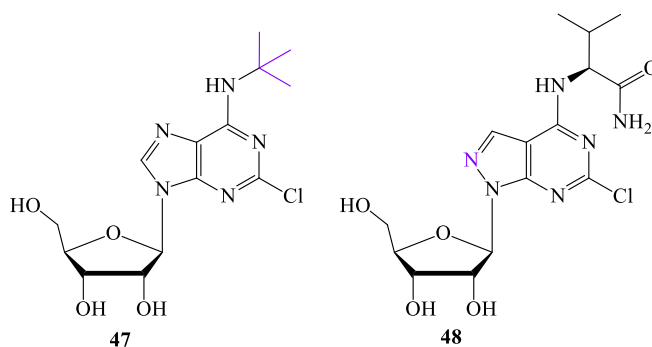


Рисунок 52 – Структуры нуклеозидов, неспособных к образованию внутримолекулярной водородной связи $N^6CH \cdots N7$

Синтез N^6 -*tert*-бутил-2-хлораденозина **47** проводили по описанному ранее двухэтапному методу получения 2-хлор- N^6 -замещенных производных аденозина (Схема 21). Реакцию нуклеофильного замещения проводили в ацетонитриле в присутствии триэтиламина в качестве основания. Для удаления ацетильных защитных групп с полученного нуклеозида триацетат **49** обрабатывали насыщенным раствором аммиака в метаноле при 4 °С с получением соответствующего нуклеозида **47**.

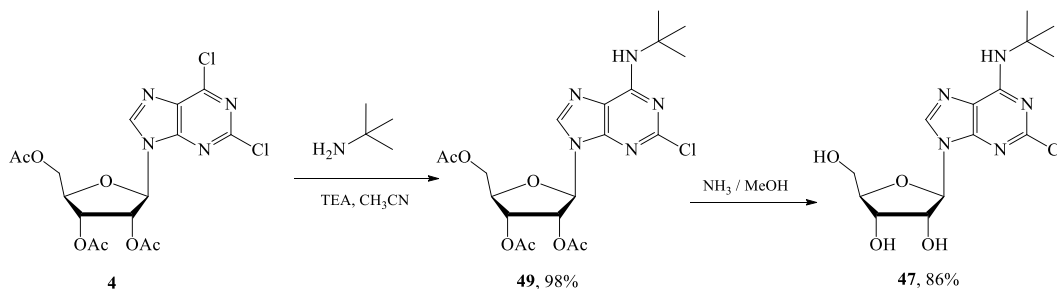


Схема 21 – Синтез 2-хлор- N^6 -*tert*-бутил-аденозина **44**

Синтез 8-аза-7-дезапуринового производного **48** был проведен А.Р.Башориным под руководством И.В.Фатеева в лаборатории Биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений ИБХ РАН.

Нуклеозиды были охарактеризованы спектрами ЯМР 1H , ^{13}C , COSY, 1H , ^{13}C HSQC, 1H , ^{13}C HMBC, 1H , ^{15}N HSQC и 1H , ^{15}N HMBC. Сигналов второй формы нуклеозидов в ЯМР не наблюдалось (Рисунок 53, Рисунок 54), что подтверждает вклад исключенных из описанных структур атомов в образование внутримолекулярной водородной связи.

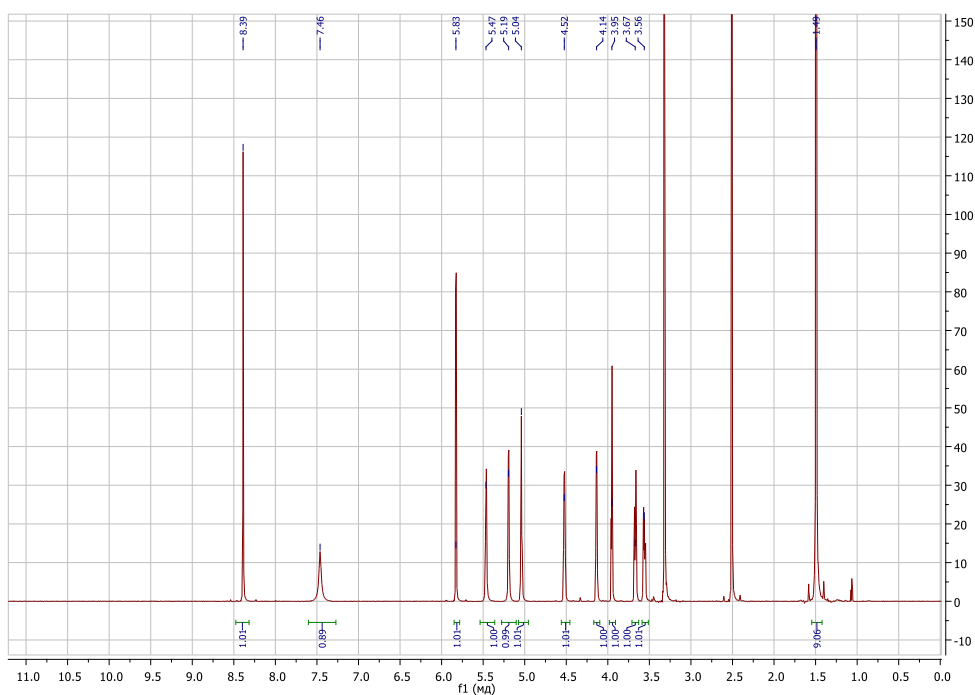


Рисунок 53 – Спектр ^1H ЯМР 2-хлор- N^6 -трет-бутил-аденозина **47** (303 К)

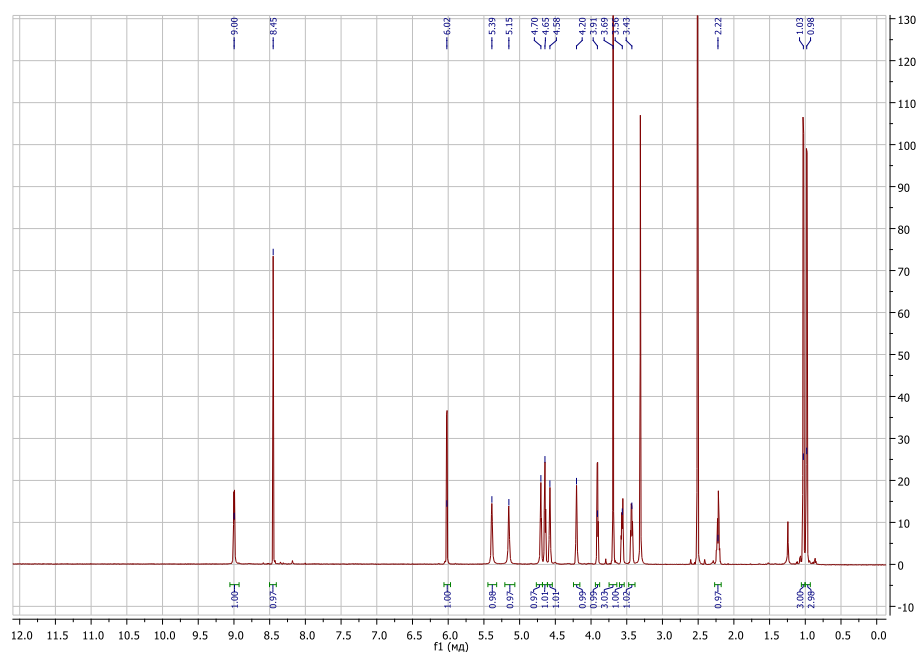


Рисунок 54 – Спектр ^1H ЯМР нуклеозида 8-аза-7-дезапуринового производного **48** (303 К)

Таким образом, набор полученных экспериментальных данных однозначно свидетельствует о наличии впервые обнаруженной необычной водородной связи $\text{CH}\cdots\text{N}$ в 2-хлор- N^6 -замещенных аналогах аденозина. Были рассмотрены альтернативные гипотезы, связанные с амино-иминотаутомерией, и они были исключены из-за несоответствия данным ЯМР, приведенным в настоящей работе. Были синтезированы и изучены

модельные нуклеозиды. Было показано, что сигналы второй формы не наблюдаются в спектрах ЯМР соединений, не имеющих или пуринового атома N7, или протона N⁶СН заместителя.

Основная форма соответствует свободному вращению вокруг связи С6-N⁶, а мини-форма появляется из-за конформации заторможенного вращения, в которой заместитель при N⁶ находится в *анти*-положении по отношению к атому N1 пуринового гетероцикла. Фактором стабилизации *анти*-положения заместителя при С6 является образование нового типа внутримолекулярной водородной связи между СН протоном заместителя и N7 атомом пурина. Появление сигналов второй формы в спектрах ЯМР N⁶-замещенных нуклеозидов 2-хлораденозина впервые было объяснено образованием внутримолекулярной водородной связи между протоном заместителя N⁶СН и атомом азота N7 пуринового основания. Наличие этой водородной связи было подтверждено при помощи данных двумерного гетероядерного спектра ¹H-¹⁵N НМВС.

В спектрах ЯМР полученных аналогов 2-хлораденозина обнаружена не изученная ранее закономерность образования второй формы. При помощи ряда экспериментов ЯМР и химического синтеза модельных соединений доказан факт возникновения не описанной ранее затрудненной конформации, стабилизированной водородной связью между N7 атомом пурина и СН протоном заместителя при N⁶ атоме аденозина.

Полученные результаты опубликованы в статье Berzina M. Y. et al. Intramolecular Hydrogen Bonding in N⁶-Substituted 2-Chloroadenosines: Evidence from NMR Spectroscopy //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 11. – С. 9697.

3. Экспериментальная часть

3.1. Материалы и методы

В работе использовали коммерческие растворители и реактивы отечественного производства со степенью чистоты «ХЧ» и выше, а также реактивы Sigma-Aldrich (США), не требующие дополнительной очистки. Пурииннуклеозидфосфорилаза PNP (концентрация белка, определенная по методу Бредфорд, – 28 мг/мл, активность 50 е.а./мг белка) и уридинфосфорилаза UP (концентрация белка, определенная по методу Бредфорд, – 17 мг/мл, активность 100 ед.акт./мг белка) были получены ранее в лаборатории Биофармацевтических технологий ИБХ РАН под руководством Р. С. Есипова, по методике [265].

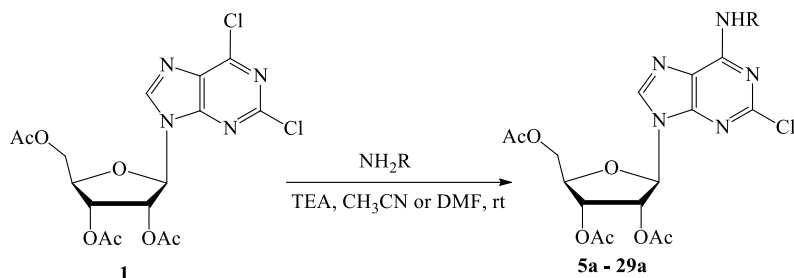
Для колоночной хроматографии использовали Silica gel 60 (Fluka); Silica gel 100/160, Merck, Germany; Silica gel 40/100, Merck, Germany; для обращенно-фазовой колоночной хроматографии использовали Separon SGX C18 60 (Tessek Ltd, Czech Republic). Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали силикагелевые пластинки (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Germany), если не указано иное. ВЭЖХ проводилась на системе Waters (Waters 1525, Waters 2487, Breeze 2; США), колонка Nova Pack C18, 4 μm , 4.6 \times 150 мм, элюент А: 0.1% TFA в H_2O , элюент В: 0.1 % TFA, 70 % MeCN в H_2O , скорость потока – 1 мл/мин, детектирование осуществляли при 254 и 280 нм.

УФ спектры были записаны на УФ-спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония) 150 Вт. Спектры излучения измерялись на однолучевом люминесцентном спектрометре PerkinElmer LS 55, работающим в режиме флуоресценции, с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см. Источник – ксеноновая лампа, работающая в пульсирующем режиме с частотой 50 Гц. Управление прибором осуществлялось с персонального компьютера под управлением ПО FL WinLab. Спектры возбуждения записывали в пределах длин волн 200–380 нм, при эмиссии на длине волны для водных растворов 432 нм, для растворов в ацетонитриле 405 нм. Спектральная ширина щели: возбуждение 3.5 нм, эмиссия 5.0 нм, скорость сканирования 60 нм/мин. Спектры эмиссии записывали в пределах длин волн 300–500 нм, при возбуждении на длине волны 250 нм. Спектральная ширина щели: возбуждение 7.0 нм, эмиссия 10.0 нм, скорость сканирования 60 нм/мин. Масс-спектры записывали на приборе Agilent 6224, ESI-TOF, LC/MS (США) в положительном поле (ESI+) (если не указано иное).

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance DRX-700 в $\text{DMSO}-d_6$ при 303 К. Рабочая частота для ^1H -ЯМР – 700 МГц, для ^{13}C – 176 МГц, для ^{15}N – 71 МГц.

Химические сдвиги приведены в м.д. (δ) относительно остаточных сигналов протонов DMSO- d_6 (2.508 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Константы спин-спинового взаимодействия (J) приведены в Гц.

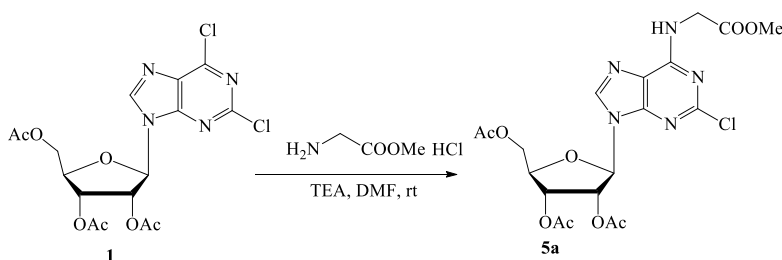
3.2. Конденсация 2,6-дихлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)пурина N-нуклеофилами



Общая методика проведения реакции

К раствору 2.00 г (4.5 ммоль) **1** и 6.4 ммоль гидрохлорида метилового эфира аминокислоты в 60 мл сухого ДМФА или CH_3CN при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли 1.76 мл (12.8 ммоль) ТЕА, смесь перемешивали при комнатной температуре 18 часов, контролируя прохождение реакции при помощи ТСХ в системе хлороформ-метанол, 30:1. После окончания реакции отфильтровывали кристаллы гидрохлорида триэтиламина и упаривали реакционную смесь. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и очищали при помощи колоночной хроматографии на колонке объемом 100 мл с силикагелем 100/160. Элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0–20%, 500 мл). Получали продукты **5a–29a**. Чистоту соединений определяли по ВЭЖХ, градиент 0–100В за 20 мин, детектирование при 254 нм, если не указано иное.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-глицина (**5a**)



Выход 2.20 г (95%) с чистотой 97.07% (t_R 14.050 мин).

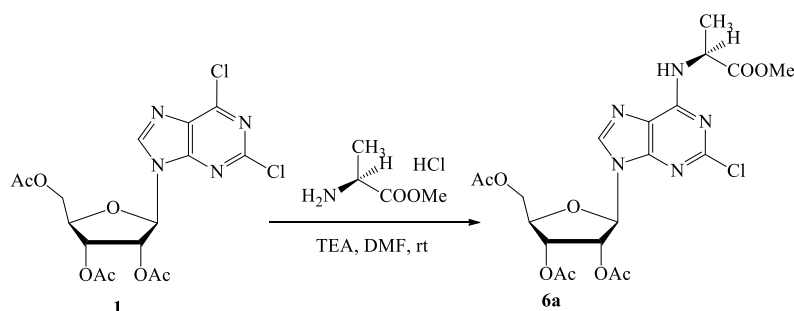
^1H ЯМР: δ 8.74 и 8.54 (2 т, $J = 4.8$ и $J = 4.7$, 0.74 и 0.24 Н, NH), 8.45 и 8.39 (2 с, 0.79 и 0.21 Н, Н8), 6.18 и 6.17 (2 д, $J = 5.6$ и $J = 5.3$, 1 Н, Н_{1'}), 5.91 (м, 1 Н, Н_{2'}), 5.59 (м, 1 Н, Н_{3'}), 4.61 и 4.19 (2 м, 0.41 и 1.57 Н, $^{\alpha}\text{CH}_2\text{-Gly}$), 4.40 (м, 1 Н, Н_{4'}), 4.39 (м, 1 Н, Н_{5'a}), 4.27 (дд, $J = 13.0$, 6.6, 1 Н, Н_{5'b}), 3.67 и 3.65 (2 с, 3 Н, OCH₃), 2.13 (с, 3 Н, CH₃COO_{3'}), 2.06 (с, 3 Н, CH₃COO_{2'}), 2.03 м. д. (с, 3 Н, CH₃COO_{5'}).

^{13}C ЯМР: δ 169.94 (COOCH₃), 169.90 (CH₃COO_{5'}), 169.30 (CH₃COO_{3'}), 169.15 (CH₃COO_{2'}), 154.88 (C6), 153.00 (C2), 149.47 (C4), 140.66 (C8), 118.65 (C5), 85.36 (C_{1'}), 79.53 (C_{4'}), 71.98 (C_{2'}), 69.86 (C_{3'}), 62.59 (C_{5'}), 51.77 (COOCH₃), 44.09 мини-форма и 41.63 ($^{\alpha}\text{CH}_2\text{-Gly}$), 20.35 (CH₃COO_{5'}), 20.25 (CH₃COO_{3'}), 20.09 м. д. (CH₃COO_{2'}).

^{15}N ЯМР: δ 241.8 (N7), 228.4 (N1), 167.1 (N9), 85.4 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₉H₂₂N₅O₉Cl [M+H]⁺ 500.1186, найдено 500.1201.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-аланина (6a)



Выход 2.09 г (90%) с чистотой 97.30% (t_{R} 14.773 мин).

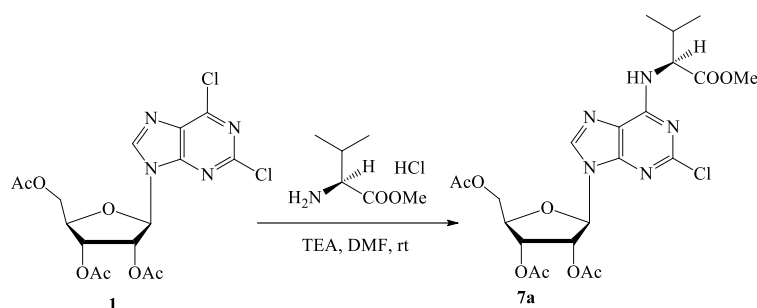
^1H NMR: δ 8.80 и 8.63 (2 д, $J = 6.8$ и $J = 7.6$, 0.73 и 0.21 Н, NH), 8.46 и 8.39 (2 с, 0.75 и 0.23 Н, Н8), 6.18 и 6.16 (д, $J = 5.3$ и м, 1 Н, Н_{1'}), 5.90 (т, $J = 5.5$, 1 Н, Н_{2'}), 5.59 (м, 1 Н, Н_{3'}), 5.43 и 4.71 (2 м, 0.21 и 0.74 Н, $^{\alpha}\text{CH-Ala}$), 4.39 (м, 2 Н, Н_{5'a} и Н_{4'}), 4.27 (м, 1 Н, Н_{5'b}), 3.65 и 3.63 (2 с, 3 Н, OCH₃), 2.13 (с, 3 Н, CH₃COO_{3'}), 2.06 (с, 3 Н, CH₃COO_{2'}), 2.02 (с, 3 Н, CH₃COO_{5'}), 1.48 м. д. (д, $J = 7.3$, 3 Н, $^{\beta}\text{CH}_3\text{-Ala}$).

^{13}C NMR: δ 172.69 (COOCH₃), 169.90 (CH₃COO_{5'}), 169.30 (CH₃COO_{3'}), 169.15 (CH₃COO_{2'}), 154.31 (C6), 152.89 (C2), 149.59 (C4), 140.46 (C8), 118.43 (C5), 85.32 (C_{1'}), 79.51 (C_{4'}), 72.04 (C_{2'}), 69.84 (C_{3'}), 62.60 (C_{5'}), 51.88 (COOCH₃), 51.10 мини-форма и 48.70 ($^{\alpha}\text{CH-Ala}$), 20.35 (CH₃COO_{5'}), 20.25 (CH₃COO_{3'}), 20.08 (CH₃COO_{2'}), 16.57 м. д. ($^{\beta}\text{CH}_3\text{-Ala}$).

^{15}N NMR: δ 242.5 (N7), 228.6 (N1), 167.3 (N9), 106.2 мини-форма и 99.6 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₀H₂₄N₅O₉Cl [M+H]⁺ 514.1335, найдено 514.1333.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-валина (7a)



Выход 2.17 г (89%) с чистотой 96.51% (t_R 15.767 мин).

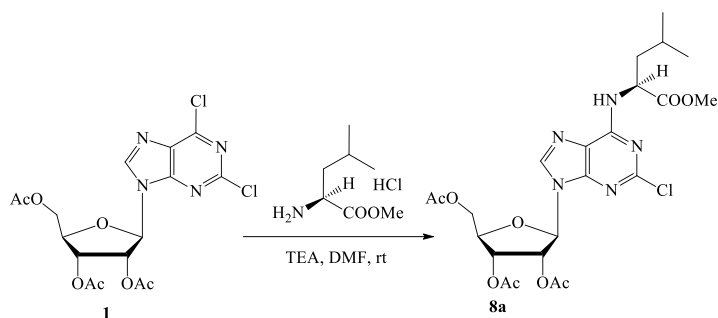
1H ЯМР: δ 8.80 и 8.63 (2 д, $J = 6.8$ и $J = 7.6$, 0.73 и 0.21 H, NH), 8.46 и 8.39 (2 с, 0.75 и 0.23 H, H8), 6.18 и 6.16 (д, $J = 5.3$ и м, 1 H, H_{1'}), 5.90 (т, $J = 5.5$, 1 H, H_{2'}), 5.59 (м, 1 H, H_{3'}), 5.43 и 4.71 (2 м, 0.21 и 0.74 H, $^{\alpha}CH-Ala$), 4.39 (м, 2 H, H_{5'a} и H_{4'}), 4.27 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.65 и 3.63 (2 с, 3 H, OCH₃), 2.13 (с, 3 H, CH₃COO_{3'}), 2.06 (с, 3 H, CH₃COO_{1'}), 2.02 (с, 3 H, CH₃COO_{5'}), 1.48 м. д. (д, $J = 7.3$ Гц, 3 H, $^{\beta}CH_3-Ala$).

^{13}C ЯМР: δ 172.69 (COOCH₃), 169.90 (CH₃COO_{5'}), 169.30 (CH₃COO_{3'}), 169.15 (CH₃COO_{2'}), 154.31 (C6), 152.89 (C2), 149.59 (C4), 140.46 (C8), 118.43 (C5), 85.32 (C_{1'}), 79.51 (C_{4'}), 72.04 (C_{2'}), 69.84 (C_{3'}), 62.60 (C_{5'}), 51.88 (COOCH₃), 51.10 мини-форма и 48.70 ($^{\alpha}CH-Ala$), 20.35 (CH₃COO_{5'}), 20.25 (CH₃COO_{3'}), 20.08 (CH₃COO_{2'}), 16.57 м. д. ($^{\beta}CH_3-Ala$).

^{15}N ЯМР: δ 242.5 (N7), 228.6 (N1), 167.3 (N9), 106.2 мини-форма и 99.6 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₀H₂₄N₅O₉Cl [M+H]⁺ 514.1335, найдено 514.1333.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-лейцина (8a)



Выход 2.23 г (89%) с чистотой 97.40% (50В–100В за 20 мин, t_R 10.693 мин).

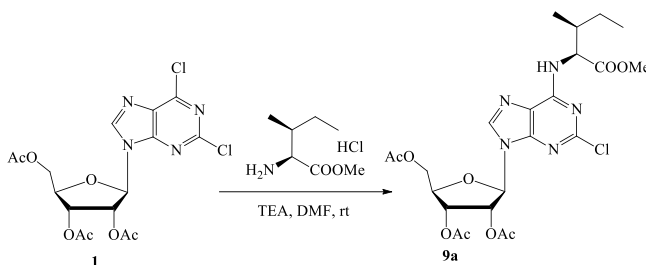
1H ЯМР: δ 8.78 (д, $J = 7.7$, 0.70 H, NHCH), 8.61 (д, $J = 8.9$, 0.25 H, NHCH мини-форма), 8.46 (с, 0.71 H, H8), 8.40 (с, 0.26 H, H8 мини-форма), 6.18 и 6.17 (д, $J = 5.6$ и м, 1 H, H_{1'}), 5.91 и 5.90 (т, $J = 5.6$ и м, 1 H, H_{2'}), 5.60 (м, 1 H, H_{3'}), 5.54 (м, 0.26 H, $^{\alpha}CH-Leu$ мини-форма), 4.72 (м, 0.71 H, $^{\alpha}CH-Leu$), 4.39 (м, 2 H, H_{5'a} и H_{4'}), 4.28 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.65 и 3.63 (2с, 3 H, $^{\alpha}CH-COOCH_3$), 2.13 (с, 3 H, CH₃COO_{3'}), 2.06 (с, 3 H, CH₃COO_{2'}), 2.03 (с, 3 H, CH₃COO_{5'}), 1.94 (м, 0.81 H, $^{\beta}CH_2^{Leu}$), 1.80 (м, 0.14 H, $^{\gamma}CH^{Leu}$), 1.69 (м, 0.82 H, $^{\gamma}CH^{Leu}$), 1.62 (м, 0.88 H, $^{\beta}CH_2^{Leu}$), 0.92 (д, $J = 6.6$, 3 H, $^{\delta}CH_3^{Leu}$), 0.89 и 0.87 м. д. (д, $J = 6.5$, и м, 3.24 H, $^{\delta}CH_3^{Leu}$).

^{13}C ЯМР: δ 172.88 ($\alpha\text{CH-COOCH}_3$), 172.58 ($\alpha\text{CH-COOCH}_3$), 169.88 (CH_3COO_5), 169.28 (CH_3COO_3), 169.14 (CH_3COO_2), 155.63 С6 мини-форма), 154.74 (С6), 152.92 (С2), 151.45 (С4 мини-форма), 149.59 (С4), 140.46 (С8), 140.21 (С8 мини-форма). 118.47 (С5), 117.62 (С5 мини-форма), 85.36 (С $_1$), 79.51 (С $_4$), 72.00 (С $_2$), 69.86 (С $_3$), 62.60 (С $_5$), 53.88 ($\alpha\text{CH}^{\text{Leu}}$ мини-форма), 52.04 ($\alpha\text{CH-COOCH}_3$ мини-форма), 51.87 ($\alpha\text{CH-COOCH}_3$), 51.37 ($\alpha\text{CH}^{\text{Leu}}$), 38.83 ($\beta\text{CH}_2^{\text{Leu}}$), 39.55 ($\gamma\text{CH}^{\text{Leu}}$), 22.79 ($\delta\text{CH}_3^{\text{Leu}}$), 20.73 ($\delta\text{CH}_3^{\text{Leu}}$ мини-форма), 20.35 (CH_3COO_5), 20.26 (CH_3COO_3), 20.10 м. д. (CH_3COO_2).

^{15}N ЯМР: δ 242.3 и 242.7 мини-форма (N7), 228.1 (N1), 167.1 и 166.6 (N9), 96.4 и 103.5 м. д. (NH^{Leu}).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_9\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 556.1810, найдено 556.1830.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-изолейцина (9a)



Выход 2.45 г (98%) с чистотой 94.40% (50В–100В за 20 мин, t_{R} 8.389 мин).

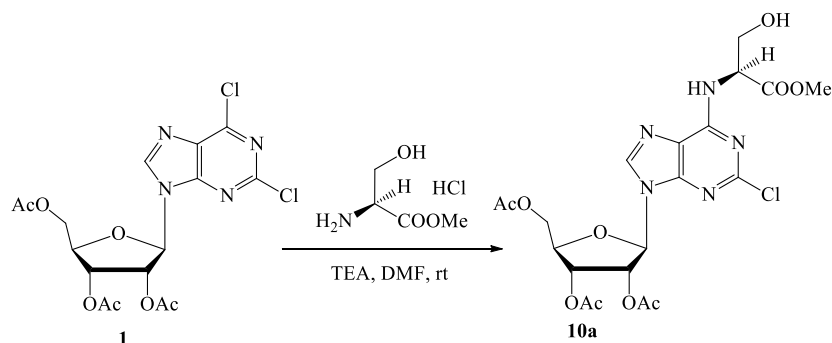
^1H ЯМР: δ 8.64 (д, $J = 7.3$, 0.67 Н, NHCH), 8.51 (м, 0.28 Н, NHCH), 8.47 (с, 0.70 Н, Н8), 8.41 (с, 0.30 Н, Н8), 6.18 (м, 1 Н, Н $_1$), 5.90 (м, 1 Н, Н $_2$), 5.59 (м, 1 Н, Н $_3$), 5.53 (м, 0.28 Н, $\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$), 4.52 (м, 0.69 Н, $\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$), 4.39 (м, 2 Н, Н $_5^{\text{a}}$ и Н $_4$), 4.27 (м, 1 Н, Н $_5^{\text{b}}$), 3.65 и 3.64 (2с, 3 Н, $\alpha\text{CH-COOCH}_3$), 2.13 (с, 3 Н, CH_3COO_3), 2.09 (м, 0.65 Н, $\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$), 2.06 (с, 3 Н, CH_3COO_2), 2.03 (с и м, 3.46 Н, CH_3COO_5 и $\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$), 1.55 (м, 0.71 Н, $\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.46 (м, 0.31 Н, $\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.37 (м, 0.33 Н, $\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.29 (м, 0.77 Н, $\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 0.93 (м, 3 Н, $\gamma\text{CH}_3^{\text{Ile}}$), 0.87 м. д. (м, 3 Н, $\delta\text{CH}_3^{\text{Ile}}$).

^{13}C ЯМР: δ 171.79 ($\alpha\text{CH-COOCH}_3$), 169.88 (CH_3COO_5), 169.28 (CH_3COO_3), 169.14 (CH_3COO_2), 155.61 (С6 мини-форма), 154.70 (С6), 152.85 (С2), 151.53 (С4 мини-форма), 149.66 (С4), 140.43 (С8), 140.04 (С8 мини-форма). 118.46 (С5), 117.59 (С5 мини-форма), 85.33 (С $_1$), 79.51 (С $_4$), 72.03 (С $_2$), 69.85 (С $_3$), 62.60 (С $_5$), 59.86 ($\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$ мини-форма), 57.86 ($\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$), 51.75 ($\alpha\text{CHCOOCH}_3$ мини-форма), 51.54 ($\alpha\text{CH-COOCH}_3$), 36.84 ($\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$), 35.31 ($\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$), 25.27 ($\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 24.50 ($\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 20.33 (CH_3COO_5), 20.23 (CH_3COO_3), 20.08 (CH_3COO_2), 15.30 ($\gamma\text{CH}_3^{\text{Ile}}$), 10.69 м. д. ($\delta\text{CH}_3^{\text{Ile}}$).

^{15}N ЯМР: δ 243.3 мини-форма и 242.5 (N7), 228.5 (N1), 167.1 и 116.3 (N9), 95.7 и 101.4 м. д. (NH^{Ile}).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_9\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 556.1810, найдено 556.1831.

**Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-
пурин-6-ил]-L-серина (10a)**



Выход 2.09 г (90%) с чистотой 97.30% (t_R 14.773 мин).

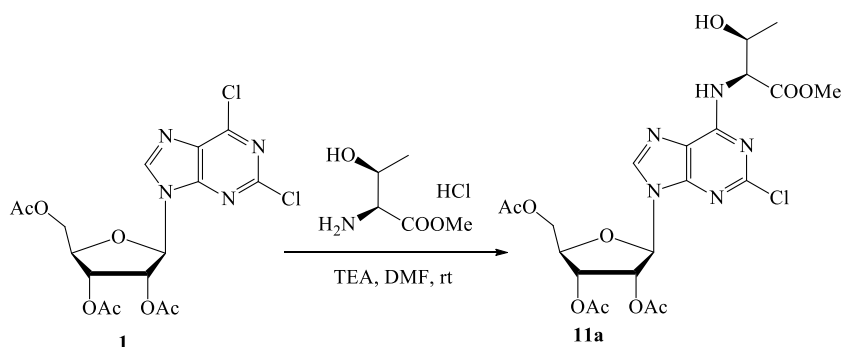
1H ЯМР: δ 8.48 и 8.41 (2 с, 0.76 и 0.22 H, H8), 8.29 и 8.24 (д, $J = 7.5$, и м, 0.76 и 0.21 H, NH), 6.19 и 6.17 (д, $J = 4.9$ и м, 1 H, H_{1'}), 5.91 (т, $J = 5.6$, 1 H, H_{2'}), 5.59 (т, $J = 5.1$, 1 H, H_{3'}), 5.50 и 4.77 (м, 0.21 и 0.75 H, $^{\alpha}CH-Ser$), 5.14 и 5.07 (т, $J = 6.2$, и м, 0.77 и 0.22 H, OH-Ser), 4.39 (м, 2 H, H_{5'a} и H_{4'}), 4.27 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.89 (м, 2 H, $^{\beta}CH_2-Ser$) 3.67 и 3.65 (2 с, 3 H, OCH₃), 2.13 (с, 3 H, CH₃COO_{3'}), 2.06 (с, 3 H, CH₃COO_{2'}), 2.03 м. д. (с, 3 H, CH₃COO_{5'}).

^{13}C ЯМР: δ 170.57 (COOCH₃), 169.91 (CH₃COO_{5'}), 169.31 (CH₃COO_{3'}), 169.17 (CH₃COO_{2'}), 154.64 (C6), 152.92 (C2), 149.58 (C4), 140.70 (C8), 118.59 (C5), 85.38 (C_{1'}), 79.55 (C_{4'}), 72.05 (C_{2'}), 69.86 (C_{3'}), 62.60 (C_{5'}), 60.88 ($^{\beta}CH_2-Ser$), 55.97 ($^{\alpha}CH-Ser$), 51.96 (COOCH₃), 20.35 (CH₃COO_{5'}), 20.25 (CH₃COO_{3'}), 20.09 м. д. (CH₃COO_{2'}), мини-форма: 170.72 (COOCH₃), 170.57 (COOCH₃), 169.91 (CH₃COO_{5'}), 169.31 (CH₃COO_{3'}), 169.17 (CH₃COO_{2'}), 155.54 (C6), 152.92 (C2), 151.49 (C4), 140.25 (C8), 117.81 (C5), 85.20 (C_{1'}), 79.55 (C_{4'}), 71.97 (C_{2'}), 69.86 (C_{3'}), 62.60 (C_{5'}), 61.56 ($^{\beta}CH_2-Ser$), 58.54 ($^{\alpha}CH-Ser$), 52.04 (COOCH₃), 20.35 (CH₃COO_{5'}), 20.25 (CH₃COO_{3'}), 20.09 м. д. (CH₃COO_{2'}).

^{15}N ЯМР: δ 241.6 (N7), 228.1 (N1), 167.2 (N9), 91.5 м. д. (NH), мини-форма: 243.0 (N7), 228.1 (N1), 166.2 (N9), 99.4 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₀H₂₄N₅O₁₀Cl [M+H]⁺ 530.1291, найдено 530.1293.

**Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-
пурин-6-ил]-L-треонина (11a)**



Выход 2.35 г (96%) с чистотой 98.64% (t_R 13.668 мин).

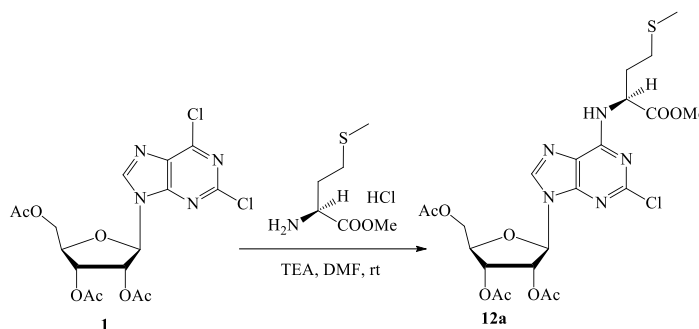
^1H ЯМР: δ 8.49 и 8.40 (2 с, 0.75 и 0.27 Н, Н8), 7.80 и 7.77 (2 д, $J = 9.5$ и $J = 8.2$, 0.25 и 0.74 Н, NH), 6.19 и 6.17 (2 д, $J = 5.3$ и $J = 5.2$, 0.73 и 0.25 Н, Н_{1'}), 5.91 и 5.89 (2 т, $J = 5.4$ и $J = 5.6$, 1 Н, Н_{2'}), 5.60 и 5.58 (т и уш.т, $J = 5.3$ и $J = 5.0$, 1 Н, Н_{3'}), 5.48 и 4.69 (уш. дд и дд, $J = 2.1$, 9.7, и $J = 3.5$, 8.2, 0.25 и 0.72 Н, $^{\alpha}\text{CH-Thr}$), 5.22 и 4.97 (2 д, $J = 7.7$ и $J = 7.5$, 0.75 и 0.26 Н, Thr-OH), 4.39 (м, 2 Н, Н_{5'a} и Н_{4'}), 4.27 (м, 2 Н, $^{\beta}\text{CH-Thr}$ и Н_{5'b}), 3.67 и 3.65 (2 с, 3 Н, OCH₃), 2.12 (с, 3 Н, CH₃COO_{3'}), 2.05 (с, 3 Н, CH₃COO_{2'}), 2.02 (с, 3 Н, CH₃COO_{5'}), 1.19 м. д. (д, $J = 6.5$, 3 Н, $^{\gamma}\text{CH}_3\text{-Thr}$).

^{13}C ЯМР: δ 170.78 (COOCH₃), 169.98 (O CH₃COO_{5'}), 169.38 (CH₃COO_{3'}), 169.23 (CH₃COO_{2'}), 155.03 (C6), 152.98 (C2), 149.60 (C4), 140.97 (C8), 118.69 и 117.68 мини-форма (C5), 85.53 и 85.33 мини-форма (C_{1'}), 79.59 и 79.08 мини-форма (C_{4'}), 72.08 (C_{2'}), 69.99 (C_{3'}), 66.77 мини-форма и 66.36 ($^{\beta}\text{CH-Thr}$), 62.63 (C_{5'}), 61.72 мини-форма и 59.27 ($^{\alpha}\text{CH-Thr}$), 52.05 (COOCH₃), 20.39 (CH₃COO_{5'}), 20.29 (CH₃COO_{3'}), 20.23 ($^{\gamma}\text{CH}_3\text{-Thr}$), 20.13 м. д. (CH₃COO_{2'}).

^{15}N ЯМР: δ 245.3 мини-форма и 240.9 (N7), 228.3 (N1), 167.7 (N9), 94.7 мини-форма и 87.8 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₁H₂₆N₅O₁₀Cl [M+H]⁺ 544.1441, найдено 544.1414.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-метионина (12a)



Выход 2.23 г (86%) с чистотой 95.24% (t_R 15.511 мин).

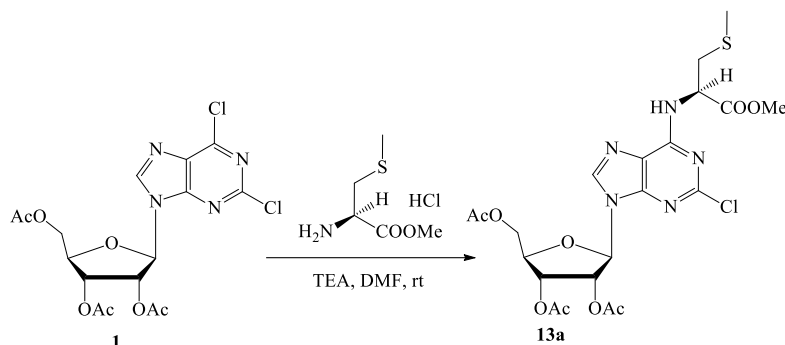
^1H ЯМР: δ 8.83 и 8.64 (2 д, $J = 7.7$ и $J = 7.4$, 0.71 и 0.23 Н, NH), 8.47 и 8.40 (2 с, 0.74 и 0.25 Н, Н8), 6.18 и 6.16 (2 д, $J = 5.3$ и $J = 5.7$, 1 Н, Н_{1'}), 5.91 и 5.89 (т, $J = 5.6$ и м, 1 Н, Н_{2'}), 5.59 (м, 1 Н, Н_{3'}), 5.54 и 4.82 (2 м, 0.20 и 0.73 Н, $^{\alpha}\text{CH-Met}$), 4.39 (м, 2 Н, Н_{5'a} и Н_{4'}), 4.27 (м, 1 Н, Н_{5'b}), 3.66 и 3.64 (2 с, 3 Н, OCH₃), 2.62 и 2.56 (2 м, 1.12 и 0.91 Н, $^{\gamma}\text{CH}_2\text{-Met}$), 2.21 и 2.12 (2 м, 0.75 и 1.43 Н, $^{\beta}\text{CH}_2\text{-Met}$), 2.12 (с и м, 3 и 1.43 Н, CH₃COO_{3'} и $^{\beta}\text{CH}_2\text{-Met}$), 2.06 и 2.05 (2 с, 6 Н, CH₃COO_{2'} и SCH₃), 2.02 м. д. (с, 3 Н, CH₃COO_{5'}).

^{13}C ЯМР: δ 172.06 (COOCH₃), 169.90 (CH₃COO_{5'}), 169.30 (CH₃COO_{3'}), 169.16 (CH₃COO_{2'}), 154.83 (C6), 152.87 (C2), 149.62 (C4), 140.56 (C8), 118.58 (C5), 85.37 (C_{1'}), 79.52 (C_{4'}), 72.01 (C_{2'}), 69.85 (C_{3'}), 62.61 (C_{5'}), 54.2 мини-форма и 52.07 ($^{\alpha}\text{CH-Met}$), 52.00 (OCH₃), 29.78 ($^{\beta}\text{CH}_2\text{-Met}$), 29.68 ($^{\gamma}\text{CH}_2\text{-Met}$), 20.37 (CH₃COO_{5'}), 20.25 (CH₃COO_{3'}), 20.09 (CH₃COO_{2'}), 14.38 м. д. (CH₃-Met).

^{15}N ЯМР: δ 242.7 (N7), 228.9 (N1) 167.4 (N9), 101.7 мини-форма и 95.3 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $C_{22}H_{28}N_5O_9ClS$ $[M+H]^+$ 574.1376, найдено 574.1364.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-(S-метил)-цистеина (13a)



Выход 1.59 г (63%) с чистотой 95.59% (t_R 14.743 мин).

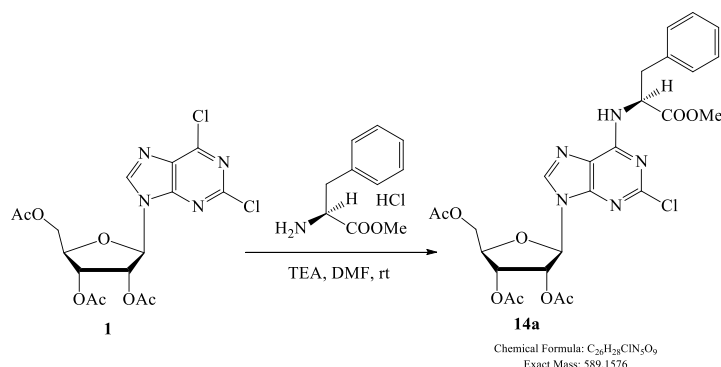
1H ЯМР: δ 8.77 и 8.63 (2 д, $J = 7.8$ и $J = 9.3$, 0.71 и 0.20 H, NHCH), 8.47 и 8.43 (2 с, 0.74 и 0.24 H, H8), 6.19 (д, $J = 4.8$, 1 H, H_{1'}), 5.91 (т, $J = 5.5$, 1 H, H_{2'}), 5.79 и 4.93 (2 м, 0.21 и 0.73 H, $^{\alpha}CH-Cys$), 5.59 (т, $J = 5.1$, 1 H, H_{3'}), 4.39 (м, 2 H, H_{5'a} и H_{4'}), 4.28 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.68 (м, 3 H, $COOCH_3$), 3.06 и 2.90 (2 м, 1.68 и 0.33 H, $^{\beta}CH_2-Cys$), 2.13 (с, 3 H, CH_3COO_3'), 2.11 (с, 3 H, CH_3S), 2.06 (с, 3 H, CH_3COO_2'), 2.03 м. д. (с, 3 H, CH_3COO_5').

^{13}C ЯМР: δ 170.87 ($COOCH_3$), 169.91 (CH_3COO_5'), 169.30 (CH_3COO_3'), 169.16 (CH_3COO_2'), 154.64 (C6), 152.87 (C2), 149.67 (C4), 140.70 (C8), 118.49 (C5), 85.40 (C_{1'}), 79.54 (C_{4'}), 72.00 (C_{2'}), 69.86 (C_{3'}), 62.60 (C_{5'}), 55.09 мини-форма и 52.16 (CH-Cys), 52.32 (OCH₃), 34.29 (CH₂-Cys), 20.35 (CH_3COO_5'), 20.25 (CH_3COO_3'), 20.10 (CH_3COO_2'), 14.84 м. д. (CH₃-S).

^{15}N ЯМР: δ 241.9 (N7), 227.7 (N1), 167.3 (N9), 102.74 мини-форма и 95.6 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $C_{21}H_{26}N_5O_9ClS$ $[M+H]^+$ 560.1213, найдено 560.1238.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-фенилаланина (14a)



Выход 1.30 г (49%) с чистотой 98.25% (t_R 13.870 мин).

1H ЯМР: δ 8.79 (д, $J = 7.7$, 0.70 H, NHCH), 8.67 (д, $J = 8.9$, 0.23 H, NHCH), 8.43 и 8.38 (2 с, 0.72 H и 0.27 H, H8), 7.31 (д, $J = 7.8$, 2 H, $^2CH^{Phe}$ и $^6CH^{Phe}$), 7.26 (т, $J = 7.7$, 2 H, $^3CH^{Phe}$ и $^5CH^{Phe}$), 7.17 (т, $J = 7.1$, 1 H, $^4CH^{Phe}$), 6.15 и 6.13 (д и м, $J = 5.3$, 0.75 H и 0.21 H, H_{1'}), 5.88 и

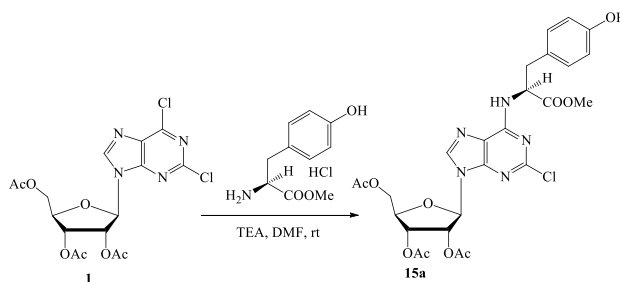
5.85 (т и м, $J = 5.6$, 1 H, H₂'), 5.74 и 4.91 (2 м, 0.25 H и 0.71 H, $^{\alpha}\text{CH}^{\text{Phe}}$), 5.57 и 5.55 (2 м, 1 H, H₃'), 4.37 (м, 2 H, H_{5'a} и H_{4'}), 4.26 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.67 и 3.65 (2с, 3 H, $^{\alpha}\text{CH-COOCH}_3$), 3.24 и 3.05 (2 м, 1.40 H и 0.24 H, $^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Phe}}$), 2.11 (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 2.04 (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_2'$), 2.02 м. д. (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_5'$).

^{13}C ЯМР: δ 171.69 ($^{\alpha}\text{CHCOOCH}_3$), 169.87 ($\text{CH}_3\text{COO}_5'$), 169.27 ($\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 169.12 ($\text{CH}_3\text{COO}_2'$), 154.59 (C6), 152.80 (C2), 151.52 (C4 мини-форма), 149.55 (C4), 140.57 и 140.18 мини-форма (C8), 137.46 ($^1\text{C}^{\text{Phe}}$), 128.90 ($^2\text{CH}^{\text{Phe}}$ и $^6\text{CH}^{\text{Phe}}$), 128.12 ($^3\text{CH}^{\text{Phe}}$ и $^5\text{CH}^{\text{Phe}}$), 126.38 ($^4\text{CH}^{\text{Phe}}$), 118.45 (C5), 85.31 (C_{1'}), 79.51 (C_{4'}), 71.96 (C_{2'}), 69.83 (C_{3'}), 62.59 (C_{5'}), 57.12 мини-форма и 54.65 ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Phe}}$), 51.96 ($^{\alpha}\text{CH-COOCH}_3$), 36.86 мини-форма и 35.84 ($^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Phe}}$), 20.33 ($\text{CH}_3\text{COO}_5'$), 20.23 ($\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 20.08 м. д. ($\text{CH}_3\text{COO}_2'$).

^{15}N ЯМР: δ 241.4 и 243.1 мини-форма (N7), 229.0 (N1), 167.5 и 166.1 мини-форма (N9), 95.6 и 102.3 мини-форма м. д. (NHCH).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_9\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 590.1654, найдено 590.1617.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-тирозина (15a)



Выход 2.65 г (97%) с чистотой 96.77% (t_{R} 13.897 мин).

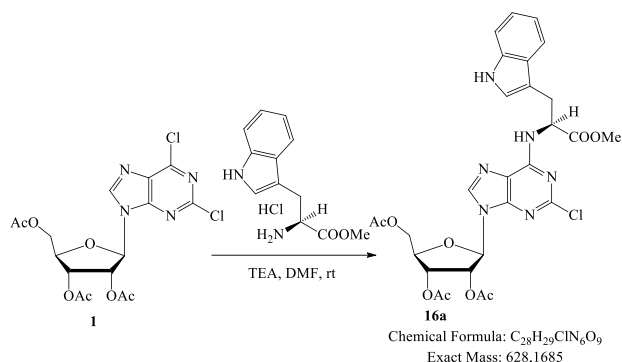
^1H ЯМР: δ 9.24 (м, 1 H, Тир-ОН), 8.69 и 8.59 (2 д, $J = 7.8$ и $J = 9.5$, 0.67 и 0.25 H, NH), 8.45 и 8.39 (2 с, 0.72 и 0.27 H, H8), 7.10 и 7.08 (2 д, $J = 9.0$ и $J = 8.5$, 2 H, $^3\text{CH}^{\text{Tyr}}$ и $^5\text{CH}^{\text{Tyr}}$), 6.65 (д, $J = 8.5$, 2 H, $^2\text{CH}^{\text{Tyr}}$ и $^6\text{CH}^{\text{Tyr}}$), 6.16 и 6.14 (2 д, $J = 5.5$ и $J = 5.5$, 0.71 и 0.26 H, H₁'), 5.89 и 5.86 (2 м, 1 H, H₂'), 5.63 и 4.80 (2 м, 0.25 и 0.70 H, $^{\alpha}\text{CH}^{\text{Tyr}}$), 5.58 и 5.56 (2 м, 1 H, H₃'), 4.39 и 4.37 (2 м, 2 H, H_{5'a} и H_{4'}), 4.26 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.64 (м, 3 H, OCH₃), 3.11 и 2.94 (2 м, 1.72 и 0.25 H, $^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Tyr}}$), 2.12 (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 2.04 (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_2'$), 2.02 м. д. (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_5'$).

^{13}C ЯМР: δ 171.85 (COOCH_3), 169.91 ($\text{CH}_3\text{COO}_5'$), 169.30 ($\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 169.14 ($\text{CH}_3\text{COO}_2'$), 155.89 ($^4\text{C}^{\text{Tyr}}$), 154.60 (C6), 152.83 (C2), 149.55 (C4), 140.58 (C8), 129.82 ($^3\text{CH}^{\text{Tyr}}$ и $^5\text{CH}^{\text{Tyr}}$), 127.35 ($^1\text{C}^{\text{Tyr}}$), 118.47 (C5), 114.98 ($^2\text{CH}^{\text{Tyr}}$ и $^6\text{CH}^{\text{Tyr}}$), 85.34 (C_{1'}), 79.54 (C_{4'}), 71.99 (C_{2'}), 69.85 (C_{3'}), 62.62 (C_{5'}), 55.08 мини-форма и 52.12 ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Tyr}}$), 51.90 (COOCH_3), 35.16 ($^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Tyr}}$), 20.35 ($\text{CH}_3\text{COO}_5'$), 20.25 ($\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 20.09 м. д. ($\text{CH}_3\text{COO}_2'$).

^{15}N ЯМР: δ 241.9 (N7), 228.6 (N1), 166.8 (N9), 102.4 мини-форма и 95.8 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 606.1622, найдено 606.1598.

**Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-
пурин-6-ил]-L-триптофана (16a)**



Выход 2.54 г (90%) с чистотой 99.77% (t_R 16.870 мин).

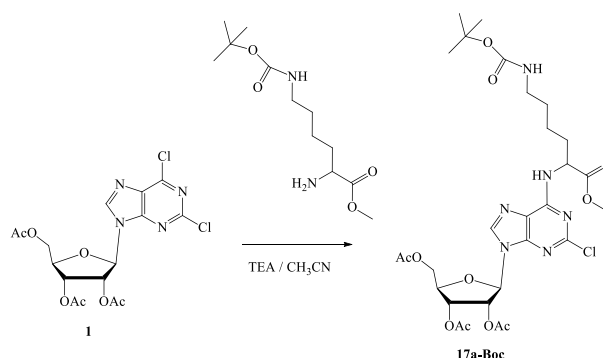
¹H ЯМР: δ 10.82 (м, 1 H, NH^{Трп}), 8.67 (д, J = 7.3, 0.74 H, NHCH), 8.57 (м, 0.25 H, NHCH), 8.44 (с, 0.73 H, H8), 8.36 (с, 0.25 H, H8), 7.58 (м, 1 H, ⁴CH^{Трп}), 7.33 (м, 1 H, ⁷CH^{Трп}), 7.23 (м, 0.30 H, ²CH^{Трп}), 7.21 (м, 0.74 H, ²CH^{Трп}), 7.06 (м, 1 H, ⁶CH^{Трп}), 6.99 (м, 1 H, ⁵CH^{Трп}), 6.16 (д, J = 5.4, 1 H, H₁'), 6.12 (м, 0.27 H, H₁'), 5.88 (т, J = 5.7, 0.75 H, H₂'), 5.84 (м, 0.26 H, H₂'), 5.70 (м, 0.25 H, ^αCH^{Трп}), 5.58 (м, 0.75 H, H₃'), 5.54 (м, 0.27 H, H₃'), 4.93 (м, 0.74 H, ^αCH^{Трп}), 4.38 (м, 2 H, H₅'_a и H₄'), 4.26 (м, 1 H, H₅'_b), 3.67 и 3.65 (2 с, 3 H, ^αCH-COOCH₃), 3.38 (м, 1.80 H, ^βCH₂^{Трп}), 3.20 (м, 0.33 H, ^βCH₂^{Трп}), 2.12 (с, 3 H, CH₃COO₃'), 2.04 (с, 3 H, CH₃COO₂'), 2.02 м. д. (с, 3 H, CH₃COO₅').

¹³C ЯМР: δ 172.02 (^αCH-COOCH₃), 169.88 (CH₃COO₅'), 169.27 (CH₃COO₃'), 169.11 (CH₃COO₂'), 154.57 (C6), 152.85 (C2), 151.38 (C4 мини-форма), 149.54 (C4), 140.51 (C8), 140.10 (C8 мини-форма), 136.00 (⁷CH^{Трп}), 126.90 (⁴CH^{Трп}), 123.63 (²CH^{Трп}), 120.88 (⁶CH^{Трп}), 118.47 (C5), 118.34 (⁵CH^{Трп}), 117.92 (⁴CH^{Трп}), 111.35 (⁷CH^{Трп}), 109.64 (³C^{Трп}), 85.29 (C₁'), 79.52 (C₄'), 71.98 (C₂'), 69.84 (C₃'), 62.60 (C₅'), 56.62 (^αCH^{Трп} мини-форма), 54.15 (^αCH^{Трп}), 51.93 (^αCH-COOCH₃), 27.51 (^βCH₂^{Трп}), 26.39 (^βCH₂^{Трп}), 20.33 (CH₃COO₅'), 20.23 (CH₃COO₃'), 20.08 м. д. (CH₃COO₂').

¹⁵N ЯМР: δ 242.3 и 243.3 (N7), 228.4 (N1), 166.9 и 165.9 (N9), 131.3 (NH^{Трп}), 96.9 и 103.6 м. д. (NHCH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₈H₂₉N₆O₉Cl [M+H]⁺ 629.1763, найдено 629.1757.

**Метилловый эфир N^α-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-
пурин-6-ил]-N^ε-трет-бутилоксикарбонил]-L-лизина (17a-Вос)**



Получен Вос-защищенный продукт в количестве 2.14 г (71%) с чистотой 95.39% (t_R 16.378 мин).

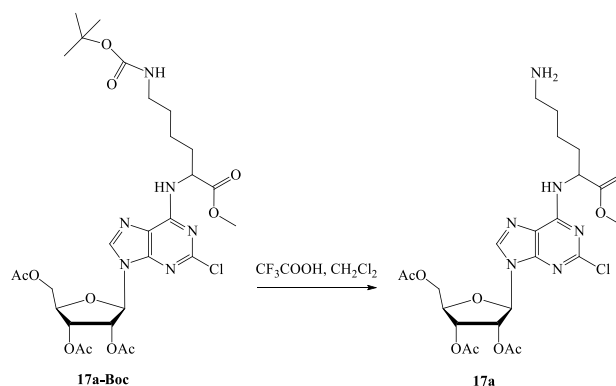
1H ЯМР: δ 8.74 и 8.56 (2 д, $J = 7.2$ и $J = 8.4$, 0.68 Н и 0.23 Н, NH), 8.46 и 8.39 (2 с, 0.72 и 0.27 Н, Н8), 6.74 и 6.39 (т, $J = 4.8$, и м, 0.84 и 0.08 Н, NH -Boc), 6.18 и 6.16 (2 д, $J = 5.5$ и $J = 5.5$, 0.70 Н и 0.25 Н, $H_{1'}$), 5.90 (т, $J = 5.7$, 1 Н, $H_{2'}$), 5.59 (т, $J = 5.2$, 1 Н, $H_{3'}$), 5.38 и 4.60 (2 м, 0.20 и 0.61 Н, $^{\alpha}CH$ -Lys), 4.39 (м, 2 Н, $H_{5'a}$ и $H_{4'}$), 4.28 (дд, $J = 13.2$, 6.8, $H_{5'b}$), 3.65 и 3.63 (2 с, 2.08 и 0.78 Н, OCH_3), 2.90 (м, 2 Н, $^{\epsilon}CH_2$ -Lys), 2.13 (с, 3 Н, CH_3COO_3), 2.06 (с, 3 Н, CH_3COO_2), 2.03 (с, 3 Н, CH_3COO_5), 1.89 и 1.79 (2 м, 1.74 и 0.27 Н, $^{\beta}CH_2$ -Lys), 1.39 (м, 2 Н, $^{\delta}CH_2$ -Lys), 1.34 (с, 9 Н, $OC(CH_3)_3$), 1.24 м. д. (м, 2Н, $^{\gamma}CH_2$ -Lys).

^{13}C ЯМР: δ 172.34 ($COOCH_3$), 169.93 (CH_3COO_5), 169.34 (CH_3COO_3), 169.18 (CH_3COO_2), 155.45 ($COC(CH_3)_3$), 154.80 (C6), 152.92 (C2), 149.59 (C4), 140.47 (C8), 118.50 (C5), 85.33 (C $_1$), 79.52 (C $_4$), 77.22 ($COC(CH_3)_3$), 72.02 (C $_2$), 69.87 (C $_3$), 62.64 (C $_5'$), 55.56 мини-форма и 53.25 ($^{\alpha}CH$ -Lys), 51.87 (OCH_3), 39.15 ($^{\epsilon}CH_2$ -Lys), 29.87 ($^{\beta}CH_2$ -Lys), 28.14 ($COC(CH_3)_3$), 23.00 ($^{\delta}CH_2$ -Lys и $^{\gamma}CH_2$ -Lys), 20.38 (CH_3COO_5), 20.28 (CH_3COO_3), 20.12 м. д. (CH_3COO_2).

^{15}N ЯМР: δ 243.0 (N7), 228.5 (N1), 167.1 (N9), 102.89 мини-форма и 95.1 (NH), 85.3 м. д. (NH -Boc).

HRMS (ESI): вычислено для $C_{28}H_{39}N_6O_{11}Cl$ $[M+H]^+$ 671.2438, найдено 671.2413.

Метилловый эфир N^{α} -[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-лизина, трифторуксусная соль (17a)



К раствору 2.14 г (3.2 ммоль) **14a** в 35.0 мл CH_2Cl_2 добавляли 28.6 мл ТФУ, перемешивали 1.5 ч. Контролировали степень протекания реакции с помощью ТСХ.

Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и очищали на колонке с 60 г силикагеля 40/100. Элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (1 – 20%, 400 мл). Выход 1.55 г (85%), чистота 96.59% (t_R 10.489 мин).

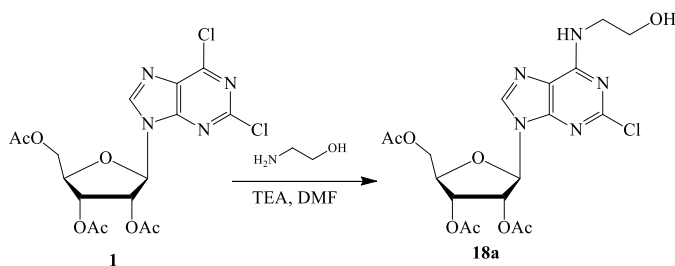
1H ЯМР: δ 8.75 и 8.59 (2 д, $J = 7.5$ и $J = 8.8$, 0.69 и 0.22 Н, $NHCH$), 8.47 и 8.40 (2 с, 0.74 и 0.25 Н, Н8), 7.64 (с, 2 Н, NH_2), 6.18 и 6.17 (д, $J = 5.4$, и м, 1 Н, $H_{1'}$), 5.90 (м, 1 Н, H_2), 5.59 (м, 1 Н, H_3), 5.40 и 4.65 (2 м, 0.22 и 0.73 Н, $^{\alpha}CH-Lys$), 4.39 (м, 2 Н, $H_{5'a}$ и $H_{4'}$), 4.27 (м, 1 Н, $H_{5'b}$), 3.66 и 3.64 (2 с, 3 Н, OCH_3), 2.78 (м, 2 Н, $^{\epsilon}CH_2-Lys$), 2.13 (с, 3 Н, CH_3COO_3), 2.06 (с, 3 Н, CH_3COO_2), 2.02 (с, 3 Н, CH_3COO_5), 1.92 и 1.82 (2 м, 1.79 и 0.24 Н, $^{\beta}CH_2-Lys$), 1.57 (м, 2 Н, $^{\delta}CH_2-Lys$), 1.44 м. д. (м, 2 Н, $^{\gamma}CH_2-Lys$).

^{13}C ЯМР: δ 172.16 ($COOCH_3$), 169.88 (CH_3COO_5), 169.29 (CH_3COO_3), 169.17 (CH_3COO_2), 154.79 (C6), 152.89 (C2), 149.57 (C4), 140.53 (C8), 118.51 (C5), 85.43 ($C_{1'}$), 79.47 ($C_{4'}$), 72.03 ($C_{2'}$), 69.82 ($C_{3'}$), 62.57 ($C_{5'}$), 55.38 мини-форма и 52.95 ($^{\alpha}CH^{Lys}$), 51.91 (OCH_3), 38.48 ($^{\epsilon}CH_2^{Lys}$), 29.60 ($^{\beta}CH_2^{Lys}$), 26.37 ($^{\delta}CH_2^{Lys}$), 22.49 ($^{\gamma}CH_2^{Lys}$), 20.34 (CH_3COO_5), 20.23 (CH_3COO_3), 20.09 м. д. (CH_3COO_2).

^{15}N ЯМР: δ 242.3 (N7), 228.9 (N1), 167.3 (N9), 102.6 мини-форма и 95.0 (NH^{Lys}), 32.2 м. д. (NH_2^{Lys}).

HRMS (ESI): вычислено для $C_{23}H_{31}N_6O_9Cl$ $[M+H]^+$ 571.1914, найдено 571.1890.

N-[2-Хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-2-аминоэтанол (18a)



Chemical Formula: $C_{18}H_{22}ClN_4O_8$
Exact Mass: 471.1

К раствору 500 мг (1.12 ммоль) **1** и 94 мкл (1.57 ммоль) этаноламина в 4 мл ДМФА при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли 200 мкл ТЕА (1.45 ммоль), смесь перемешивали при комнатной температуре в течение двух часов, контролируя прохождение реакции при помощи ТСХ (хлороформ-метанол, 30:1). После окончания реакции упаривали реакционную смесь. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 50 мл). Элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0 – 4%, 400 мл). Выход 494 мг (94%), с чистотой 99.0% (t_R 10.515).

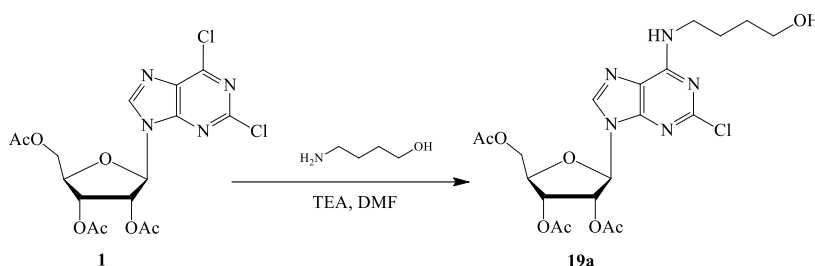
^1H ЯМР: δ 8.39 (с, 1 H, H8), 8.26 (м, 0.80 H, NHCH_2), 8.20 (м, 0.20 H, NHCH_2), 6.16 (д, $J = 5.5$, 1 H, H1'), 5.89 (м, 1 H, H2'), 5.59 (м, 1 H, H3'), 4.79 (м, 1 H, CH_2OH), 4.39 (м, 2 H, H5'a и H4'), 4.27 (м, 1 H, H5'b), 3.93 (м, 0.37 H, NHCH_2), 3.58 (м, 2 H, CH_2OH), 3.51 (м, 1.54 H, NHCH_2), 2.13 (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 2.05 (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_2'$), 2.03 м. д. (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_5'$).

^{13}C ЯМР: δ 169.89 ($\text{CH}_3\text{COO}_5'$), 169.29 ($\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 169.13 ($\text{CH}_3\text{COO}_2'$), 155.15 (C6), 153.36 (C2), 149.11 (C4), 139.97 (C8), 118.55 (C5), 85.28 (C1'), 79.47 (C4'), 71.99 (C2'), 69.85 (C3'), 62.58 (C5'), 60.17 мини-форма и 59.09 (CH_2OH), 45.41 мини-форма и 42.61 (NHCH_2), 20.35 ($\text{CH}_3\text{COO}_5'$), 20.24 ($\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 20.07 м. д. ($\text{CH}_3\text{COO}_2'$).

^{15}N ЯМР: δ 244.8 мини-форма и 242.2 (N7), 227.2 (N1) 166.9 (N9), 98.5 мини-форма и 91.2 м. д. (NHCH_2).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_8\text{Cl}$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 470.1110, найдено 470.1079.

N-[2-Хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-4-аминобутанол-1 (19a)



К раствору 500 мг (1.12 ммоль) **1** и 146 мкл (1.57 ммоль) бутаноламина в 4 мл ДМФА при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли 200 мкл ТЕА (1.45 ммоль), смесь перемешивали при комнатной температуре в течение двух часов, контролируя прохождение реакции при помощи ТСХ (хлороформ-метанол, 30:1). После окончания реакции упаривали реакционную смесь. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 50 мл). Элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0 – 4%, 400 мл). Выход 535 мг (96%), с чистотой 99.0% (t_R 8.964).

^1H ЯМР: δ 8.43 (уш.т, 0.73 H, NHCH_2), 8.38 (м, 1 H, H8), 8.34 (м, 0.20 H, NHCH_2), 6.16 (д, $J = 5.4$, 1 H, H1'), 5.89 (т, $J = 5.7$, 1 H, H2'), 5.59 (м, 1 H, H3'), 4.38 (м, 3 H, H5'a, H4' и CH_2OH), 4.27 (м, 1 H, H5'b), 3.85 (м, 0.42 H, NHCH_2 мини-форма), 3.43 (м, 3.53 H, NHCH_2 и CH_2OH), 2.13 (м, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 2.06 (м, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_2'$), 2.03 (м, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_5'$), 1.62 (м, 2 H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1.47 м. д. (м, 2 H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

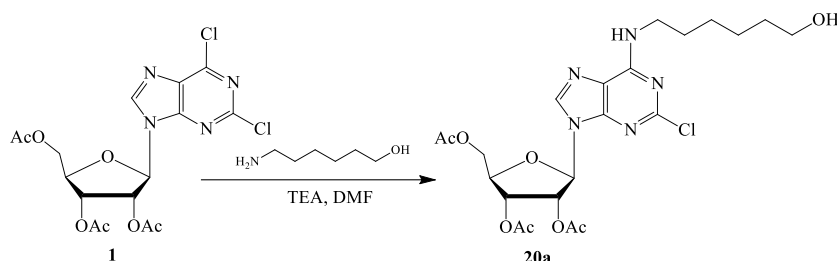
^{13}C ЯМР: δ 169.89 ($\text{CH}_3\text{COO}_5'$), 169.29 ($\text{CH}_3\text{COO}_3'$), 169.14 ($\text{CH}_3\text{COO}_2'$), 155.01 (C6), 153.43 (C2), 149.05 (C4), 139.82 (C8), 139.67 (C8 мини-форма), 118.44 (C5), 85.26 (C1'), 79.46 (C4'), 72.00 (C2'), 69.85 (C3'), 62.59 (C5'), 60.33 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 42.25 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ мини-форма), 40.20 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, HSQC данные), 29.73

(NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH), 25.30 (NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH), 20.35 (CH₃COO₅'), 20.24 (CH₃COO₃'), 20.08 м. д. (CH₃COO₂').

¹⁵N ЯМР: δ 245.0 мини-форма и 242.2 (N7), 166.9 (N9), 103.8 м. д. (NH мини-форма) и 96.2 (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₀H₂₅N₅O₈Cl [M-H]⁻ 498.1392, найдено 498.1407.

N-[2-Хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-6-аминогексанол-1 (20a)



К раствору 272 мг (0.61 ммоль) **1** и 100 мг (0.85 ммоль) гексаноламина в 5 мл ДМФА при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли 128 мкл ТЕА (0.923 ммоль), смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, контролируя прохождение реакции при помощи ТСХ (хлороформ-метанол, 30:1). После окончания реакции упаривали реакционную смесь. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 50 мл). Элюировали ступенчатым градиентом CH₃Cl, CH₃Cl : MeOH 50:1, CH₃Cl : MeOH 30:1. Выход 206 мг (63%), с чистотой 99.0% (tr 12.990).

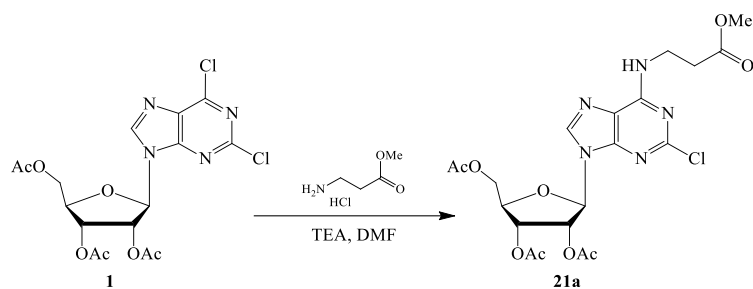
¹H ЯМР: δ 8.42 и 8.33 (2 м, 0.72 Н и 0.18 Н, NH), 8.38 (с, 1 Н, Н8), 6.16 (д, *J* = 5.3, 1 Н, Н₁'), 5.89 (м, 1 Н, Н₂'), 5.59 (м, 1 Н, Н₃'), 4.39 (м, 2 Н, Н₄' и Н₅'_а), 4.29 (м, 2 Н, Н₅'_б и НОСН₂), 3.83 (м, 0.42 Н, СН₂НН), 3.42 (м, 1.49 Н, СН₂НН), 3.38 (м, 2 Н, ОНСН₂), 2.13 (с, 3 Н, СН₃COO₃'), 2.06 (с, 3 Н, СН₃COO₂'), 2.03 (с, 3 Н, СН₃COO₅'), 1.59 (м, 2 Н, СН₂CH₂НН), 1.42 (м, 2 Н, ОНСН₂CH₂), 1.32 м. д. (м, 4 Н, СН₂CH₂CH₂CH₂НН).

¹³C ЯМР: δ 169.89 (CH₃COO₅'), 169.29 (CH₃COO₃'), 169.14 (CH₃COO₂'), 155.50 (С6 мини-форма), 155.00 (С6), 153.43 (С2), 152.93 (С4 мини-форма), 149.05 (С4), 139.81 (С8), 139.67 (С8 мини-форма), 118.55 (С5), 117.27 (С5 мини-форма), 85.27 (С₁'), 79.46 (С₄'), 79.05 (С₄' мини-форма), 72.01 (С₂'), 69.85 (С₄'), 62.59 (С₅'), 60.54 (ОНСН₂), 42.36 (СН₂НН мини-форма), 39.92 (СН₂НН), 32.37 (ОНСН₂CH₂), 29.79 (СН₂CH₂НН мини-форма), 28.60 (СН₂CH₂НН), 26.12 и 25.11 (ОНСН₂CH₂CH₂CH₂CH₂НН), 25.98 (СН₂CH₂CH₂НН мини-форма), 20.34 (CH₃COO₅'), 20.24 (CH₃COO₃'), 20.08 м. д. (CH₃COO₂').

¹⁵N ЯМР: δ 245.22 мини-форма и 242.34 (N7), 227.09 (N1), 218.48 (N3), 167.67 (N9), 105.39 мини-форма и 96.12 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₂H₃₀N₅O₈Cl [M-H]⁻ 526.1705, найдено 526.1598.

**Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-
пурин-6-ил]-β-аланина (21a)**



К раствору 2.00 г (4.5 ммоль) **1** и 890 мг (6.4 ммоль) гидрохлорида метилового эфира бета-аланина в 60 мл сухого ДМФА при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли 12.8 ммоль (1.76 мл) ТЕА, смесь перемешивали при комнатной температуре сутки, контролируя прохождение реакции при помощи ТСХ (хлороформ-метанол, 30:1). После окончания реакции отфильтровывали кристаллы гидрохлорида триэтиламина и упаривали реакционную смесь. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и очищали при помощи колоночной хроматографии на колонке с силикагелем 100/160 (60 мл) в системе хлороформ-метанол (градиент 0–20% метанола). Выход 2.02 г (88%) с чистотой 96.92% (t_R 14.251 мин).

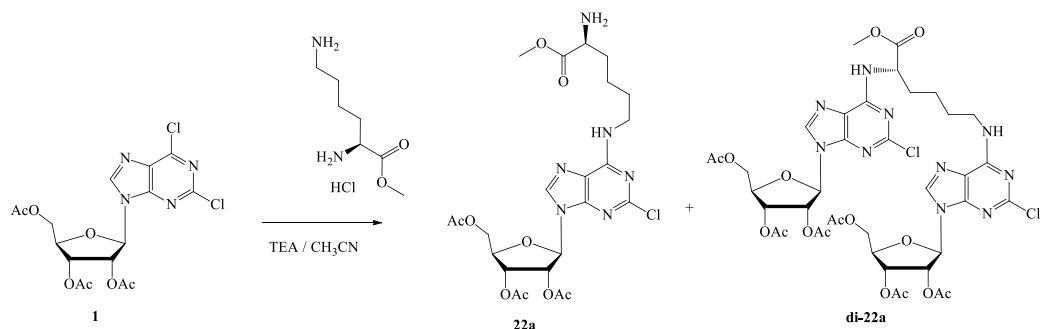
^1H ЯМР: δ 8.45 и 8.41 (т и м, $J = 5.7, 0.76$ и 0.26 Н, NH), 8.40 и 8.32 (2 с, 0.76 и 0.23 Н, Н8), 6.11 (д, $J = 5.5$, 1 Н, Н_{1'}), 5.89 (м, 1 Н, Н_{2'}), 5.59 (м, 1 Н, Н_{3'}), 4.40 и 4.38 (м, 2 Н, Н_{4'} и Н_{5'a}), 4.27 (м, 1 Н, Н_{5'b}), 4.08 и 3.68 (2 м, 0.32 и 1.57 Н, NHCH₂CH₂), 3.61 (с, 3 Н, OCH₃), 2.68 (м, 2 Н, NHCH₂CH₂), 2.12 (с, 3 Н, CH₃COO_{3'}), 2.05 (с, 3 Н, CH₃COO_{2'}), 2.03 м. д. (с, 3 Н, CH₃COO_{5'}).

^{13}C ЯМР: δ 117.51 (COOCH₃), 169.91 (CH₃COO_{5'}), 169.31 (CH₃COO_{3'}), 169.15 (CH₃COO_{2'}), 154.87 (C6), 153.31 (C2), 149.19 (C4), 140.13 (C8), 118.55 (C5), 85.31 (C_{1'}), 79.49 (C_{4'}), 72.01 (C_{2'}), 69.85 (C_{3'}), 62.59 (C_{5'}), 51.29 (COOCH₃), 38.27 мини-форма и 36.13 (NHCH₂CH₂), 33.09 (NHCH₂CH₂), 20.36 (CH₃COO_{5'}), 20.25 (CH₃COO_{3'}), 20.09 м. д. (CH₃COO_{2'}).

^{15}N ЯМР: δ 242.2 (N7), 227.1 (N1), 166.9 (N9), 93.2 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₀H₂₄N₅O₉Cl [M+H]⁺ 514.1353, найдено 514.1346.

**Метилловый эфир N^ε-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-
пурин-6-ил]-L-лизина (22a)**



К раствору 2.00 г (4.5 ммоль) **1** и 1.26 г (6.4 ммоль) гидрохлорида метилового эфира L-лизина в 60 мл сухого ДМФА при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли 12.8 ммоль (1.76 мл) ТЕА, смесь перемешивали при комнатной температуре сутки, контролируя прохождение реакции при помощи ТСХ (хлороформ-метанол, 30:1). После окончания реакции отфильтровывали кристаллы гидрохлорида триэтиламина и упаривали реакцию смесь. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа, пропускали через колонку с силикагелем 100/160 (60 мл), элюировали хлороформом. Получали продукт – дизамещенный лизин **22a-bis** в количестве 110 мг (5%).

^1H ЯМР: δ 8.77 (м, 0.69 Н, $^{\alpha}\text{NHCH}$), 8.60 (д, $J = 8.3$, 0.24 Н, $^{\alpha}\text{NHCH}$ мини-форма), 8.45 и 8.44 (s и м, 1.48 Н, Н8 и $^{\epsilon}\text{NHCH}$), 8.37 (s и м, 1.49 Н, Н8 и $^{\epsilon}\text{NHCH}$ мини-форма), 6.18 и 6.16 (2 д, $J = 5.4$ и $J = 5.4$, 2 Н, Н $_1^{\cdot}$), 5.89 (м, 2 Н, Н $_2^{\cdot}$), 5.58 (м, 2 Н, Н $_3^{\cdot}$), 5.39 и 4.62 (2 м, 0.25 и 0.69 Н, $^{\alpha}\text{CH-Lys}$ и $^{\alpha}\text{CH-Lys}$ мини-форма), 4.38 (м, 4 Н, Н $_{5^{\cdot}a}$ и Н $_4^{\cdot}$), 4.27 (м, 2 Н, Н $_{5^{\cdot}b}$), 3.84 и 3.43 (2 м, 0.40 и 1.60 Н, $^{\epsilon}\text{CH}_2\text{-Lys}$ мини-форма и $^{\epsilon}\text{CH}_2\text{-Lys}$), 3.63 и 3.61 (2 с, 3 Н, $^{\alpha}\text{CH-COOCH}_3$), 2.12 (с, 6 Н, $\text{CH}_3\text{COO}_3^{\cdot}$), 2.06 и 2.05 (2 с, 6 Н, $\text{CH}_3\text{COO}_2^{\cdot}$), 2.03 (с, 6 Н, $\text{CH}_3\text{COO}_5^{\cdot}$), 1.93 и 1.83 (2 м, 1.80 и 0.23 Н, $^{\beta}\text{CH}_2\text{-Glu}$), 1.62 (м, 2 Н, $^{\delta}\text{CH}_2\text{-Lys}$), 1.48 и 1.42 м. д. (2м, 1.32 и 0.74 Н, $^{\gamma}\text{CH}_2\text{-Lys}$).

^{13}C ЯМР: δ 172.31 ($^{\alpha}\text{CH-CO-OCH}_3$), 169.89 ($\text{CH}_3\text{COO}_5^{\cdot}$), 169.29 ($\text{CH}_3\text{COO}_3^{\cdot}$), 169.13 ($\text{CH}_3\text{COO}_2^{\cdot}$), 155.70 и 154.77 (C6), 152.88 (C2), 149.57 и 149.06 (C4), 140.41 и 139.80 (C8), 118.47 (C5), 85.32 и 85.22 (C $_1^{\cdot}$), 79.47 (C $_4^{\cdot}$), 72.01 (C $_2^{\cdot}$), 69.85 (C $_3^{\cdot}$), 62.60 (C $_5^{\cdot}$), 53.23 и 55.39 мини-форма ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Lys}}$), 51.79 ($^{\alpha}\text{CH-CO-OCH}_3$), 39.70 ($^{\epsilon}\text{CH}_2\text{-Lys}$), 41.81 ($^{\epsilon}\text{CH}_2\text{-Lys}$ мини-форма), 29.82 ($^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Lys}}$), 28.08 ($^{\delta}\text{CH}_2^{\text{Lys}}$), 23.03 ($^{\gamma}\text{CH}_2^{\text{Lys}}$), 20.34 ($\text{CH}_3\text{COO}_5^{\cdot}$), 20.24 ($\text{CH}_3\text{COO}_3^{\cdot}$), 20.08 м. д. ($\text{CH}_3\text{COO}_2^{\cdot}$).

^{15}N ЯМР: δ 242.5 (N7), 167.0 (N9), 102.9 мини-форма и 96.3 ($^{\epsilon}\text{NH}_2\text{CH}$), 102.9 мини-форма и 95.7 м. д. ($^{\alpha}\text{NHCH}$).

Затем колонку элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0 – 20%, 400 мл). Монозамещенный продукт **22a** получен в количестве 2.63 г (87%) с чистотой 96.91% (t_R 10.199 мин).

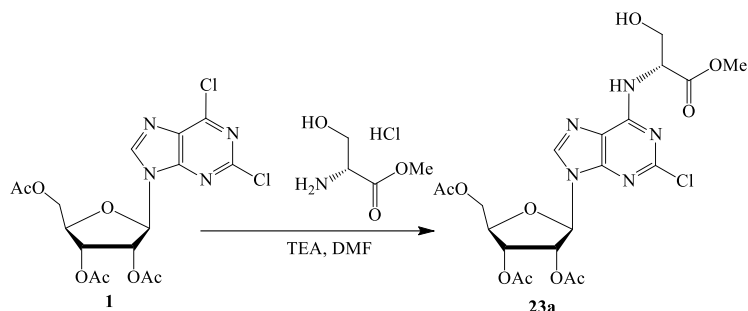
^1H ЯМР: δ 8.45 и 8.41 (т и м, $J = 5.7$, 0.76 и 0.26 Н, NH), 8.40 и 8.32 (2 с, 0.76 и 0.23 Н, Н8), 6.11 (д, $J = 5.5$, 1 Н, Н $_1^{\cdot}$), 5.89 (м, 1 Н, Н $_2^{\cdot}$), 5.59 (м, 1 Н, Н $_3^{\cdot}$), 4.40 и 4.38 (м, 2 Н, Н $_4^{\cdot}$ и Н $_{5^{\cdot}a}$), 4.27 (м, 1 Н, Н $_{5^{\cdot}b}$), 4.08 и 3.68 (2 м, 0.32 и 1.57 Н, NHCH_2CH_2), 3.61 (с, 3 Н, OCH_3), 2.68 (м, 2 Н, NHCH_2CH_2), 2.12 (с, 3 Н, $\text{CH}_3\text{COO}_3^{\cdot}$), 2.05 (с, 3 Н, $\text{CH}_3\text{COO}_2^{\cdot}$), 2.03 м. д. (с, 3 Н, $\text{CH}_3\text{COO}_5^{\cdot}$).

^{13}C ЯМР: δ 117.51 (COOCH_3), 169.91 ($\text{CH}_3\text{COO}_5^{\cdot}$), 169.31 ($\text{CH}_3\text{COO}_3^{\cdot}$), 169.15 ($\text{CH}_3\text{COO}_2^{\cdot}$), 154.87 (C6), 153.31 (C2), 149.19 (C4), 140.13 (C8), 118.55 (C5), 85.31 (C $_1^{\cdot}$), 79.49 (C $_4^{\cdot}$), 72.01 (C $_2^{\cdot}$), 69.85 (C $_3^{\cdot}$), 62.59 (C $_5^{\cdot}$), 51.29 (COOCH_3), 38.27 мини-форма и 36.13 (NHCH_2CH_2), 33.09 (NHCH_2CH_2), 20.36 ($\text{CH}_3\text{COO}_5^{\cdot}$), 20.25 ($\text{CH}_3\text{COO}_3^{\cdot}$), 20.09 м. д. ($\text{CH}_3\text{COO}_2^{\cdot}$).

^{15}N ЯМР: δ 242.2 (N7), 227.1 (N1), 166.9 (N9), 93.2 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $C_{23}H_{31}N_6O_9Cl$ $[M+H]^+$ 571.1914, найдено 571.1932.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-D-серина (23a)



К раствору 2.00 г (4.5 ммоль) **1** и 992 мг (6.4 ммоль) гидрохлорида метилового эфира *D*-серина в 60 мл сухого DMF при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли 1.76 мл (12.8 ммоль) ТЕА, смесь перемешивали при комнатной температуре 18 часов, контролируя прохождение реакции при помощи ТСХ в системе хлороформ-метанол, 30:1. После окончания реакции отфильтровывали кристаллы гидрохлорида триэтиламина и упаривали реакцию смесь. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и очищали при помощи колоночной хроматографии на колонке объемом 100 мл с силикагелем 100/160 в системе хлороформ-метанол (градиент 0-20% метанола). Выход 2.25 г (94%) с чистотой 97.63% (t_R 9.023 30–100 В за 20 мин).

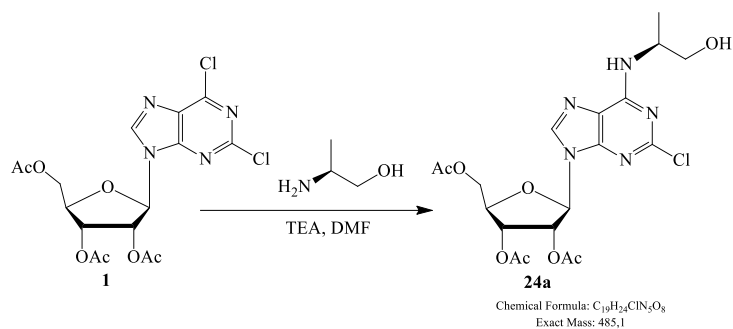
1H ЯМР: δ 8.48 и 8.40 (2 с, 0.74 и 0.24 Н, Н8), 8.30 и 8.25 (2 д, $J = 7.1$, и $J = 8.6$, 0.72 и 0.26 Н, NH), 6.19 и 6.17 (2 д, $J = 5.2$ и $J = 5.3$, 1 Н, Н1'), 5.91 (т, $J = 5.6$, 1 Н, Н2'), 5.59 (т, $J = 5.0$, 1 Н, Н3'), 5.50 и 4.77 (2 м, 0.22 и 0.72 Н, $^{\alpha}CH-Ser$), 5.15 и 5.09 (уш. т и м, $J = 4.9$, 0.74 и 0.24 Н, Ser-OH), 4.39 (м, 2 Н, Н5'a и Н4'), 4.27 (м, 1 Н, Н5'b), 3.88 (м, 2 Н, $^{\beta}CH_2-Ser$), 3.67, 3.64 и 3.63 (3 с, 3 Н, OCH₃), 2.13 (с, 3 Н, CH₃COO_{3'}), 2.06 (с, 3 Н, CH₃COO_{2'}), 2.03 м. д. (с, 3 Н, CH₃COO_{5'}).

^{13}C ЯМР: δ 170.58 (COOCH₃), 169.93 (CH₃COO_{5'}), 169.33 (CH₃COO_{3'}), 169.18 (CH₃COO_{2'}), 155.55 (C6), 154.65 (C2), 149.57 (C4), 140.82 и 140.74 мини-форма (C8), 118.63 (C5), 85.46 (C1'), 79.54 (C4'), 71.99 (C2'), 69.87 (C3'), 62.57 (C5'), 60.89 ($^{\beta}CH_2-Ser$), 58.56 мини-форма и 55.96 ($^{\alpha}CH-Ser$), 51.97 (COOCH₃), 20.37 (CH₃COO_{5'}), 20.27 (CH₃COO_{3'}), 20.11 м. д. (CH₃COO_{2'}).

^{15}N ЯМР: δ 241.7 (N7), 228.3 (N1), 167.3 (N9), 99.65 и 92.1 мини-форма м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $C_{20}H_{24}N_5O_{10}Cl$ $[M+H]^+$ 530.1291, найдено 530.1266.

(S)-2-[(2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил)амино]пропан-1-ол (24a)



К раствору 1.00 г (2.2 ммоль) **1** и 0.58 г (3.08 ммоль) соли трифторуксусной кислоты β-аминопропилового спирта (*S*-аланинола) в 60 мл сухого ацетонитрила при перемешивании на магнитной мешалке добавляли 0.92 мл (6.4 ммоль) ТЕА. Перемешивание при комнатной температуре вели 3 суток, контролируя протекание реакции по ТСХ в системе CH₃Cl:MeOH 30:1, затем реакционную смесь упаривали. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 100 мл). Элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0 – 2%, 400 мл). Выход 770 мг (70%) с чистотой 99.30 % (*t_R* 10.989 мин).

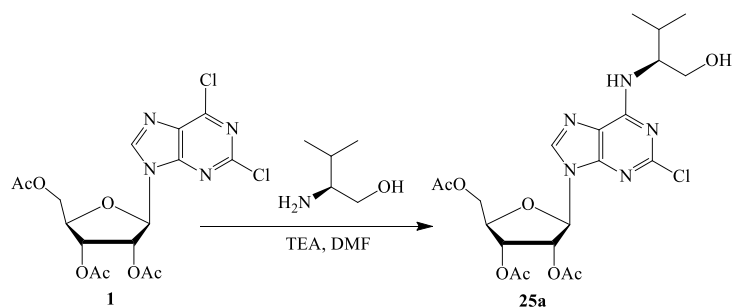
¹H ЯМР: δ 8.39 (с, 1 H, H₈), 8.04 (д, *J* = 8.4, 1 H, NH), 6.16 (д, *J* = 5.5, 1 H, H_{1'}), 5.89 (т, *J* = 5.7, 1 H, H_{2'}), 5.58 (дд, *J* = 5.8, 4.9, 1 H, H_{3'}), 4.92 и 4.27 (м, 0.11 H и 0.68 H, CHCH₃) 4.75 (м, 1 H, CH₂OH), 4.39 (м, 2 H, H_{5'a} и H_{4'}), 4.27 (м, 1 H и 0.68 H, H_{5'b} и CHCH₃) 3.51 и 3.41 (2 м, 2 H, CH₂OH), 2.13 (с, 3 H, CH₃COO_{3'}), 2.05 (с, 3 H, CH₃COO_{2'}), 2.03 (с, 3 H, CH₃COO_{5'}), 1.18 м. д. (д, *J* = 5.8, 3 H, CHCH₃).

¹³C ЯМР: δ 169.81 (CH₃COO_{5'}), 169.24 (CH₃COO_{3'}), 169.08 (CH₃COO_{2'}), 154.62 (C₆), 153.37 (C₂), 149.11 (C₄), 139.55 (C₈), 118.30 (C₅), 84.98 (C_{1'}), 79.20 (C_{4'}), 71.67 (C_{2'}), 69.58 (C_{3'}), 49.92 мини-форма и 47.51 (CHCH₃), 63.64 (CH₂-OH), 62.32 (C_{5'}), 20.15 (CH₃COO_{5'}), 19.97 (CH₃COO_{3'}), 19.77 (CH₃COO_{2'}), 16.64 м. д. (CH₃).

¹⁵N ЯМР: δ 244.4 мини-форма и 242.2 (N₇), 168.0 (N₉), 104.9 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₉H₂₄N₅O₈Cl [M + H]⁺ 486.1392, найдено 486.1415.

(*S*)-2-[(2-хлор-9-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)-9*H*-пурин-6-ил)амино]-3-метилбутан-1-ол (25a)

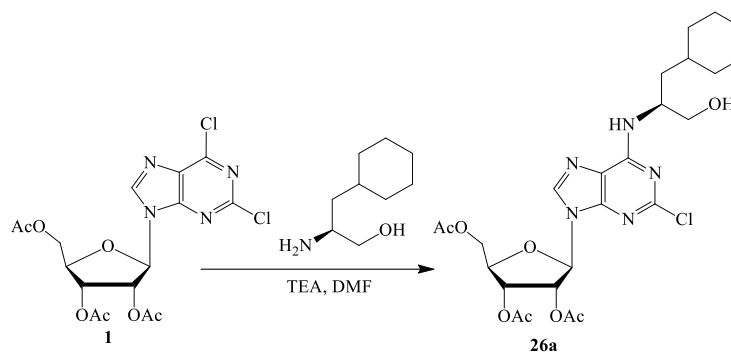


К раствору 300 мг (0.67 ммоль) **1** в 10 мл DMF при перемешивании добавляли 97 мг (0.94 ммоль) *S*-валинола и 140 мкл Et₃N (1.0 ммоль). Контроль прохождения реакции

осуществляли при помощи ТСХ в системе $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{MeOH}$ 30:1. Через сутки реакционную смесь упарили. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 50 мл). Элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0 – 1%, 400 мл). Выход 345 мг (98.0%), чистотой 99.1% (t_{R} 12.500 мин).

^1H ЯМР: δ 8.39 и 8.36 (2 м, 0.68 Н, 0.32 Н, Н8), 8.01 и 7.93 (м и д, $J = 8.6, 0.33$ Н, 0.67 Н, НН), 6.16 (д, $J = 5.6, 1$ Н, Н_{1'}), 5.91 (м, 1 Н, Н_{2'}), 5.59 (м, 1 Н, Н_{3'}), 4.82 (м, 0.33 Н, ННСН), 4.59 (м, 1 Н, СН₂ОН), 4.40 и 4.38 (м, 2 Н, Н_{5'a}, Н_{4'}), 4.27 (м, 1 Н, Н_{5'b}), 4.09 (м, 0.67 Н, ННСН), 3.59 (м, 1.66 Н, ННСН(СН(СН₃)₂)СН₂ОН), 3.51 (м, 0.34 Н, ННСН(СН(СН₃)₂)СН₂ОН мини-форма), 2.13 (с, 3 Н, СН₃СОО_{3'}), 2.06 (с, 3 Н, СН₃СОО_{2'}), 2.03 (с, 3 Н, СН₃СОО_{5'}), 1.95 (м, 1 Н, ННСН(СН(СН₃)₂)), 0.91 м. д. (м, 6 Н, ННСН(СН(СН₃)₂)). ^{13}C ЯМР: δ 169.89 (СН₃СОО_{5'}), 169.29 (СН₃СОО_{2'}), 169.15 (СН₃СОО_{3'}), 156.06 (С6 мини-форма), 155.60 (С6), 153.28 (С2), 152.83 (С2 мини-форма), 151.36 (С4 мини-форма), 149.16 (С4), 139.75 (С8), 139.17 (С8 мини-форма), 118.38 (С5), 117.16 (С5 мини-форма), 85.27 (С_{1'}), 85.23 (С_{1'} мини-форма), 79.46 (С_{4'}), 71.99 (С_{2'}), 71.84 (С_{2'} мини-форма), 69.88 (С_{3'}), 62.60 (С_{5'}), 61.52 (СН₂ОН мини-форма), 61.02 (СН₂ОН), 59.21 (ННСН мини-форма), 57.35 (ННСН), 28.77 (ННСН(СН(СН₃)₂)СН₂ОН), 20.35 (СН₃СОО_{5'}), 20.24 (СН₃СОО_{3'}), 20.08 (СН₃СОО_{2'}), 19.42 и 18.74 м. д. (ННСН(СН(СН₃)₂)). ^{15}N ЯМР: δ 242.49 и 246.06 мини-форма (N7), 227.19 (N1), 218.07 (N3), 167.03 и 165.75 мини-форма (N9), 101.15 и 109.14 мини-форма м. д. (NH). HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{ClN}_5\text{O}_8$ [М - Н]⁺ 512.1521, найдено 512.1891.

(S)-3-циклогексил-2-[(2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил)амино]пропан-1-ол (26a)



К раствору 200 мг (0.447 ммоль) **1** в 7 мл DMF при перемешивании добавляли 121 мг (0.625 ммоль) циклогексил-S-аланинола и 267 мкл Et₃N (1.9 ммоль). Контроль прохождения реакции осуществляли при помощи ТСХ в системе $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{MeOH}$ 30:1. Через сутки реакционную смесь упарили. Маслообразный остаток растворяли в минимальном количестве хлороформа и выделяли при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 35 мл). Элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0 – 3%, 400 мл). Выход 298 мг (95.0%), чистотой 99.4% (t_{R} 17.500 мин).

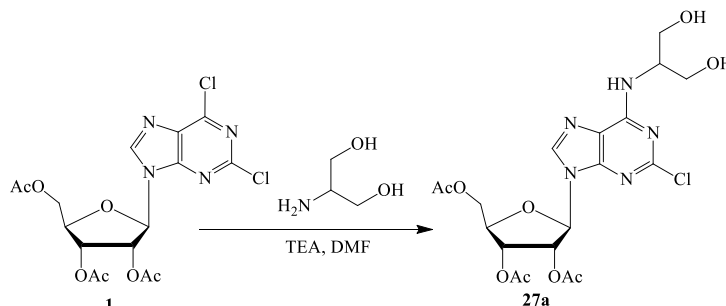
^1H ЯМР: δ 8.38 и 8.37 (м, 1 Н, Н8), 7.99 и 7.96 (м, 1 Н, NH), 6.16 (м, 1 Н, Н₁), 5.90 (т, $J = 5.71$, 1 Н, Н₂), 5.59 (м, 1 Н, Н₃), 5.03 (м, 0.25 Н, NHCH(CH₂C₆H₁₁)CH₂OH мини-форма), 4.68 (м, 1 Н, NHCH(CH₂C₆H₁₁)CH₂OH), 4.38 (м, 2.85 Н, NHCH(CH₂C₆H₁₁)CH₂OH, Н₄, Н_{5а}), 4.27 (м, 1 Н, Н_{5б}), 3.47 и 3.40 (м, 2 Н, NHCH(CH₂C₆H₁₁)CH₂OH), 2.13 (с, 3 Н, CH₃COO₃), 2.06 (с, 3 Н, CH₃COO₂), 2.03 (с, 3 Н, CH₃COO₅), 1.90–0.75 м. д. (м, 13 Н, CH₂-циклогексан).

^{13}C ЯМР: δ 169.88 (CH₃COO₅), 169.28 (CH₃COO₃), 169.14 (CH₃COO₂), 155.62 (C6 мини-форма), 155.18 (C6), 153.35 (C2), 152.87 (C2 мини-форма), 151.30 (C4 мини-форма), 149.15 (C4), 139.74 (C8), 139.40 (C8 мини-форма), 118.30 (C5), 117.11 (C5 мини-форма), 85.28 (C₁), 79.44 (C₄), 72.01 (C₂), 69.85 (C₃), 63.40 (NHCH(CH₂C₆H₁₁)CH₂OH) 62.59 (C₅), 51.72 (NHCH(CH₂C₆H₁₁)CH₂OH), 49.61, 38.19, 33.61, 33.52, 32.02, 26.01, 25.69, 25.49 (CH₂-циклогексан), 20.34 (CH₃COO₅), 20.23 (CH₃COO₃), 20.08 м. д. (CH₃COO₂).

^{15}N ЯМР: δ 245.63 (N7 мини-форма), 242.52 (N7), 226.77 (N1), 218.62 (N3), 167.04 (N9) 111.34 и 103.24 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₅H₃₄ClN₅O₈ [M+H]⁺ 568.2174, найдено 568.2203.

2-[(2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил)амино]пропан-1,3-диол (27a)



К раствору 300 мг (0.67 ммоль) **1** в 10 мл DMF при перемешивании добавляли 86 мг (0.95 ммоль) серинола и 100 мкл Et₃N (0.72 ммоль). Контроль прохождения реакции осуществляли при помощи ТСХ в системе CH₃Cl:MeOH 30:1. Через сутки реакционную смесь упарили, остаток очистили при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 35 мл) на обращенной фазе C18 с градиентом 0–30% в системе вода-этанол. Выход 324 мг (96.4%), чистотой 99.5% (t_R 9.395 мин).

^1H ЯМР: δ 8.40 (с, 1 Н, Н8), 7.83 и 7.74 (м и д, $J = 7.7$, 0.25 Н и 0.75 Н, NH), 6.16 (д, $J = 5.4$, 1 Н, Н₁), 5.90 (м, 1 Н, Н₂), 5.59 (м, 1 Н, Н₃), 4.92 (м, 0.25 Н, NHCH(CH₂OH)₂), 4.72 и 4.66 (2 м, 1.5 Н, 0.5 Н, NHCH(CH₂OH)₂), 4.40 и 4.39 (2 м, 2 Н, Н₅, Н₄), 4.28 и 4.27 (м, 1.80 Н, NHCH(CH₂OH)₂ и Н₅), 3.57 (м, 4 Н, NHCH(CH₂OH)₂), 2.13 (м, 3 Н, CH₃COO₃), 2.06 (м, 3 Н, CH₃COO₂), 2.03 м. д. (м, 3 Н, CH₃COO₅).

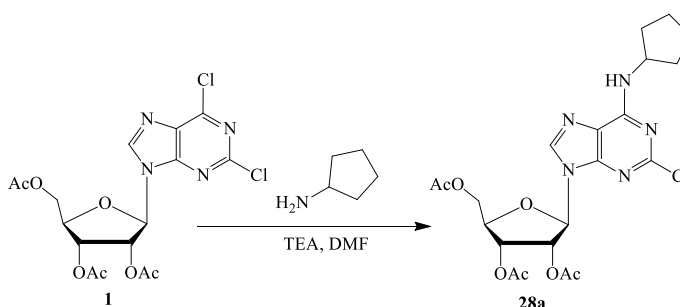
^{13}C ЯМР: δ 169.89 (CH₃COO₃), 169.29 (CH₃COO₅), 169.14 (CH₃COO₂), 155.18 (C6), 153.32 (C2), 152.82 (C2 мини-форма), 151.39 (C4 мини-форма), 149.17 (C4), 139.97 (C8), 118.57 (C5), 85.29 (C₁), 79.48 (C₄), 71.97 (C₂), 71.91 (C₂ мини-форма), 69.87 (C₃), 62.58

(C₅[•]), 60.82 (NHCH(CH₂OH)₂ мини-форма), 59.99 (NHCH(CH₂OH)₂), 55.90 мини-форма и 54.16 (NHCH(CH₂OH)₂), 20.36 (CH₃COO₅[•]), 20.24 (CH₃COO₃[•]), 20.07 м. д. (CH₃COO₂[•]).

¹⁵N ЯМР: δ 245.49 мини-форма и 242.26 (N7), 227.20 (N1), 219.14 (N3), 167.12 (N9), 105.91 мини-форма и 97.91 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₉H₂₃ClN₅O₉ [M - H]⁻ 500.1184, найдено 500.1303.

2-хлор-6-циклопентиламино-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин (28a)



Продукт получен по улучшенной методике из [221]. К раствору 500 мг (1.12 ммоль) **1** в 17 мл DMF при перемешивании добавляли 463 мкл (плотность 0.863 г/мл, 4.7 ммоль) циклопентиламина и 232 мкл Et₃N (1.67 ммоль). Контроль прохождения реакции осуществляли при помощи ТСХ в системе CH₃Cl:MeOH 30:1. Через двое суток реакционную смесь упарили, остаток очистили при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 20 мл) в системе CH₃Cl : MeOH 100 : 1. Выход 582 мг (95.2%), чистотой 97.5% (t_R 15.110 мин).

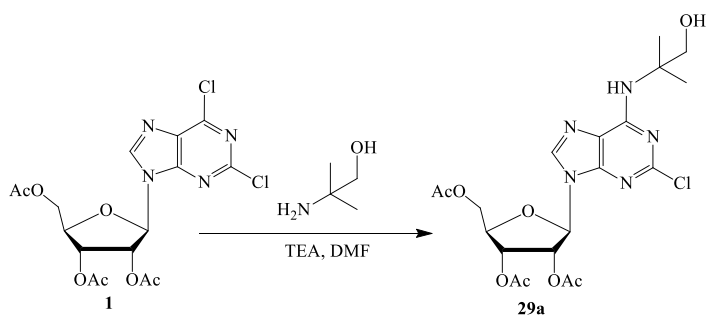
¹H ЯМР: δ 8.39 и 8.38 (уш.д и м, 2 H, NH и H8), 6.16 (д, J = 5.2, 1 H, H₁[•]), 5.89 (т, J = 5.6, 1 H, H₂[•]), 5.59 (м, 1 H, H₃[•]), 5.02 (м, 0.27 H, CH-1 циклопентан мини-форма), 4.39 (м, 2.67 H, H₅^{•a}, H₄[•] и CH-1 циклопентан), 4.27 (м, 1 H, H₅^{•b}), 2.13 (м, 3 H, CH₃COO₃[•]), 2.06 (м, 3 H, CH₃COO₂[•]), 2.03 (м, 3 H, CH₃COO₅[•]), 1.98 и 1.93 (2 м, 2 H, CH-2^a и CH-5^a циклопентан + его мини-форма), 1.72 (м, 2H, CH-3^β и CH-4^β циклопентан), 1.61 (м, 1.51 H, CH-2^β и CH-5^β циклопентан), 1.56 м. д. (м, 2.82 H, CH-3^a и CH-4^a циклопентан + CH-2^β и CH-5^β циклопентан мини-форма).

¹³C ЯМР: δ 169.89 (CH₃COO₅[•]), 169.29 (CH₃COO₃[•]), 169.13 (CH₃COO₂[•]), 154.59 (C6), 153.39 (C2), 149.14 (C4), 139.70 (C8), 118.42 (C5), 85.24 (C₁[•]), 79.46 (C₄[•]), 72.02 (C₂[•]), 69.86 (C₃[•]), 62.60 (C₅[•]), 53.87 (CH-1 циклопентан мини-форма), 51.64 (CH-1 циклопентан), 32.86 (CH-2 и CH-5 циклопентан мини-форма), 31.67 и 31.64 (CH-2 и CH-5 циклопентан), 23.36 и 23.25 (CH-3 и CH-4 циклопентан), 20.34 (CH₃CO₅[•]), 20.23 (CH₃CO₃[•]), 20.07 м. д. (CH₃CO₂[•]).

¹⁵N ЯМР: δ 245.57 мини-форма и 242.64 (N7), 227.68 (N1), 166.68 (N9), 115.8 мини-форма и 108.5 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₁H₂₅ClN₅O₇ [M-H]⁻ 494.1443, найдено 494.1316.

2-[(2-хлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил)амино]-2-метилпропан-1-ол (29a)



К раствору 1000 мг (2.24 ммоль) 2,6-дихлор-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)пурина **1** в смеси 10 мл ДМФА и 30 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли 300 мкл (279 мг, плотность 0.93 г/мл, 3.13 ммоль) 2-метил-2-амино-1-пропанола (бета-аминоизобутилового спирта) и 350 мкл Et₃N (2.50 ммоль). Контроль прохождения реакции осуществляли при помощи ТСХ в системе CH₃Cl:MeOH 30:1. Через трое суток реакционную смесь упарили, остаток очистили при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (объем колонки 80 мл) в системе CH₃Cl : MeOH 50 : 1. Выход 560 мг (50%), чистотой 94.8% (t_R 13.068 мин).

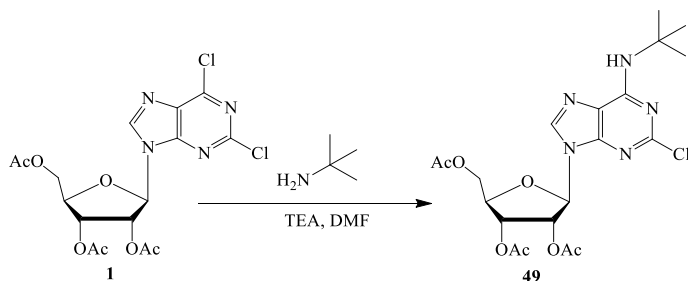
¹H ЯМР: δ 8.39 (с, 1 H, H8), 7.15 (с, 1 H, NH), 6.16 (д, *J* = 5.6, 1 H, H_{1'}), 5.90 (т, *J* = 5.7, 1 H, H_{2'}), 5.59 (м, 1 H, H_{3'}), 5.07 (т, *J* = 5.4, 1 H, А1В-ОН), 4.40 (м, 1 H, H_{5'a}), 4.38 (м, 1 H, H_{4'}), 4.27 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.57 (д, *J* = 5.7, 2 H, А1В-СН₂-ОН), 2.13 (с, 3 H, CH₃COO_{3'}), 2.06 (с, 3 H, CH₃COO_{2'}), 2.04 (с, 3 H, CH₃COO_{5'}), 1.43 (с, 6 H, Me).

¹³C ЯМР: δ 169.90 (CH₃COO_{5'}), 169.30 (CH₃COO_{3'}), 169.14 (CH₃COO_{2'}), 154.80 (C2), 152.44 (C6), 148.90 (C4), 139.95 (C8), 119.07 (C5), 85.31 (C_{1'}), 79.49 (C_{4'}), 71.97 (C_{2'}), 69.87 (C_{3'}), 67.44 (CH₂-А1В), 62.60 (C_{5'}), 55.83 (C-CH₃), 23.16 (2 CH₃-А1В), 20.36 (CH₃COO_{5'}), 20.24 (CH₃COO_{3'}), 20.08 (CH₃COO_{2'}).

¹⁵N ЯМР: δ 241.7 (N7), 167.1 (N9), 106.48 (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₀H₂₇ClN₅O₈ [M+H]⁺ 500.1548, найдено 500.1563.

N⁶-(трет-бутил)-2-хлор-9-(2',3',5'-три-О-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)-аденозин (49)



К раствору 30 мг (0,067 ммоль) **1** и 20 мкл (14 мг, 0.188 ммоль) трет-бутиламина в 1 мл ДМФА добавляли 50 мкл (36 мг, 0,360 ммоль) ТЕА. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч, протекание реакции контролировали при помощи ТСХ в системе хлороформ–метанол, 30:1. Растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в минимальном объеме хлороформа, и выделяли при помощи колоночной

хроматографии на силикагеле (объем колонки 20 мл). Элюировали градиентом концентрации метанола в хлороформе (0 – 20%, 400 мл). Выход 32 мг (98%) в виде твердого вещества желтого цвета с чистотой 98,47 % (t_R 16.323).

1H ЯМР: δ 8.39 (с, 1 H, H8), 7.57 (уш.с, 0.76 H, NH), 6.15 (д, $J = 5.5$, 1 H, H_{1'}), 5.90 (т, $J = 5.7$, 1 H, H_{2'}), 5.58 (м, 1 H, H_{3'}), 4.39 (м, 2 H, H_{5'a} и H_{4'}), 4.27 (м, 1 H, H_{5'b}), 2.13 (м, 3 H, CH₃COO_{3'}), 2.05 (м, 3 H, CH₃COO_{2'}), 2.03 (м, 3 H, CH₃COO_{5'}), 1.49 м. д. (с, 9 H, CH₃).

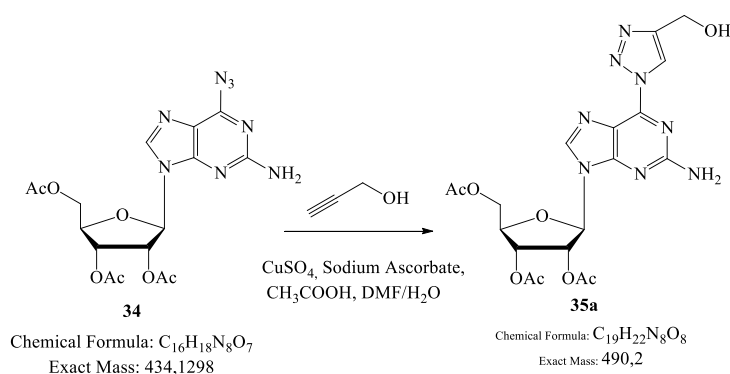
^{13}C ЯМР: δ 169.88 (CH₃COO_{5'}), 169.29 (CH₃COO_{3'}), 169.13 (CH₃COO_{2'}), 154.68 (C6), 152.43 (C2), 139.72 (C8), 85.27 (C_{1'}), 79.47 (C_{4'}), 71.97 (C_{2'}), 69.86 (C_{3'}), 62.60 (C_{5'}), 52.08 (C(CH₃)₃), 28.46 (C(CH₃)₃), 20.35 (CH₃COO_{5'}), 20.24 (CH₃COO_{3'}), 20.08 м. д. (CH₃COO_{2'}).

^{15}N ЯМР: δ 243.0 (N7), 167.3 (N9), 114.2 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₂₀H₂₆N₅O₇Cl [M–H][–] 482.1442, найдено 482.1438.

3.3. [3+2] азид-алкильное циклоприсоединение

2-амино-9-(2,3,5-три-*O*-ацетил- β -*D*-рибофуранозил)-6-[4-(3-гидроксиметил)-1*H*-1,2,3-триазол-1-ил]-9*H*-пурин (35a)



К раствору 500 мг (1.15 ммоль) 9-(2,3,5-три-*O*-ацетил- β -*D*-рибофуранозил)-2-амино-6-азидопурина **34** в 9 мл ДМФА при перемешивании добавляли 0.275 мл (4.60 ммоль) пропаргильного спирта и 6.5 мл 10% уксусной кислоты. Затем реакционную смесь вводили свежеприготовленные водные растворы аскорбата натрия (3 мл, 68 мг (0.34 ммоль)) и пентагидрата сульфата меди (II) (3 мл, 58 мг (0.23 ммоль)). Реакция велась при непрерывном перемешивании при комнатной температуре в темной колбе. За ходом протекания реакции следили с помощью ТСХ в системе хлористый метилен – метанол – водный аммиак 30:1:0.1 (по объему) и ВЭЖХ. Через 48 часов упаривали раствор.

Реакционную смесь растворяли в 5 мл хлористого метилена и очищали при помощи колоночной хроматографии на колонке с силикагелем 60 в градиенте хлористый метилен-метанол-водный аммиак (30:1:0.1 – 20:1:0.1 по объему) два раза. Выход 235 мг (41%) продукта в виде жёлтого масла, чистота по ВЭЖХ 95.4% (t_R 8.773).

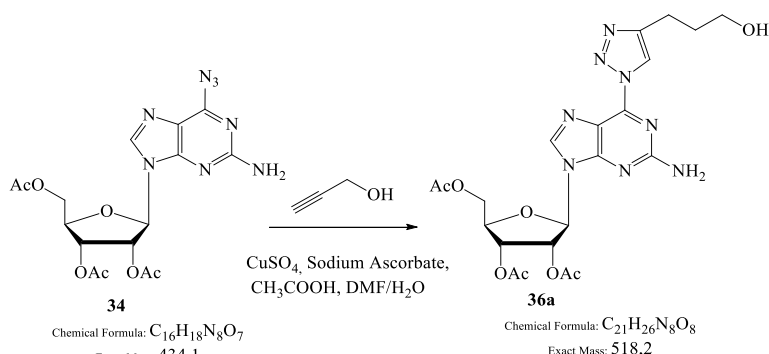
1H ЯМР: δ 8.95 (с, 1 H, H5-triazole), 8.49 (с, 1 H, H8), 7.11 (уш.с, 1.88 H, NH₂), 6.20 (д, $J = 5.9$, 1 H, H_{1'}), 5.94 (м, 1 H, H_{2'}), 5.59 (м, 1 H, H_{3'}), 5.40 (т, $J = 5.8$, 1 H, CH₂OH), 4.68 (д, $J = 5.8$, 2 H, CH₂OH), 4.44 (дд, $J = 11.8$, 3.8, 1 H, H_{5'a}), 4.39 (м, 1 H, H_{4'}), 4.32 (дд, $J = 11.7$, 5.7, 1 H, H_{5'b}), 2.14 (с, 3 H, CH₃COO_{3'}), 2.06 (с, 3 H, CH₃COO_{2'}), 2.05 м. д. (с, 3 H, CH₃COO_{5'}).

^{13}C ЯМР: δ 169.98 ($\text{CH}_3\text{COO}_5^\cdot$), 169.32 ($\text{CH}_3\text{COO}_3^\cdot$), 169.19 ($\text{CH}_3\text{COO}_2^\cdot$), 159.95 (C2), 155.91 (C4) 148.80 (C4-triazole), 144.92 (C6), 141.76 (C8), 122.56 (C5-triazole), 115.48 (C5), 84.74 (C $_1^\cdot$), 79.64 (C $_4^\cdot$), 71.89 (C $_2^\cdot$), 70.17 (C $_3^\cdot$), 62.87 (C $_5^\cdot$), 54.79 (CH_2OH), 20.35 ($\text{CH}_3\text{COO}_5^\cdot$), 20.24 ($\text{CH}_3\text{COO}_3^\cdot$), 20.08 м. д. ($\text{CH}_3\text{COO}_2^\cdot$).

^{15}N ЯМР: δ 359.15 (N3-triazole), 253.47 (N1 или N2-triazole), 242.11 (N7), 214.12 и 201.87 (N1 и N3), 163.45 (N9), 85.08 м. д. (NH_2).

HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 491.1639, найдено 491.1617.

2-амино-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)-6-[4-(3-гидроксипропил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил]-9H-пурин (36a)



К раствору 1000 мг (2.304 ммоль) 9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)-2-амино-6-азидопурина **34** в 33 мл ДМФА при перемешивании добавляли 0.8 мл (8.597 ммоль) 4-пентин-1-ола и 13.2 мл 10% уксусной кислоты. Затем реакционную смесь вводили свежеприготовленные водные растворы аскорбата натрия (8 мл, 262 мг (1.322 ммоль)) и сульфата меди (II) (8 мл, 98.4 мг (0.394 ммоль)). Реакция велась при непрерывном перемешивании при комнатной температуре в темной колбе. За ходом протекания реакции следили с помощью ТСХ в системе хлористый метилен-метанол-водный аммиак 30:1:0.1 (по объему).

Через 14 суток реакционную смесь упаривали и растворяли в 10 мл хлористого метилена, добавляли 30 мл гексана, выпавший осадок очищали на колонке с силикагелем 60 в градиенте хлористый метилен-метанол-водный аммиак (30:1:0.1 – 20:1:0.1). Затем проводили препаративную хроматографию на пластинках с силианизированным силикагелем в системе хлористый метилен-метанол 50:1. Выход 41 мг (4%) продукта в виде жёлтого масла, чистота по ВЭЖХ 95% (t_R 9.141).

^1H ЯМР: δ 8.82 (с, 1 H, H5-triazole), 8.47 (с, 1 H, H8), 7.09 (с, 2 H, NH_2), 6.19 (д, $J = 5.9$, 1 H, H $_1^\cdot$), 5.93 (м, 1 H, H $_2^\cdot$), 5.59 (м, 1 H, H $_3^\cdot$), 4.53 (т, $J = 5.2$, 1 H, CH_2OH), 4.42 (дд, $J = 11.8$, 4.0, 1 H, H $_{5'a}$), 4.40 (м, 1 H, H $_4^\cdot$), 4.33 (дд, $J = 11.8$, 5.8, 1 H, H $_{5'b}$), 3.49 (м, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.82 (т, $J = 7.6$, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.14 (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_3^\cdot$), 2.06 (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_2^\cdot$), 2.05 м. д. (с, 3 H, $\text{CH}_3\text{COO}_5^\cdot$), 1.84 м. д. (м, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

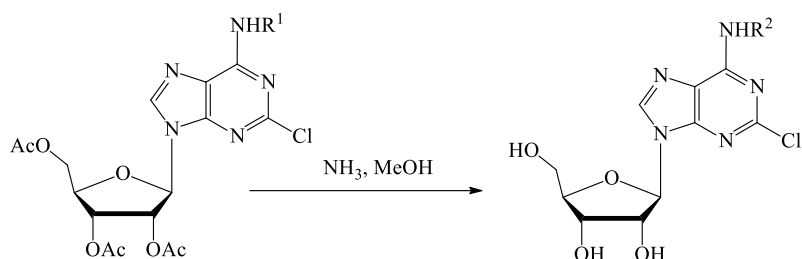
^{13}C ЯМР: δ 169.98 ($\text{CH}_3\text{COO}_5^\cdot$), 169.32 ($\text{CH}_3\text{COO}_3^\cdot$), 169.18 ($\text{CH}_3\text{COO}_2^\cdot$), 159.94 (C2), 155.89 (C4), 147.47 (C4-triazole), 145.01 (C6), 141.66 (C8), 121.71 (C5-triazole), 115.49 (C5),

84.69 (C_{1'}), 79.63 (C_{4'}), 71.86 (C_{2'}), 70.18 (C_{3'}), 62.87 (C_{5'}), 59.77 (C_H2OH), 31.87 (C_H2CH2OH), 21.30 (C_H2CH2CH2OH), 20.40 (C_H3COO_{5'}), 20.27 (C_H3COO_{3'}), 20.08 м. д. (C_H3COO_{2'}).

¹⁵N ЯМР: δ 361.3 (N3-triazole), 253.2 (N1 или N2-triazole), 242.5 (N7), 213.9 и 201.5 (N1 и N3), 163.3 (N9), 85.0 м. д. (NH₂).

HRMS (ESI) вычислено для C₂₁H₂₆N₈O₈ [M+H]⁺ 519.1952, найдено 519.1947.

3.4. Аммонолиз с получением свободного углеводного остатка



Общая методика проведения реакции

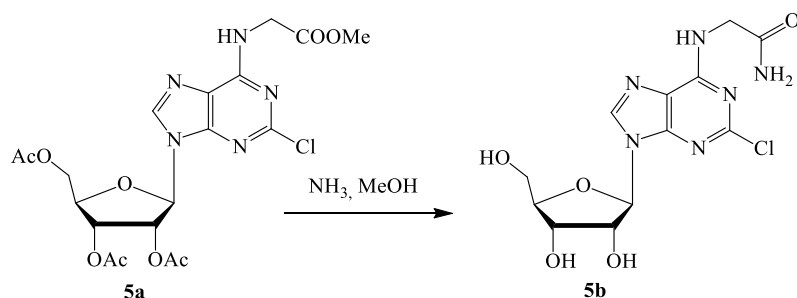
4 ммоль триацетата нуклеозида растворяли в 60 мл абсолютного MeOH, охлаждали на ледяной бане (0 ÷ +4 °С), насыщали аммиаком, пропуская его через CaH₂, оставляли на 24 часа при t° +4 °С, контролируя прохождение реакции ТСХ на силикагеле (хлороформ-метанол 10:1, 5:1), упаривали, затем очистку остатка проводили по одной из следующих методик.

Методика А: остаток растворяли в минимальном количестве системы хлороформ-метанол (10:1) и очищали флеш-хроматографией на 80 г Al₂O₃, элюируя ацетамид хлороформом, далее продукт элюировали хлороформом с градиентом метанола (10–30%).

Методика В: продукт растирали в минимальном количестве хлороформа, затем раствор ацетамида в хлороформе декантировали и повторяли процедуру. Через 2-3 этапа повторения такой процедуры осадок из маслянистого становился твердым, что свидетельствовало об отсутствии ацетамида. Методика использовалась на небольших количествах продукта, нерастворимого в хлороформе. Однако в спектрах ЯМР продуктов, выделенных при помощи этой методики, встречаются сигналы остаточных количеств ацетамида.

Методика С: продукт растворяли в воде и очищали хроматографией на колонке с силикагелем с обращенной фазой С18 объемом 50 мл, элюируя ацетамид водой, продукт элюировали градиентом концентрации этанола в воде (0 – 30%, 400 мл).

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-глицина (5b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.54 г (95%) с чистотой 96.73% (t_R 8.120 мин). Температура плавления 139-142 °С.

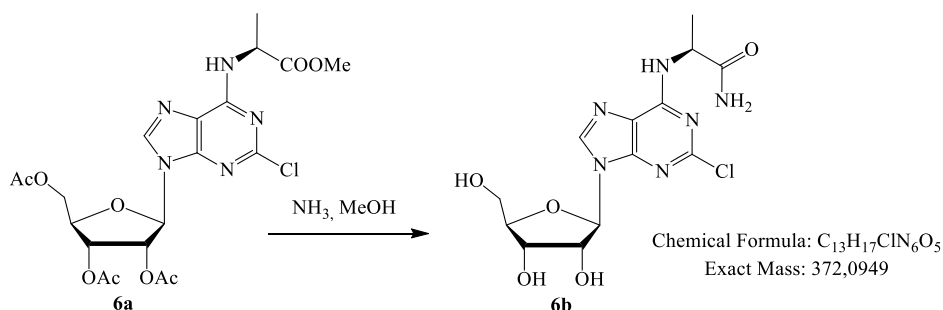
1H ЯМР: δ 8.43 и 8.40 (2 сигн, 1 H, H8), 8.21 и 7.82 (2 сигн, 0.83 и 0.43 H, NH), 7.44 и 7.06 (2 с, 1.20 и 0.80 H, NH₂), 5.84 (д, $J = 5.8$, 1 H, H_{1'}), 5.50 (с, 1 H, OH_{2'}), 5.21 (с, 1 H, OH_{3'}), 5.07 (с, 1 H, OH_{5'}), 4.46 и 3.99 (м и д, $J = 4.8$, 0.31 и 1.48 H, $^{\alpha}CH_2$ -Gly), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.55 м. д. (м, 1 H, H_{5'b}).

^{13}C ЯМР: δ 170.80 (CONH₂), 155.06 (C6), 152.82 (C2), 149.55 (C4), 139.76 (C8), 118.72 (C5), 87.01 (C_{1'}), 85.29 (C_{4'}), 73.28 (C_{2'}), 69.94 (C_{3'}), 60.86 (C_{5'}), 44.95 мини-форма и 42.41 м. д. ($^{\alpha}CH_2$ -Gly).

^{15}N ЯМР: δ 240.7 (N7), 227.3 (N1), 171.2 (N9), 106.4 мини-форма и 85.9 (NH), 104.1 м. д. (NH₂).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₂H₁₅N₆O₅Cl [M+H]⁺ 359.0865, найдено 359.0882.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-аланина (6b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.57 г (93%) с чистотой 95.39% (t_R 6.464 мин). Температура плавления 133-139 °С.

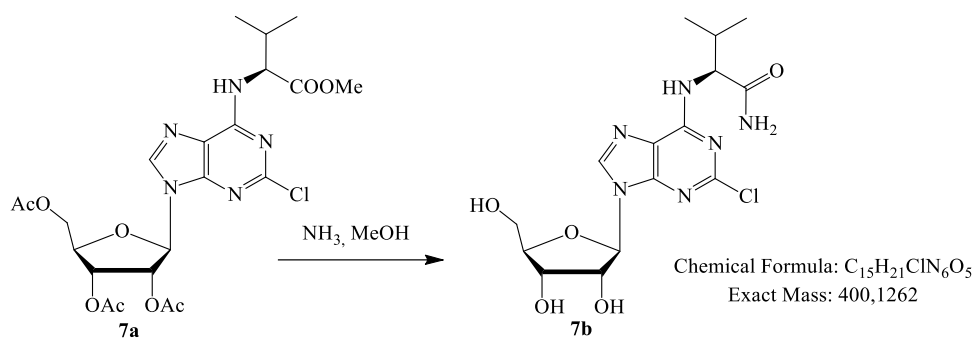
1H ЯМР: δ 8.44 и 8.41 (2 сигн, 1 H, H8), 7.95 и 7.77 (д, $J = 6.6$, и м, 0.86 и 0.19 H, NH), 7.45 и 7.09 (2 с, 0.87 и 0.74 H, NH₂), 5.84 (д, $J = 5.6$, 1 H, H_{1'}), 5.47 (д, $J = 6.0$, 1 H, OH_{2'}), 5.18 (д, $J = 4.9$, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.61 и 3.76 (2 м, 0.20 и 0.75 H, $^{\alpha}CH$ -Ala), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.57 (м, 1 H, H_{5'b}), 1.42 и 1.36 м. д. (д, $J = 7.1$, и д, $J = 7.0$, 3 H, $^{\beta}CH_3$ -Ala).

^{13}C ЯМР: δ 173.68 (CONH₂), 153.99 (C6), 149.47 (C4), 139.80 (C8), 118.41 (C5), 87.01 (C_{1'}), 85.33 (C_{4'}), 73.29 (C_{2'}), 69.95 (C_{3'}), 60.92 (C_{5'}), 48.86 мини-форма и 47.75 м. д. ($^{\alpha}CH$ -Ala), 18.00 ($^{\beta}CH_3$ -Ala).

^{15}N ЯМР: δ 240.9 (N7), 171.3 (N9), 105.0 мини-форма и 98.5 (NH), 102.8 м. д. (NH₂).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₃H₁₇N₆O₅Cl [M+H]⁺ 373.1022, найдено 373.1037.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-валина (7b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.69 г (90%) с чистотой 98.74% (t_R 11.523). Температура плавления 139-141 °С.

1H ЯМР: δ 8.45 (с, 1 H, H 8), 7.85 и 7.52 (м и д, $J = 8.4, 0.19$ и 0.81 H, NH), 7.55, 7.38, 7.20, и 7.14 (4 с, 0.60, 0.17, 0.71, и 0.22 H, NH_2), 5.85 (д, $J = 5.8$, 1 H, $H_{1'}$), 5.48 (д, $J = 6.2$, 1 H, $OH_{2'}$), 5.33 и 4.53 (2 м, 0.19 и 0.70 H, $^{\alpha}CH$ -Val), 5.19 (д, $J = 5.0$, 1 H, $OH_{3'}$), 5.03 (м, 1 H, $OH_{5'}$), 4.53 (м, 1 H, $H_{2'}$ и 0.70 H, $^{\alpha}CH$ -Val), 4.14 (м, 1 H, $H_{3'}$), 3.95 (м, 1 H, $H_{4'}$), 3.67 (м, 1 H, $H_{5'a}$), 3.56 (м, 1 H, $H_{5'b}$). 2.19 (м, 1 H, $^{\beta}CH$ -Val), 0.96 (д, $J = 6.7$, CH_3 -Val), 0.93 м. д. (д, $J = 6.6$, CH_3 -Val).

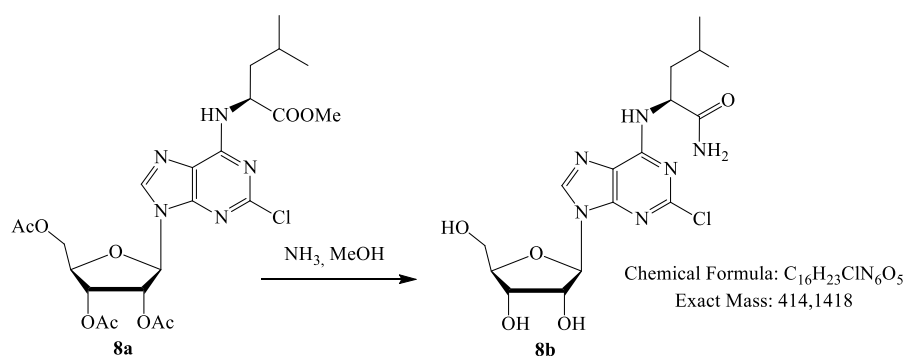
^{13}C ЯМР основная форма (81%): δ 172.34 ($CONH_2$), 154.72 (C6), 152.81 (C2), 149.66 (C4), 140.29 (C8), 118.51 (C5), 87.42 ($C_{1'}$), 85.63 ($C_{4'}$), 73.57 ($C_{2'}$), 70.24 ($C_{3'}$), 61.22 ($C_{5'}$), 58.88 ($^{\alpha}CH$ -Val), 30.52 ($^{\beta}CH$ -Val), 19.13 (CH_3 -Val), 18.28 и 17.45 м. д. (CH_3 -Val).

^{13}C ЯМР мини-форма (19%): δ 172.49 ($CONH_2$), 155.47 (C6) 152.63 (C2), 151.89 (C4), 139.61 (C8), 117.32 (C5), 87.20 ($C_{1'}$), 85.63 ($C_{4'}$), 73.57 ($C_{2'}$), 70.24 ($C_{3'}$), 61.22 ($C_{5'}$), 61.04 ($^{\alpha}CH$ -Val), 30.52 ($^{\beta}CH$ -Val), 19.13 (CH_3 -Val), 18.28 и 17.45 м. д. (CH_3 -Val).

^{15}N ЯМР: δ 240.1 (N7), 227.1 (N1), 171.4 (N9), 106.4 (NH_2), 101.1 мини-форма и 93.1 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $C_{15}H_{21}N_6O_5Cl$ $[M+H]^+$ 401.1335, найдено 401.1347.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-лейцина (8b)



Продукт выделен при помощи методики С. Выход 1.49 г (90%) с чистотой 99.76% (t_R 4.072 мин).

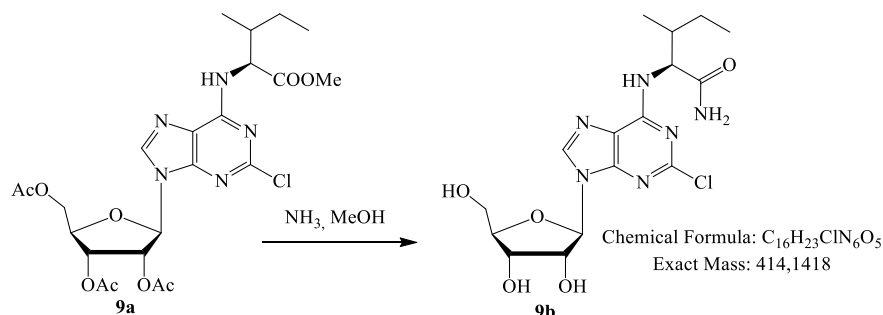
^1H ЯМР: δ 8.43 и 8.42 (2 с, 1 H, H8 и H8 мини-форма), 8.16 (уш.д, 0.18 H, NHCH мини-форма), 8.06 (д, $J = 7.3$, 0.75 H, NHCH), 7.42 (с, 0.21 H, NH₂), 7.31 (с, 0.26 H, NH₂ мини-форма), 7.04 и 7.00 (2 с, 1 H, NH₂ и NH₂ мини-форма), 5.84 (д, $J = 5.9$, 1 H, H_{1'}), 5.49 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.42 (м, 0.24 H, NHCH мини-форма), 5.20 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.65 (м, 0.78 H, NHCH), 4.54 (м, 1 H, H_{2'}), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.56 (м, 1 H, H_{5'b}), 1.81 (м, 0.76 H, NHCHCH₂^{Leu}), 1.66 (м, 1.56 H, NHCHCH₂CH^{Leu} и NHCHCH₂^{Leu} мини-форма), 1.58 (м, 0.78 H, NHCHCH₂^{Leu}), 0.91 и 0.89 (2 д, $J = 6.4$ и $J = 6.5$, 5.54 H, 2 CH₃), 0.85 м. д. (м, 0.77 H, CH₃^{Leu}).

^{13}C ЯМР: δ 173.92 (CHCONH₂ мини-форма), 173.75 (CHCONH₂), 154.75 (C6), 152.81 (C2), 151.80 (C4 мини-форма), 149.64 (C4), 140.10 (C8), 139.97 (C8 мини-форма), 118.58 (C5), 87.41 (C_{1'}), 85.62 (C_{4'}), 73.56 (C_{2'}), 70.27 (C_{3'}), 61.25 (C_{5'}), 54.67 ($^{\alpha}\text{CH}$ -Leu мини-форма), 52.25 ($^{\alpha}\text{CH}$ -Leu), 40.77 (NHCHCH₂CH^{Leu}), HSQC 40.52 (NHCHCH₂^{Leu}), HSQC 23.05 (CH₃^{Leu}), 21.23 м. д. (CH₃^{Leu}).

^{15}N ЯМР: δ 242.1 (N7), 226.8 (N1), 171.4 (N9), 103.9 (NH₂), 97.5 и 96.7 мини-форма м. д. (NH^{Leu}).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₆H₂₄N₆O₅Cl [M+H]⁺ 415.1497, найдено 415.1512.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-изолейцина (9b)



При снятии ацетатов с **9a** независимо от условий (степень насыщения метанола аммиаком, время выдерживания, температура, концентрация) образовывался преимущественно метиловый эфир, который был выделен отдельно. Продукт выделен при помощи методики А. Продукт в виде амида получен в количестве 132 мг (8%) с чистотой 99.20% (t_R 8.489 мин).

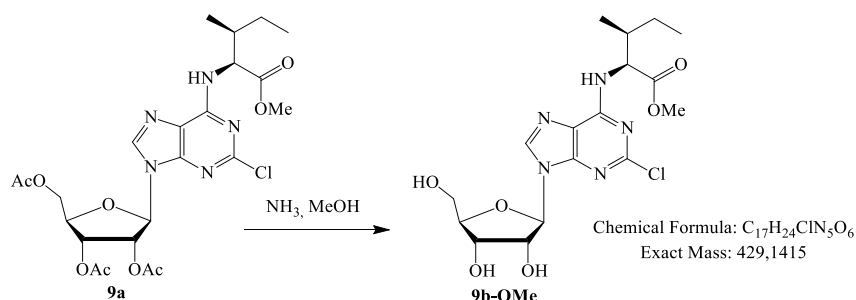
^1H ЯМР: δ 8.45 (с, 1 H, H8), 7.91 (уш.д, 0.17 H, NHCH мини-форма), 7.60 (д, $J = 8.7$, 0.70 H, NHCH), 7.53 (с, 0.68 H, NH₂), 7.33 (с, 0.15 H, NH₂ мини-форма), 7.17 (с, 0.73 H, NH₂), 7.14 (с, 0.20 H, NH₂ мини-форма), 5.84 (д, $J = 5.8$, 1 H, H_{1'}), 5.48 (м, 1 H, OH_{2'}) 5.33 (м, 0.18 H, $^{\alpha}\text{CH}^{\text{Ile}}$ mainform), 5.19 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.03 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.53 (м, 1.74 H, H_{2'} и $^{\alpha}\text{CH}^{\text{Ile}}$), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.67 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.56 (м, 1 H, H_{5'b}), 1.95 (м, 1 H, $^{\beta}\text{CH}^{\text{Ile}}$), 1.52 (м, 1 H, $^{\gamma}\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.17 (м, 1 H, $^{\gamma}\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 0.93 (д, $J = 6.7$, 3 H, $^{\gamma}\text{CH}_3^{\text{Ile}}$), 0.86 м. д. (м, 3 H, $^{\delta}\text{CH}_3^{\text{Ile}}$), 2.09 (м, 0.65 H, $^{\beta}\text{CH}^{\text{Ile}}$), 2.03 (с и м, 3.46 H, $^{\beta}\text{CH}^{\text{Ile}}$), 1.55 (м, 0.71 H, $^{\gamma}\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.46 (м, 0.31 H, $^{\gamma}\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.37 (м, 0.33 H, $^{\gamma}\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.29 (м, 0.77 H, $^{\gamma}\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 0.93 (м, 3 H, $^{\gamma}\text{CH}_3^{\text{Ile}}$), 0.87 м. д. (м, 3 H, $^{\delta}\text{CH}_3^{\text{Ile}}$).

^{13}C ЯМР: δ 172.54 ($\alpha\text{CH-CONH}_2$ мини-форма), 172.45 ($\alpha\text{CH-CONH}_2$), 154.60 (C6), 152.83 (C2), 149.65 (C4), 140.24 (C8), 118.47 (C5), 87.41 (C_{1'}), 85.62 (C_{4'}), 73.56 (C_{2'}), 70.24 (C_{3'}), 61.21 (C_{5'}), ($\alpha\text{CH-COOCH}_3$), 60.13 ($\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$ мини-форма), 58.06 ($\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$), 36.55 ($\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$), 24.59 ($\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 15.33 ($\gamma\text{CH}_3^{\text{Ile}}$), 10.84 м. д. ($\delta\text{CH}_3^{\text{Ile}}$).

^{15}N ЯМР: δ 242.5 (N7 мини-форма), 240.4 (N7), 227.1 (N1), 222.2 (N3), 171.7 (N9), 106.7 и 106.6 мини-форма (NH₂), 94.8 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₆H₂₃N₆O₅Cl [M+H]⁺ 415.1497, найдено 415.1492.

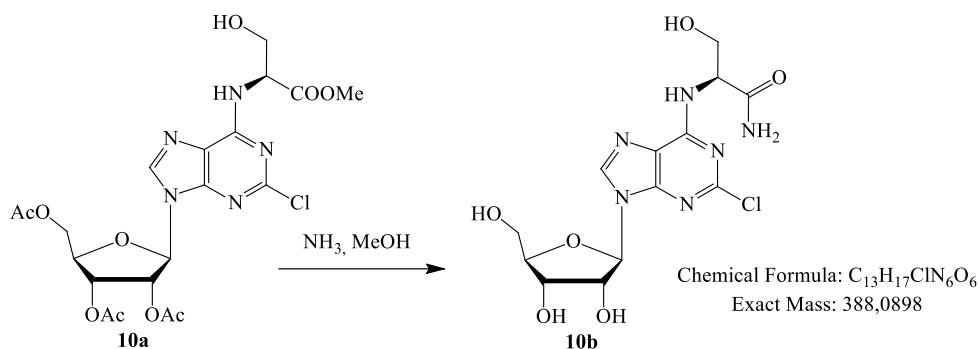
Метилловый эфир N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-изолейцина (9b-OMe)



При снятии ацетатов с **9a** независимо от условий (степень насыщения метанола аммиаком, время выдерживания, температура, концентрация) образовывался преимущественно метилловый эфир, который был выделен отдельно. Продукт выделен при помощи методики А. Продукт в виде метилового эфира получен в количестве 1.56 г (92%) с чистотой 99.20% (t_R 11.700 мин).

^1H ЯМР: δ 8.53 (уш.д, 0.59 Н, NHCH), 8.46 (с, 0.66 Н, Н8), 8.42 и 8.41 (м, 0.58 Н, С8 и NHCH мини-форма), 7.25 (с, 1.45 Н, ацетамид), 6.65 (с, 1.83 Н, ацетамид), 5.85 (д, $J = 5.6$, 1 Н, Н_{1'}), 5.55 (м, 0.27 Н, $\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$ мини-форма), 5.47 (д, $J = 6.0$ Н, 1 Н, OH_{2'}), 5.18 (д, $J = 5.0$ Н, 1 Н, OH_{3'}), 5.03 (м, $J = 5.5$ Н, 1 Н, OH_{5'}), 4.52 (м, 1.65 Н, Н_{2'} и $\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$ основная форма), 4.14 (м, 1 Н, Н_{3'}), 3.95 (м, 1 Н, Н_{4'}), 3.65 (м, 4 Н, OCH₃ и Н_{5'a}), 3.56 (м, 1 Н, Н_{5'b}), 2.09 (м, 0.66 Н, $\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$), 2.02 (м, 0.30 Н, $\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$ мини-форма), 1.76 (с, 6.74 Н, ацетамид), 1.55 (0.57 Н, $\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.46 (0.11 Н, $\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.37 (0.14 Н, $\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 1.29 (0.66 Н, $\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 0.93 (м, 3 Н, $\gamma\text{CH}_3^{\text{Ile}}$), 0.88 м. д. (м, 3 Н, $\delta\text{CH}_3^{\text{Ile}}$). ^{13}C ЯМР: δ 171.86 ($\alpha\text{CH-COOMe}$), 171.31 (ацетамид), 154.65 (C6), 152.56 (C2), 151.81 (C4 мини-форма), 149.94 (C4), 140.18 (C8) 139.80 (C8 мини-форма), 118.43 (C5), 87.36 (C_{1'}), 85.62 (C_{4'}), 73.63 (C_{2'}), 70.24 (C_{3'}), 61.21 (C_{5'}), 59.84 ($\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$ мини-форма), 57.90 ($\alpha\text{CH}^{\text{Ile}}$), 51.76 (COOCH₃ мини-форма), 51.54 (COOCH₃), 36.84 ($\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$ мини-форма), 35.34 ($\beta\text{CH}^{\text{Ile}}$), 25.30 ($\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$), 24.53 ($\gamma\text{CH}_2^{\text{Ile}}$ мини-форма), 22.37 (ацетамид), 15.32 ($\gamma\text{CH}_3^{\text{Ile}}$), 10.72 м. д. ($\delta\text{CH}_3^{\text{Ile}}$). ^{15}N ЯМР: δ 241.7 (N7), 227.8 (N1), 171.4 и 170.8 мини-форма (N9), 109.5 (ацетамид), 100.5 мини-форма и 95.3 м. д. (NH). HRMS (ESI): вычислено для C₁₇H₂₅N₆O₅Cl [M+H]⁺ 430.1493, найдено 430.1499.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-серина (10b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.46 г (83%) с чистотой 96.76% (t_R 10.501 мин). Температура плавления 210-213 °С.

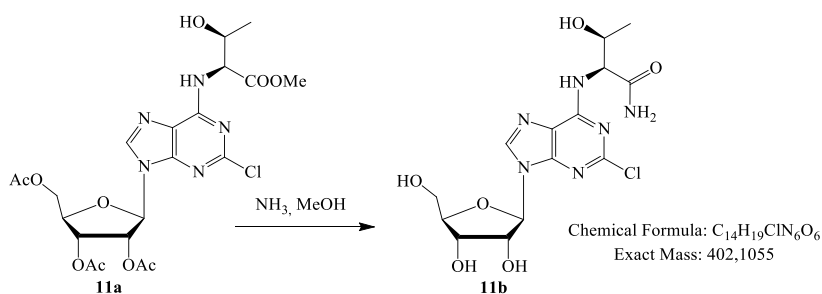
^1H ЯМР: δ 8.46 и 8.43 (2 сигн, 0.82 и 0.16 Н, Н8), 7.69 и 7.62 (2 м, 0.20 и 0.75 Н, NH), 7.48, 7.44, 7.17, и 7.14 (4 с, 0.79, 0.17, 0.81, и 0.18 Н, NH₂), 5.85 (д, $J = 7.6$, 1 Н, Н_{1'}), 5.48 (д, $J = 5.9$, 1 Н, OH_{2'}), 5.37 и 4.63 (2 м, 0.19 и 0.80 Н, $^{\alpha}\text{CH-Ser}$), 5.19 (д, $J = 4.6$, 1 Н, OH_{3'}), 5.04 (м, 1.85 Н, CH₂OH и OH_{5'}), 4.93 (м, 0.19 Н, CH₂OH), 4.53 (м, 1 Н, Н_{2'}), 4.14 (м, 1 Н, Н_{3'}), 3.95 (м, 1 Н, Н_{4'}), 3.81 (м, 2 Н, $^{\beta}\text{CH}_2\text{-Ser}$), 3.67 (м, 1 Н, Н_{5'a}), 3.57 м. д. (м, 1 Н, Н_{5'b}).

^{13}C ЯМР: δ 171.02 (CONH₂), 149.38 (C4), 140.02 (C8), 118.50 (C5), 87.08 (C_{1'}), 85.32 (C_{4'}), 73.34 (C_{2'}), 69.96 (C_{3'}), 60.94 (C_{5'}), 61.23 ($^{\beta}\text{CH}_2\text{-Ser}$). 58.13 мини-форма и 55.86 м. д. ($^{\alpha}\text{CH-Ser}$).

^{15}N ЯМР: δ 240.6 (N7), 227.5 (N1), 171.4 (N9), 104.7 (NH₂), 99.5 мини-форма и 91.5 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_6\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 389.0971, найдено 389.0953.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-треонина (11b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.69 г (93%) с чистотой 98.67% (t_R 5.529 мин). Температура плавления 212-215 °С.

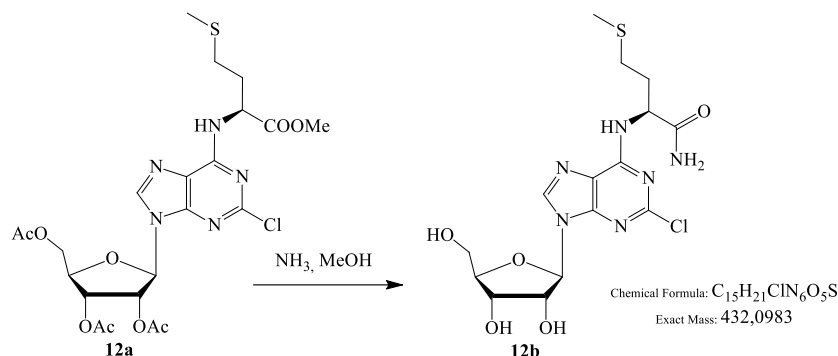
^1H ЯМР: δ 8.46 и 8.43 (2 сигн, 0.84 и 0.18 Н, Н8), 7.50, 7.45, 7.14, и 7.10 (4 с, 0.75, 0.20, 0.71, и 0.18 Н, NH₂), 7.33 и 7.26 (м и д, $J = 7.9$, 0.16 и 0.75 Н, NH), 5.84 (д, $J = 5.8$, 1 Н, Н_{1'}), 5.50 (д, $J = 5.9$, 1 Н, OH_{2'}), 5.35 и 4.53 (перекрыт сигналом Н_{2'}) (2 м, 0.15 и 0.85 Н, $^{\alpha}\text{CH-Thr}$), 5.21 (д, $J = 4.7$, 1 Н, OH_{3'}), 5.14 (д, $J = 6.0$, 0.76 Н, CH-OH), 5.06 (т, $J = 5.6$, 1 Н, OH_{5'}), 4.94 (м, 0.14 Н, CH-OH), 4.53 (м, 1.77 Н, Н_{2'} и $^{\alpha}\text{CH-Thr}$), 4.19 и 4.04 (2 м, 0.96 и 0.04 Н, $^{\beta}\text{CH-Thr}$), 4.14 (м, 1 Н, Н_{3'}), 3.95 (м, 1 Н, Н_{4'}), 3.67 (м, 1 Н, Н_{5'a}), 3.56 (м, 1 Н, Н_{5'b}), 1.13 м. д. (д, 3 Н, $J = 6.4$, $^{\gamma}\text{CH}_3\text{-Thr}$).

^{13}C ЯМР: δ 171.64 (CONH₂), 155.02 (C₆), 152.85 (C₂), 149.65 (C₄), 140.41 (C₈), 118.76 (C₅), 87.50 (C_{1'}), 85.69 (C_{4'}), 73.66 (C_{2'}), 70.30 (C_{3'}), 66.67 (β CH-Thr), 61.48 мини-форма и 59.22 (α CH-Thr), 61.28 (C_{5'}), 20.46 м. д. (γ CH₃-Thr).

^{15}N ЯМР: δ 239.6 (N7), 227.4 (N1), 171.1 (N9), 105.2 (NH₂), 95.9 мини-форма и 88.1 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₄H₁₉N₆O₆Cl [M+H]⁺ 403.1134, найдено 403.1124.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-метионина (12b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.82 г (93%) с чистотой 95.12% (t_R 7.218 мин). Температура плавления 115-117 °С.

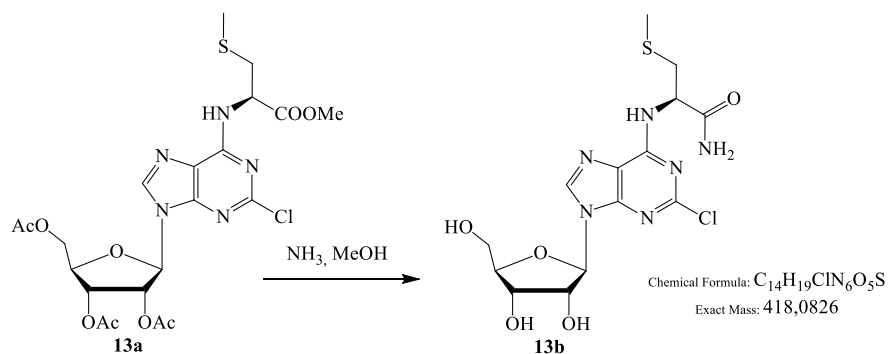
^1H ЯМР: δ 8.44 и 8.43 (2 сигн, 0.70 и 0.21 Н, Н₈), 8.15 (д, $J = 7.6$, 1 Н, NH), 7.45, 7.42, 7.12, и 7.07 (4 сигн, 0.66, 0.15, 0.65, и 0.11 Н, NH₂), 5.84 (д, $J = 5.9$, 1 Н, Н_{1'}), 5.47 (д, $J = 5.6$, 1 Н, OH_{2'}), 5.39 и 4.68 (2 м, 0.11 Н и 0.67 Н, α CH-Met), 5.18 (д, $J = 4.9$, 1 Н, OH_{3'}), 5.04 (т, $J = 5.5$, 1 Н, OH_{5'}), 4.53 (м, 1 Н, Н_{2'}), 4.14 (м, 1 Н, Н_{3'}), 3.95 (м, 1 Н, Н_{4'}), 3.67 (м, 1 Н, Н_{5'a}), 3.56 (м, 1 Н, Н_{5'b}), 2.53 и 2.48 перекрыт сигналом ДМСО-*d*₆ (γ CH₂-Met), 2.11 (м, 1.46 Н, β CH₂-Met), 2.05 м. д. (сигн, 3 Н, SCH₃).

^{13}C ЯМР: δ 172.86 (CONH₂), 154.88 (C₆), 152.60 (C₂), 149.63 (C₄), 139.93 (C₈), 118.70 (C₅), 87.09 (C_{1'}), 85.46 (C_{4'}), 73.29 (C_{2'}), 70.06 (C_{3'}), 62.65 мини-форма и 52.80 (α CH-Met), 60.90 (C_{5'}), 30,84 (β CH₂ Met), 29,54 (γ CH₂ Met), 14.05 м. д. (SCH₃).

^{15}N ЯМР: δ 241.6 (N7), 171.3 (N9), 103.9 (NH₂), 102.8 мини-форма и 95.3 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₅H₂₁N₆O₅ClS [M+H]⁺ 433.1062, найдено 433.1103.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-(S-метил)цистеина (13b)



Продукт выделен при помощи методики В. Выход 1.21 г (80%) с чистотой 96.07% (t_R 6.713 мин). Температура плавления 92-95 °С.

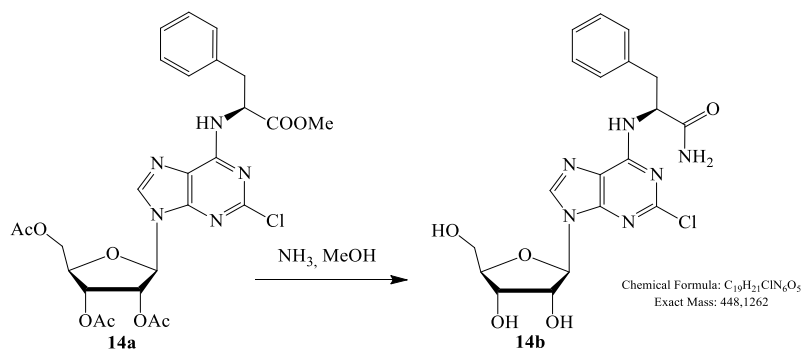
1H ЯМР: δ 8.45 (с, 1 H, H₈), 8.14 и 8.03 (2 д, $J = 8.1$ и $J = 8.9$, 0.21 и 0.72 H, NH), 7.57, 7.52, и 7.24 (3 сигн, 0.76, 0.23, и 1.00 H, NH₂), 5.85 (д, $J = 5.9$, 1 H, H_{1'}), 5.60 и 4.82 (2 м, 0.18 и 0.75 H, $^{\alpha}CH-Cys$), 5.48 (д, $J = 6.1$, 1 H, OH_{2'}), 5.19 (д, $J = 4.9$, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (т, $J = 5.5$, 1 H, OH_{5'}), 4.54 (м, 1 H, H_{2'}), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.96 (м, 1 H, H_{4'}), 3.67 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.56 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.03, 2.97 и 2.84 (3 м, 1 H, $^{\beta}CH-Cys$), 2.09 м. д. (сигн, 3 H, SCH₃).

^{13}C ЯМР: δ 171.10 (CONH₂), 154.70 (C₆), 152.70 (C₂), 149.72 (C₄), 140.24 (C₈), 118.64 (C₅), 87.41 (C_{1'}), 85.64 (C_{4'}), 73.55 (C_{2'}), 70.26 (C_{3'}), 61.23 (C_{5'}), 55.34 мини-форма и 52.88 ($^{\alpha}CH-Cys$), 35.69 ($^{\beta}CH_2-Cys$), 14.98 м. д. (SCH₃).

^{15}N ЯМР: δ 241.0 (N₇), 226.7 (N₁), 221.7 (N₃), 171.3 (N₉), 105.3 (NH₂), 104.3 мини-форма и 95.5 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₄H₁₉N₆O₅ClS [M+H]⁺ 419.0904, найдено 419.0906.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-фенилаланина (14b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.18 г (66%) с чистотой 99.50% (t_R 8.962 мин).

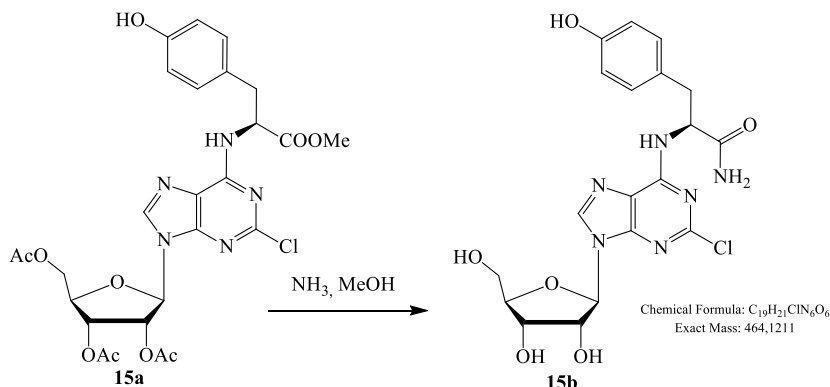
1H ЯМР: δ 8.40 (с, 1 H, H₈), 8.16 (м, 0.21 H, NH), 8.03 (д, $J = 7.9$, 0.76 H, NH), 7.61 (с, 0.75 H, NH₂), 7.55 (с, 0.21 H, NH₂), 7.35 и 7.32 (м и д, $J = 6.5$, 2 H, $^2CH^{Phe}$ и $^6CH^{Phe}$), 7.26 (т, $J = 7.4$, 2 H, $^3CH^{Phe}$ и $^5CH^{Phe}$), 7.19 (с, 0.73 H, NH₂), 7.15 (м, 1.29 H, NH₂ и $^4CH^{Phe}$), 5.81 (д, $J = 5.7$, 1 H, H_{1'}), 5.60 (м, 0.21 H, NHCH мини-форма), 5.46 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.17 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.02 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.86 (м, 0.77 H, NHCH), 4.51 (м, 0.72 H, H_{2'}), 4.13 (м, 1 H, H_{3'}), 3.94 (м, 1 H, H_{4'}), 3.65 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.55 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.25 (м, 0.24 H, NHCHCH₂ мини-форма), 3.19 (м, 0.76 H, NHCHCH₂), 3.14 (м, 0.77 H, NHCHCH₂), 2.97 м. д. (м, 0.25 H, NHCHCH₂ мини-форма).

^{13}C ЯМР: δ 172.77 (CONH₂ mini), 172.57 (CONH₂), 155.41 (C₆ mini), 154.59 (C₆), 152.69 (C₂), 152.50 (C₂ mini), 151.68 (C₄ mini), 149.58 (C₄), 140.08 (C₈), 139.71 (C₈ mini), 138.04 ($^1CH^{Phe}$), 129.06 ($^2CH^{Phe}$ и $^6CH^{Phe}$), 127.93 ($^3CH^{Phe}$ и $^5CH^{Phe}$), 126.14 ($^4CH^{Phe}$), 118.55 (C₅), 117.52 (C₅ mini), 87.33 (C_{1'}), 87.16 (C_{1'} mini), 85.61 (C_{4'}), 73.53 (C_{2'}), 73.44 (C_{2'} mini), 70.26 (C_{3'}), 70.19 (C_{3'} mini), 61.24 (C_{5'}), 61.15 (C_{5'} mini), 57.63 ($^{\alpha}CH^{Phe}$ mini), 55.07 ($^{\alpha}CH^{Phe}$), 37.73 ($^{\beta}CH_2^{Phe}$ mini), 37.00 м. д. ($^{\beta}CH_2^{Phe}$).

^{15}N ЯМР: δ 243.8 (N7 мини-форма), 241.2 (N7), 227.5 (N1), 221.6 (N3), 171.4 (N9), 104.1 (NH₂), 104.0 мини-форма и 95.8 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₉H₂₁N₆O₅Cl [M+H]⁺ 449.1340, найдено 449.1339.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-тирозина (15b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.97 г (94%) с чистотой 97.95% (tr 6.806 мин). Температура плавления 110-115 °С.

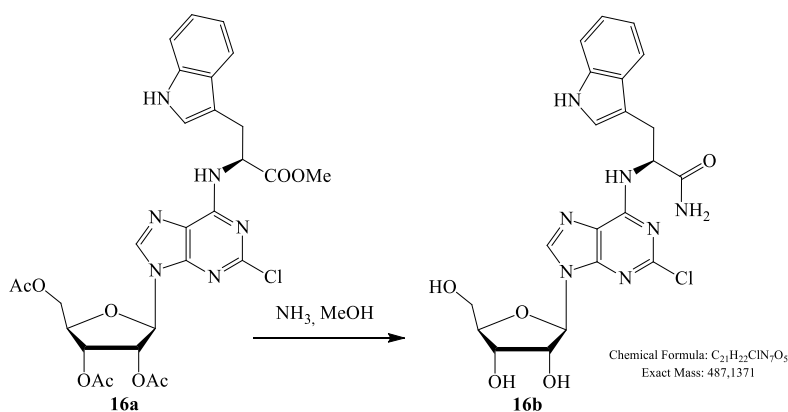
^1H ЯМР: δ 9.14 (с, 1 H, OH^{Tyr}), 8.40 (с, 1 H, H8), 8.04 и 7.88 (2 д, $J = 9.2$ и $J = 8.3$, 0.21 и 0.74 H, NH), 7.57, 7.50, и 7.15 (3 сигн, 0.72, 0.20, и 0.71 H, NH₂), 7.12 и 7.08 (м и д, $J = 7.3$, 2 H, H2^{Tyr} и H6^{Tyr}), 6.61 (д, $J = 7.9$, 2 H, H3^{Tyr} и H5^{Tyr}), 5.81 (д, $J = 5.9$, 1 H, H1'), 5.49 и 4.76 (2 м, 0.17 и 0.75 H, $^{\alpha}\text{CH}^{\text{Tyr}}$), 5.47 (д, $J = 6.0$, 1 H, OH_{2'}), 5.18 (д, $J = 4.9$, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (т, $J = 5.6$, 1 H, OH_{5'}), 4.51 (м, 1H, H_{2'}), 4.13 (м, 1 H, H_{3'}), 3.94 (м, 1 H, H_{4'}), 3.65 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.55 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.12 и 2.85 м. д. (2 м, 2 H, $^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Tyr}}$).

^{13}C ЯМР: δ 172.69 (CONH₂), 155.66 (C4^{Tyr}), 154.56 (C6), 152.71 (C2), 149.55 (C4), 140.07 (C8), 129.97 (C2^{Tyr} и C6^{Tyr}), 127.90 (C1^{Tyr}), 118.54 (C5), 114.77 (C3^{Tyr} и C5^{Tyr}), 87.36 (C1'), 85.61 (C4'), 73.56 (C2'), 70.26 (C3'), 61.39 (C5'), 57.63 мини-форма и 55.36 ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Tyr}}$), 36.27 м. д. ($^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Tyr}}$).

^{15}N ЯМР: δ 241.3 (N7), 227.5 (N1), 171.6 (N9), 104.3 (NH₂), 104.0 мини-форма и 95.5 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₉H₂₁N₆O₆Cl [M+H]⁺ 465.1284, найдено 465.1261.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-триптофана (16b)



При снятии ацетатов независимо от условий (степень насыщения аммиаком, время выдерживания, температура, концентрация) образовывалась смесь амида и метилового эфира, который был выделен отдельно. Продукт выделен при помощи методики С. Продукт в виде амида получен в количестве 1.38 г (71%) с чистотой 99.73% (t_r 9.300 мин).

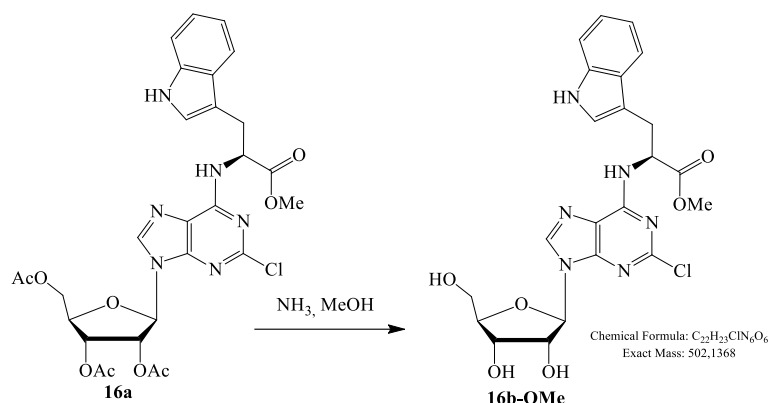
^1H ЯМР: δ 10.76 ($\text{NH}^{\text{Trp-1}}$), 8.40 и 8.39 (s и м, 1 H, H8), 8.03 (уш.д, $J = 8.0$, 0.19 H, NH мини-форма), 7.84 (д, 0.75 H, NH), 7.68 (д, $J = 7.9$, 1 H, $^4\text{CH}^{\text{Trp}}$), 7.61 (с, 0.72 H, NH_2), 7.53 (с, 0.18 H, NH_2 мини-форма), 7.30 (уш.д, $J = 8.2$, 1 H, $^7\text{CH}^{\text{Trp}}$), 7.16 (м, 2 H, NH_2 , NH_2 мини-форма и $^2\text{CH}^{\text{Trp}}$, $^2\text{CH}^{\text{Trp}}$ мини-форма), 7.04 (м, 1 H, $^6\text{CH}^{\text{Trp}}$), 6.96 (м, 1 H, $^5\text{CH}^{\text{Trp}}$), 5.81 (д, $J = 5.8$, и м, 1 H, $\text{H}_{1'}$ и $\text{H}_{1'}$ мини-форма), 5.60 (м, 0.20 H, NHCH мини-форма), 5.45 (д, $J = 5.7$, 1 H, OH_2), 5.18 и 5.15 (2 м, 1 H, OH_3), 5.02 (м, 1 H, OH_5), 4.88 (м, 0.76 H, NHCH), 4.50 (м, 1 H, H_2), 4.46 (м, 0.27 H, H_2), 4.13 (м, 1 H, H_3), 4.11 (м, 0.29 H, H_3), 3.94 (м, 1 H, H_4), 3.65 (м, 1 H, $\text{H}_{5'a}$), 3.55 (м, 1 H, $\text{H}_{5'b}$), 3.30 (м, 1.48 H, NHCHCH_2), 3.14 м. д. (м, 0.18 H, NHCHCH_2 мини-форма).

^{13}C ЯМР: δ 173.20 ($^{\alpha}\text{CH-CONH}_2$ mini), 172.97 ($^{\alpha}\text{CH-CONH}_2$), 155.38 (C6 mini), 154.54 (C6), 152.77 (C2), 151.70 (C4 mini), 149.55 (C4), 140.09 (C8), 139.72 mini (C8), 135.93 ($^7\text{CH}^{\text{Trp}}$), 127.23 ($^4\text{CH}^{\text{Trp}}$), 127.15 ($^4\text{CH}^{\text{Trp}}$ mini), 123.75 ($^2\text{CH}^{\text{Trp}}$ mini), 123.58 ($^2\text{CH}^{\text{Trp}}$), 120.76 ($^6\text{CH}^{\text{Trp}}$), 118.61 ($^5\text{CH}^{\text{Trp}}$), 118.49 (C5), 118.14 ($^4\text{CH}^{\text{Trp}}$), 111.17 ($^7\text{CH}^{\text{Trp}}$), 110.04 ($^3\text{C}^{\text{Trp}}$), 87.38 ($\text{C}_{1'}$), 87.19 ($\text{C}_{1'}$ mini), 85.61 ($\text{C}_{4'}$), 85.54 ($\text{C}_{4'}$ mini), 73.57 ($\text{C}_{2'}$), 73.43 ($\text{C}_{2'}$ mini), 70.25 ($\text{C}_{3'}$ и $\text{C}_{3'}$ mini), 61.24 ($\text{C}_{5'}$), 61.16 ($\text{C}_{5'}$ mini), 56.86 ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Trp}}$ mini), 54.43 ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Trp}}$), 27.46 м. д. ($^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Trp}}$).

^{15}N ЯМР: δ 240.95 (N7), 227.34 (N1), 221.61 (N3), 171.28 (N9), 131.06 ($\text{NH}^{\text{Trp-1}}$), 104.55 и 104.40 мини-форма (NH_2), 105.26 мини-форма и 96.77 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_5\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 488.1449, найдено 488.1459.

Метилловый эфир N-[2-хлор-9- β -D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-триптофана (16b-OMe)



При снятии ацетатов независимо от условий (степень насыщения аммиаком, время выдерживания, температура, концентрация) образовывалась смесь амида и метилового эфира, который был выделен отдельно. Продукт выделен при помощи методики С. Продукт в виде метилового эфира получен в количестве 401 мг (20%) с чистотой 99.20% (t_r 12.100 мин).

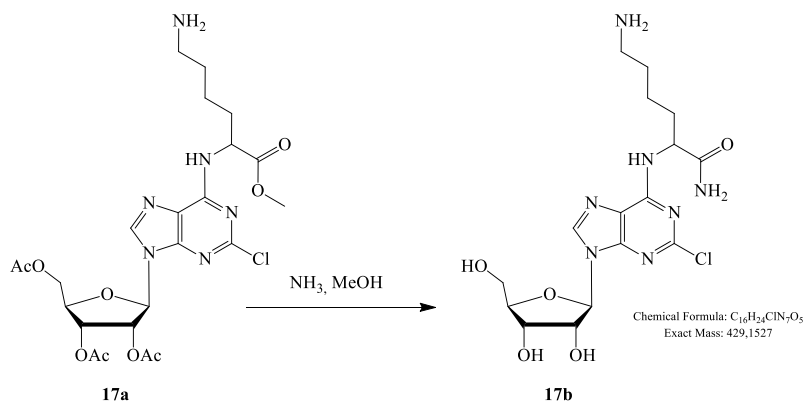
^1H ЯМР: δ 10.82 (с, 1 H, $\text{NH}^{\text{Trp-1}}$), 8.56 (д, $J = 6.9, 0.69$ H, NH), 8.46 и 8.44 (уш.д и с, 0.31 H и 0.78 H, NH и H8), 8.37 (с, 0.26 H, H8), 7.58 (м, 1 H, $^4\text{CH}^{\text{Trp}}$), 7.33 (д, $J = 8.0, ^7\text{CH}^{\text{Trp}}$), 7.23 (м, 0.29 H, $^2\text{CH}^{\text{Trp}}$), 7.21 (м, 0.73 H, $^2\text{CH}^{\text{Trp}}$), 7.07 (м, 1 H, $^6\text{CH}^{\text{Trp}}$), 7.00 (м, 1 H, $^5\text{CH}^{\text{Trp}}$), 5.83 (д, $J = 5.2, 0.73$ H, $\text{H}_{1'}$), 5.80 (м, 0.29 H, $\text{H}_{1'}$), 5.74 (м, 0.26 H, NHCH_2 мини-форма), 5.46 и 5.44 (д, $J = 5.4$, и м, 1 H, $\text{OH}_{2'}$), 5.18 и 5.15 (2 м, 1 H, $\text{OH}_{3'}$), 5.02 (м, 1 H, $\text{OH}_{5'}$), 4.94 (м, 0.71 H, NHCH_2), 4.51 (м, 0.72 H, $\text{H}_{2'}$), 4.46 (м, 0.27 H, $\text{H}_{2'}$), 4.14 (м, 0.72 H, $\text{H}_{3'}$), 4.11 (м, 0.29 H, $\text{H}_{3'}$), 3.95 и 3.93 (2 м, 1 H, $\text{H}_{4'}$), 3.67 и 3.65 (2 м, 4 H, OCH_3 и $\text{H}_{5'}$), 3.56 (м, 1 H, $\text{H}_{5'}$), 3.38 (м, 1.78 H, NHCH_2), 3.22 м. д. (м, 0.25 H, NHCH_2 мини-форма).

^{13}C ЯМР: δ 172.36 ($^{\alpha}\text{CH-COOCH}_3$ mini), 172.10 ($^{\alpha}\text{CH-COOCH}_3$), 155.46 (C6 mini), 154.52 (C6), 152.58 (C2), 151.70 (C4 mini), 149.82 (C4), 140.25 (C8), 139.94 mini (C8), 136.01 ($^7\text{CH}^{\text{Trp}}$), 126.93 ($^4\text{CH}^{\text{Trp}}$), 126.77 ($^4\text{CH}^{\text{Trp}}$ mini), 123.89 ($^2\text{CH}^{\text{Trp}}$ mini), 123.64 ($^2\text{CH}^{\text{Trp}}$), 120.89 ($^6\text{CH}^{\text{Trp}}$), 118.35 ($^5\text{CH}^{\text{Trp}}$), 118.47 (C5), 117.95 ($^4\text{CH}^{\text{Trp}}$), 117.85 ($^4\text{CH}^{\text{Trp}}$ mini), 111.35 ($^7\text{CH}^{\text{Trp}}$), 109.68 ($^3\text{C}^{\text{Trp}}$), 87.35 ($\text{C}_{1'}$), 87.14 ($\text{C}_{1'}$ mini), 85.62 ($\text{C}_{4'}$), 85.54 ($\text{C}_{4'}$ mini), 73.62 ($\text{C}_{2'}$), 73.51 ($\text{C}_{2'}$ mini), 70.24 ($\text{C}_{3'}$), 70.14 ($\text{C}_{3'}$ mini), 61.21 ($\text{C}_{5'}$), 61.12 ($\text{C}_{5'}$ mini), 56.60 ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Trp}}$ mini), 54.13 ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Trp}}$), 51.12 ($^{\alpha}\text{CH-COOCH}_3$ mini), 51.91 ($^{\alpha}\text{CH-COOCH}_3$), 27.33 ($^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Trp}}$ mini), 26.44 м. д. ($^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Trp}}$).

^{15}N ЯМР: δ 242.11 мини-форма и 240.99 (N7), 227.72 (N1), 222.05 (N3), 171.44 и 170.52 мини-форма (N9), 131.3 ($\text{NH}^{\text{Trp-1}}$), 102.70 мини-форма и 96.02 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_6\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 503.1446, найдено 503.1462.

Амид N^{α} -[2-хлор-9- β -D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-лизина (17b)



Выход 1.03 г (53%) с чистотой 98.42% (t_{R} 4.595 мин). Продукт выделен при помощи методики А. Температура плавления 139-143 °С.

^1H ЯМР: δ 8.67 и 8.50 (2 д, $J = 7.3$ и $J = 8.7, 0.69$ и 0.27 H, NH), 8.47 и 8.42 (2 с, 0.67 и 0.22 H, H8), 7.75 (уш.с, 2 H, NH_2), 5.85 (д, $J = 6.0, 1$ H, $\text{H}_{1'}$), 5.53 (д, $J = 6.1, 1$ H, $\text{OH}_{2'}$), 5.42 и 4.63 (2 м, 0.23 и 0.75 H, $^{\alpha}\text{CH-Lys}$), 5.26 (д, $J = 4.7, 1$ H, $\text{OH}_{3'}$), 5.08 (т, $J = 5.4, 1$ H, $\text{OH}_{5'}$), 4.53 (м, 1 H, $\text{H}_{2'}$), 4.15 (м, 1 H, $\text{H}_{3'}$), 3.96 (м, 1 H, $\text{H}_{4'}$), 3.65 (м, 1 H, $\text{H}_{5'a}$), 3.57 (м, 1 H, $\text{H}_{5'b}$), 2.79 (м, 2 H, $^{\epsilon}\text{CH}_2\text{-Lys}$), 1.94 и 1.88 (2 м, 2 H, $^{\beta}\text{CH}_2\text{-Lys}$), 1.58 (м, 2 H, $^{\delta}\text{CH}_2\text{-Lys}$), 1.44 м. д. (м, 2 H, $^{\gamma}\text{CH}_2\text{-Lys}$).

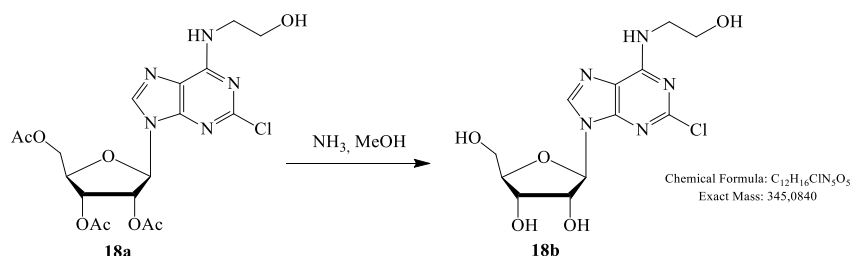
^{13}C ЯМР: δ 172.41 (CONH_2), 154.77 (C6), 152.65 (C2), 149.94 (C4), 140.15 (C8), 118.48 (C5), 87.29 ($\text{C}_{1'}$), 85.70 ($\text{C}_{4'}$), 73.72 ($\text{C}_{2'}$), 70.29 ($\text{C}_{3'}$), 61.25 ($\text{C}_{5'}$), 55.41 мини-форма и 53.06

(α CH-Lys), 51.90 (OCH₃), 38.44 (ϵ CH₂-Lys), 29.67 (β CH₂-Lys), 26.44 (δ CH₂-Lys), 22.57 м. д. (γ CH₂-Lys).

¹⁵N ЯМР: δ 241.1 (N7), 227.8 (N1), 171.4 (N9), 95.7 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₆H₂₄N₇O₅Cl [M+H]⁺ 430.1600, найдено 430.1579.

N-[2-Хлор-9- β -D-рибофуранозил-9Н-пурин-6-ил]-2-аминоэтанол (18b)



Раствор 340 мг (0.721 ммоль) нуклеозида **18a** в 5 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °С в течение 15 ч. Продукт выделен при помощи методики В. Выход 132 мг (53%) с чистотой 98.42% (t_R 4.595 мин).

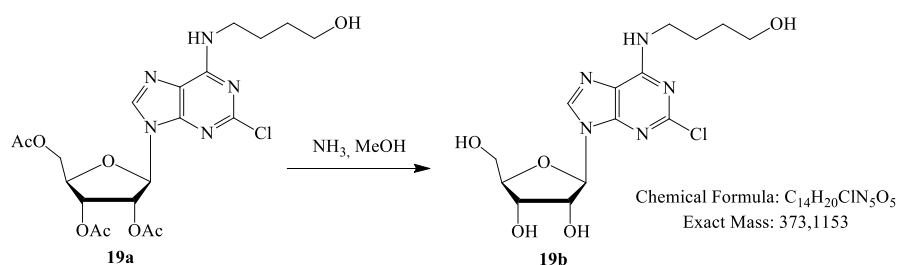
¹H ЯМР: δ 8.39 (с, 1 H, H8), 8.17 (м, 0.79 H, NH), 8.11 (м, 0.22, NH), 5.83 (м, 1 H, H_{1'}), 5.46 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.18 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.75 (м, 1 H, CH₂CH₂OH), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1.39 H, H_{4'} и CH₂CH₂OH мини-форма), 3.67 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.58 (м, 3.17 H, H_{5'b} и CH₂CH₂OH), 3.52 м. д. (м, 1.62 H, CH₂CH₂OH).

¹³C ЯМР: δ 155.12 (C6), 153.08 (C2), 149.35 (C4), 139.76 (C8), 118.52 (C5), 87.33 (C_{1'}), 85.61 (C_{4'}), 73.59 (C_{2'}), 70.26 (C_{3'}), 61.26 (C_{5'}), 60.28 (CH₂CH₂OH мини-форма), 59.16 (CH₂CH₂OH), 44.99 (CH₂CH₂OH мини-форма), 42.60 м. д. (CH₂CH₂OH).

¹⁵N ЯМР: δ 241.0 (N7), 226.6 (N1), 219.4 (N3), 171.2 (N9), 98.1 мини-форма и 90.0 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₂H₁₆N₅O₅Cl [M-H]⁻ 344,0762, найдено 344.0817.

N-[2-Хлор-9- β -D-рибофуранозил-9Н-пурин-6-ил]-4-аминобутанол-1 (19b)



Раствор 495 мг (0.991 ммоль) нуклеозида **19a** в 5 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °С в течение 15 ч. Продукт выделен при помощи методики В. Выход 321 мг (87%) с чистотой 98.70% (t_R 5.676 мин).

¹H ЯМР: δ 8.37 и 8.35 (2 м, 1.78 H, NHCH₂ и H8), 8.25 (м, 0.24 H, NHCH₂), 5.83 (уш.д, 1 H, H_{1'}), 5.45 (уш.д, OH_{2'}), 5.18 (д, J = 4.6, OH_{3'}), 5.04 (уш.т, OH_{5'}), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.37 (т, J = 5.0, 1 H, CH₂OH), 4.13 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.87 (м, 0.44 H, NHCH₂ мини-

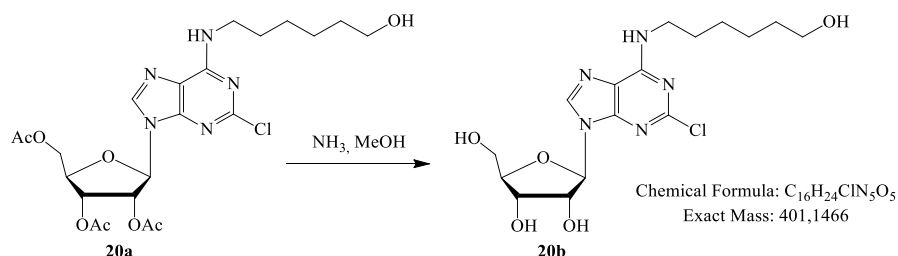
форма), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.56 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.43 (м, 3.55 H, NHCH₂ и CH₂OH), 1.62 (м, 2 H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH), 1.47 м. д. (м, 2 H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH).

¹³C ЯМР: δ 155.48 (C6 мини-форма), 154.99 (C6), 153.14 (C2), 152.69 (C2 мини-форма), 149.29 (C4), 139.61 (C8), 139.52 (C8 мини-форма), 118.42 (C5), 117.25 (C5 мини-форма), 87.31 (C1'), 87.11 (C1' мини-форма), 85.62 (C4'), 73.56 (C2'), 70.28 (C3'), 61.28 (C5'), 60.36 (NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH), 42.22 (NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH мини-форма), 40.10 (NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH, данные HSQC), 29.75 (NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH), 29.55 (NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH мини-форма), 26.54 (NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH мини-форма), 25.35 м. д. (NHCH₂CH₂CH₂CH₂OH).

¹⁵N ЯМР: δ 240.93 (N7), 226.13 (N1), 171.05 (N9), 102.66 (NH мини-форма) и 95.82 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₄H₂₀N₅O₅Cl [M-H]⁻ 372.1075, найдено 372.1167.

N-[2-Хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-6-аминогексанол-1 (20b)



Раствор 206 мг (0.390 ммоль) нуклеозида **20a** в 5 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °C в течение 48 ч. Продукт выделен при помощи методики С. Выход 121 мг (79%) с чистотой 97.50% (t_R 8.720 мин). Масс-спектр, m/z: [M-H]⁻ =400.1351, расч. 401.1515.

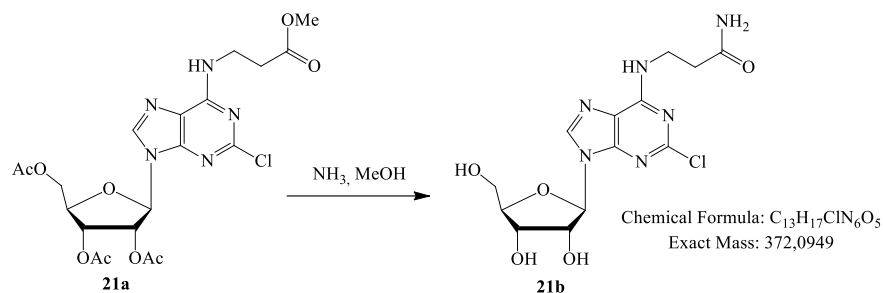
¹H ЯМР: δ 8.37 (м, 1 H, H₈), 8.34 и 8.24 (2 м, 0.78 H и 0.22 H, NH), 5.83 (д, J = 5.6, 1 H, H_{1'}), 5.45 (д, J = 6.0, 1 H, OH_{2'}), 5.18 (д, J = 4.8, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (т, J = 5.6 1 H, OH_{5'}), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.30 (т, J = 5.0, 1 H, OHCH₂), 4.13 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.85 (м, 0.42 H, CH₂NH), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.56 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.42 (м, 1.48 H, CH₂NH), 3.38 (м, 2 H, OHCH₂), 1.59 (м, 2 H, CH₂CH₂NH), 1.42 (м, 2 H, OHCH₂CH₂), 1.32 м. д. (м, 4 H, OHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH).

¹³C ЯМР: δ 154.96 (C6), 153.13 (C2), 149.28 (C4), 139.59 (C8), 118.40 (C5), 87.29 (C1'), 85.60 (C4'), 73.55 (C2'), 70.26 (C3'), 61.27 (C5'), 60.54 (OHCH₂), 39.94 (CH₂NH мини-форма, HSQC данные), 37.30 (CH₂NH, HSQC данные), 32.37 (OHCH₂CH₂), 28.64 (CH₂CH₂NH), 26.12 и 25.10 м. д. (OHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH).

¹⁵N ЯМР: δ 226.29 (N1), 241.45 (N7), 171.03 (N9), 102.68 мини-форма и 95.77 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₆H₂₄N₅O₅Cl [M+H]⁺ 400.1388, найдено 400.1351.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-β-аланина (21b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.62 г (96%) с чистотой 98.88% (t_R 11.622 мин). Температура плавления 140-144 °С.

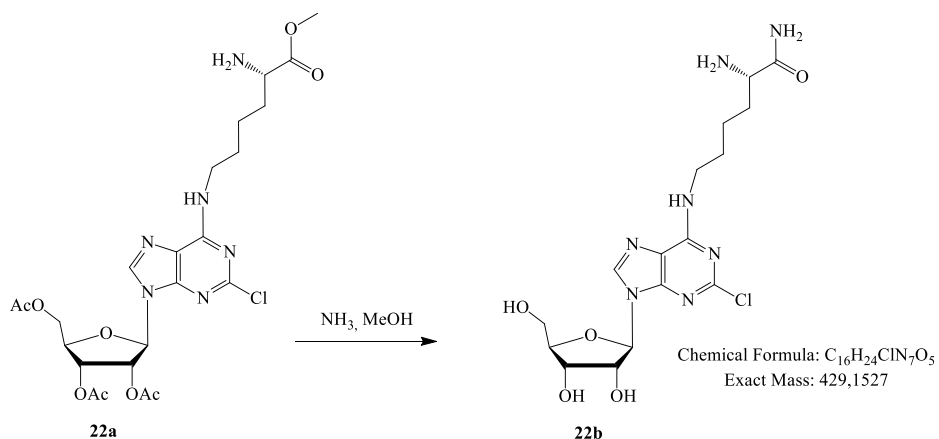
¹H ЯМР: δ 8.42 и 8.39 (сигн и с, 1 H, H₈), 8.22 и 8.13 (2 м, 0.75 и 0.20 H, NH), 7.35, 7.30, и 6.85 (3 сигн, 0.72, 0.21, и 0.93 H, NH₂), 5.83 (д, $J = 3.9$, 1 H, H_{1'}), 5.46 (д, $J = 5.5$, 1 H, OH_{2'}), 5.18 (д, $J = 3.7$, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.13 (м, 1 H, H_{3'}), 4.04 и 3.63 (2 м, 0.32 и 1.43 H, NHCH₂), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.67 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.56 (м, 1 H, H_{5'b}), 2.44 м. д. (м, 2 H, NHCH₂CH₂).

¹³C ЯМР: δ 172.53 (CONH₂), 154.91 (C₆), 152.89 (C₂), 149.42 (C₄), 139.61 (C₈), 118.60 (C₅), 87.06 (C_{1'}), 85.36 (C_{4'}), 73.32 (C_{2'}), 70.00 (C_{3'}), 61.00 (C_{5'}), 38.90 мини-форма и 36.35 (NHCH₂), 33.97 и 35.25 м. д. (NHCH₂CH₂).

¹⁵N ЯМР: δ 241.0 (N₇), 226.7 (N₁), 171.1 (N₉), 109.1 (NH₂), 100.0 мини-форма и 92.9 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₃H₁₇N₆O₅Cl [M+H]⁺ 373.1028, найдено 373.1024.

Амид N^ε-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-лизина (22b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.52 г (89%) с чистотой 98.23% (t_R 8.323 мин). Температура плавления 141-144 °С.

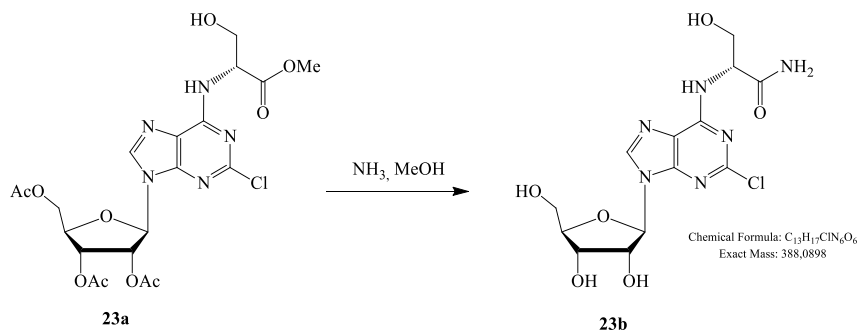
¹H ЯМР: δ 8.43 и 8.41 (2 сигн, 0.50 H, H₈), 8.36 (м, 0.91 H, H₈ и NH), 8.25 и 7.96 (м, 0.15 и 0.38 H, NH), 8.06 7.44, 7.38, 7.07, и 7.02 (с, 2 H, CONH₂), 5.83 (м, 1 H, H_{1'}), 5.46 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.18 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.57 и 4.52 (2 м, 1.41 H, ^αCH^{Lys} и H_{2'}), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.56 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.41 (м, 1 H, ^εCH^{Lys}), 1.86 (м, 1 H, ^βCH₂^{Lys}), 1.76 1.61 (м, 2 H, ^δCH₂^{Lys}), 1.45 и 1.38 м. д. (2 м, 1 H, ^γCH₂^{Lys}).

^{13}C ЯМР: δ 139.85 (C8), 87.16 (C_{1'}), 85.58 (C_{4'}), 73.37 (C_{2'}), 70.34 (C_{3'}), 61.02 (C_{5'}), 53.57 ($^{\epsilon}\text{CH}^{\text{Lys}}$), 39.19 ($^{\alpha}\text{CH}^{\text{Lys}}$), 31.17 ($^{\delta}\text{CH}_2^{\text{Lys}}$), 28.23 ($^{\beta}\text{CH}_2^{\text{Lys}}$), 22.56 м. д. ($^{\gamma}\text{CH}_2^{\text{Lys}}$).

^{15}N ЯМР: δ 104.5 (CONH₂), 95.2 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₆H₂₄N₇O₅Cl [M+H]⁺ 430.1600, найдено 430.1584.

Амид N $^{\epsilon}$ -[2-хлор-9- β -D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-D-серина (23b)



Продукт выделен при помощи методики А. Выход 1.58 г (90%) с чистотой 98.98% (t_{R} 8.602). Температура плавления 168-170 °С.

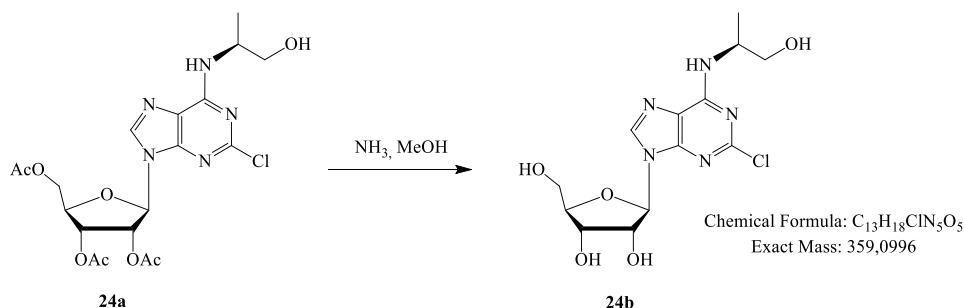
^1H ЯМР: δ 8.46 и 8.43 (2 сигн, 0.85 и 0.16 Н, Н8), 7.69 и 7.61 (м, 0.14 и 0.56 Н, NH), 7.49, 7.45, 7.18, и 7.14 (4 с, 0.78, 0.20, 0.81, и 0.18 Н, NH₂), 5.85 (д, $J = 5.9$, 1 Н, Н_{1'}), 5.47 (д, $J = 6.0$, 1 Н, OH_{2'}), 5.37 и 4.63 (2 м, 0.15 и 0.78 Н, $^{\alpha}\text{CH}$ -Ser), 5.19 (д, $J = 4.7$, 1 Н, OH_{3'}), 5.03 (м, 2 Н, CH₂OH и OH_{5'}), 4.93 (м, 0.12 Н CH₂OH), 4.54 (м, 1 Н, Н_{2'}), 4.14 (м, 1 Н, Н_{3'}), 3.96 (м, 1 Н, Н_{4'}), 3.81 (м, 2 Н, $^{\beta}\text{CH}_2$ -Ser), 3.67 (м, 1 Н, Н_{5'a}), 3.56 м. д. (м, 1 Н, Н_{5'b}).

^{13}C ЯМР: δ 171.04 (CONH₂), 154.40 (C6), 149.44 (C4), 140.04 (C8), 118.54 (C5), 87.10 (C_{1'}), 85.44 (C_{4'}), 73.25 (C_{2'}), 69.99 (C_{3'}), 60.94 (C_{5'}), 61.23 ($^{\beta}\text{CH}_2$ -Ser). 58.14 мини-форма и 55.76 м. д. ($^{\alpha}\text{CH}$ -Ser).

^{15}N ЯМР: δ 240.5 (N7), 227.4 (N1), 171.3 (N9), 104.6 (NH₂), 99.6 мини-форма и 91.5 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₃H₁₇N₆O₆Cl [M+H]⁺ 389.0971, найдено 389.0952.

(S)-2-[(2-хлор-9- β -D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил)амино]пропан-1-ол (24b)



Раствор 1.36 г (2.8 ммоль) нуклеозида **24a** в 10 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °С в течение 48 ч. Продукт выделен при помощи методики В. Выход 626 мг (62%) с чистотой 99.14% (t_{R} 6.521 мин).

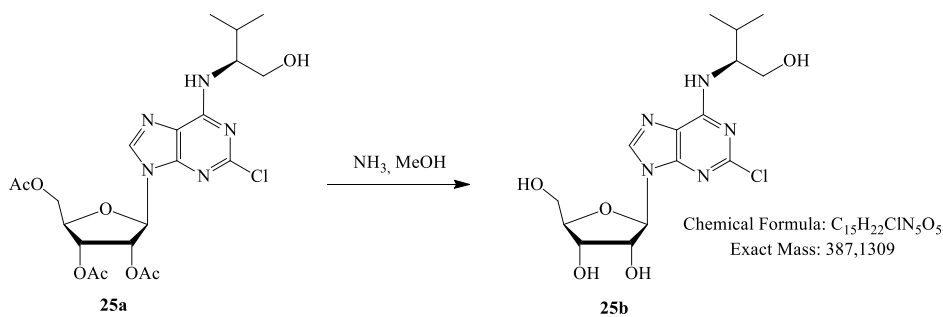
^1H ЯМР: δ 8.38 (с, 1 H, H8), 7.94 (д, $J = 8.1$, 1 H, NH), 5.83 (уш. д, $J > 4.2$, 1 H, H_{1'}), 5.47 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.20 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.07 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.93 и 4.28 (2 м, 0.20 и 0.66 H, NHCH) 4.78 (м, 1 H, NHCHCH₂OH), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.13 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.56 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.51 и ~3.42 (перекрыт сигналом H₂O) (2 м, 2 H, NHCHCH₂), 1.24 и 1.17 м. д. (м и д, $J = 5.9$, 3 H, CHCH₃).

^{13}C ЯМР: δ 154.74 (C6), 153.15 (C2), 149.45 (C4), 139.70 (C8), 118.49 (C5), 87.41 (C_{1'}), 85.66 (C_{4'}), 73.64 (C_{2'}), 70.32 (C_{3'}), 63.99 мини-форма и 64.52 (NHCHCH₂), 61.32 (C_{5'}), 50.00 (NHCH мини-форма), 47.84 (NHCH), 16.81 м. д. (CHCH₃).

^{15}N ЯМР: δ 240.9 (N7), 225.9 (N1), 171.0 (N9), 111.7 и 104.3 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₃H₁₈N₅O₅Cl [M+H]⁺ 360.1075, найдено 360.1084.

(S)-2-[(2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил)амино]-3-метилбутан-1-ол
(25b)



Раствор 345 мг (0.89 ммоль) нуклеозида **25a** в 10 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °C в течение 48 ч. Продукт выделен при помощи методики В. Выход 128 мг (49%) с чистотой 99.01% (t_R 8.450 мин).

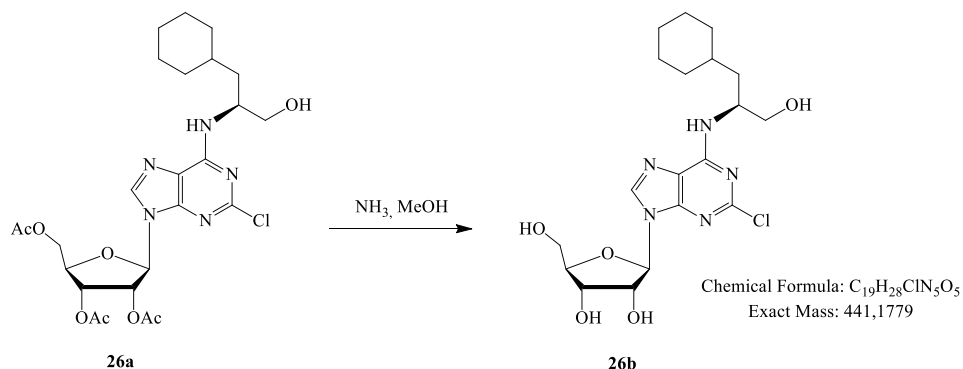
^1H ЯМР: δ 8.39 и 8.37 (2 м, 0.67 H и 0.33 H, H8), 7.91 и 7.83 (2 м, 0.32 H и 0.68 H, NH), 5.83 (д, $J = 6.0$, 1 H, H_{1'}), 5.47 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.19 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.05 (т, $J = 5.6$, 1 H, OH_{5'}), 4.85 (м, 0.30 H, NHCH мини-форма), 4.59 (м, 1 H, NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH), 4.54 (м, 1 H, H_{2'}), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 4.09 (м, 0.70 H, NHCH), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.57 (м, 2.77 H, NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH), H_{5'b}), 3.51 (м, 0.30 H, NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH мини-форма), 1.96 (м, 1 H, NHCH(CH(CH₃)₂)), 0.91 м. д. (м, 6 H, NHCH(CH(CH₃)₂)).

^{13}C ЯМР: δ 156.02 (C6), 155.57 (C6 мини-форма), 152.98 (C2), 152.59 (C2 мини-форма), 151.65 (C4 мини-форма), 149.4 (C4), 139.61 (C8), 138.99 (C8 mini form), 118.40 (C5), 117.15 (C5 mini form), 87.38 (C_{1'}), 87.13 (C_{1'} mini form), 85.65 (C_{4'}), 73.50 (C_{2'}), 73.41 (C_{2'} mini form), 70.33 (C_{3'}), 61.55 (NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH мини-форма), 61.31 (C_{5'}), 61.06 (NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH), 59.15 (NHCH мини-форма), 57.27 (NHCH), 29.14 (mini form NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH), 28.80 (NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH), 19.44 и 18.77 (NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH), 19.06 и 18.29 м. д. (мини-форма NHCH(CH(CH₃)₂)CH₂OH).

^{15}N ЯМР: δ 244.94 мини-форма и 241.29 (N7), 226.48 (N1), 218.68 (N3), 171.10 и 169.82 мини-форма (N9), 108.43 мини-форма и 100.24 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₅H₂₂N₅O₅Cl [M-H]⁻ 386.1231, найдено 386.1192.

(S)-3-циклогексил-2-[(2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил)амино]пропан-1-ол (26b)



Раствор 275 мг (0.456 ммоль) нуклеозида **26a** в 10 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °С в течение 48 ч. Продукт выделен при помощи методики С. Выход 180 мг (82%) с чистотой 99.21% (t_R 8.720 мин).

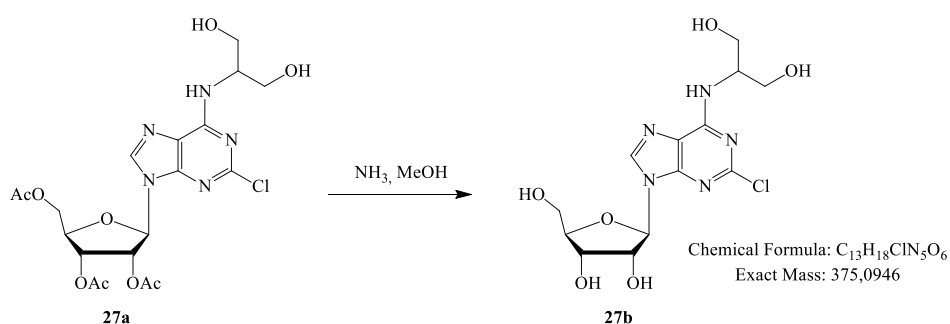
¹H ЯМР: δ 8.38 (с, 1 H, H8), 7.89 и 7.86 (2 м, 1 H, NH), 5.83 (м, 1 H, H1'), 5.45 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.18 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.06 (м, 0.25 H, CH), 5.04 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.70 и 4.65 (м, 0.75 H и 0.25 H, CHCH₂OH), 4.54 (м, 1 H, H_{2'}), 4.35 (м, 0.75 H, CH), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.66 и 3.56 (2 м, 1 H и 1 H, H_{5'a} и H_{5'b}), 3.49 и 3.48 (2м, 2 H, CHCH₂OH), 1.91-0.85 м. д. (м, 13.71 H, CH₂-cyclohexane).

¹³C ЯМР: δ 155.14 (C6), 153.05 (C2), 152.61 (C2 мини-форма), 151.61 (C4 мини-форма), 149.38 (C4), 139.57 (C8), 118.30 (C5), 117.09 (C5 мини-форма), 87.35 (C1'), 85.63 (C4'), 73.49 (C2'), 70.30 (C3'), 63.43 (CHCH₂OH), 61.29 (C5'), 51.64 (CHCH₂OH мини-форма), 49.54 (CHCH₂OH), 38.26 (CH₂), 33.66, 33.52, 32.05, 26.01, 25.71, 25.52 м. д. (cyclohexane).

¹⁵N ЯМР: δ 244.29 (N7 мини-форма), 241.40 (N7), 226.06 (N1), 218.81 (N3), 171.16 (N9), 110.41 (NH мини-форма), 102.65 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₉H₂₈N₅O₅Cl [M-H]⁻ 442.1857, найдено 442.1876.

2-[(2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил)амино]пропан-1,3-диол (27b)



Раствор 303 мг (0.60 ммоль) нуклеозида **27b** в 10 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °С в течение 48 ч. Продукт выделен при помощи методики С. Выход 213 мг (93.8%) с чистотой 99.0% (t_R 4.500 мин).

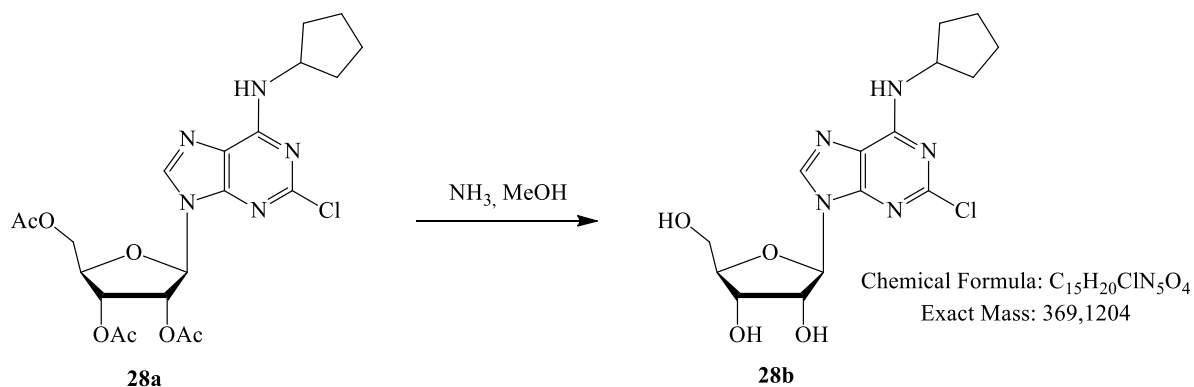
^1H ЯМР: δ 8.40 (с, 1 H, H8), 7.73 и 7.65 (2 м, 0.21 H и 0.80 H, NH), 5.83 (д, $J = 5.79$, 1 H, H_{1'}), 5.47 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.19 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.05 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.93 (м, 0.20 H, NHCH), 4.73 и 4.66 (2 м, 1.55 H и 0.45 H, OH-Ser), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.24 (м, 0.80 H, NHCH), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.67 (м, 1 H, H_{5'}), 3.57 м. д. (м, 5.35 H, H_{5'}, NHCH(CH₂)₂).

^{13}C ЯМР: δ 155.61 (C6 мини-форма), 155.12 (C6), 153.03 (C2), 152.60 (C2 мини-форма), 149.42 (C4), 139.79 (C8), 139.37 (C8 мини-форма), 118.56 (C5), 117.26 (C5 мини-форма), 87.37 (C_{1'}), 87.17 (C_{1'} мини-форма), 85.62 (C_{4'}), 73.60 (C_{2'}), 70.26 (C_{3'}), 61.26 (C_{5'}), 60.00 (NHCH(CH₂)₂), 56.13 (NHCH мини-форма, HSQC данные), 54.08 м. д. (NHCH).

^{15}N ЯМР: δ HSQC, HMBC 244.16 мини-форма и 240.89 (N7), 226.46 (N1), 219.82 (N3), 171.32 и 169.55 мини-форма (N9), 104.78 мини-форма и 96.35 м. д. (NH).

HRMS (ESI): вычислено для C₁₃H₁₈N₅O₆Cl [M-H]⁻ 374.0867, найдено 374.0934.

2-хлор-N⁶-циклопентил-аденозин, ССРА (28b)



Продукт получен по улучшенной методике из [221]. Раствор 707 мг (1.43 ммоль) нуклеозида **28a** в 10 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °C в течение 48 ч. Продукт выделен при помощи методики А. Выход 480 мг (93.8%) с чистотой 99.0% (t_R 4.500 мин). Масс-спектр, m/z: [M - H]⁻ = 368.1081, расч. 369.1212.

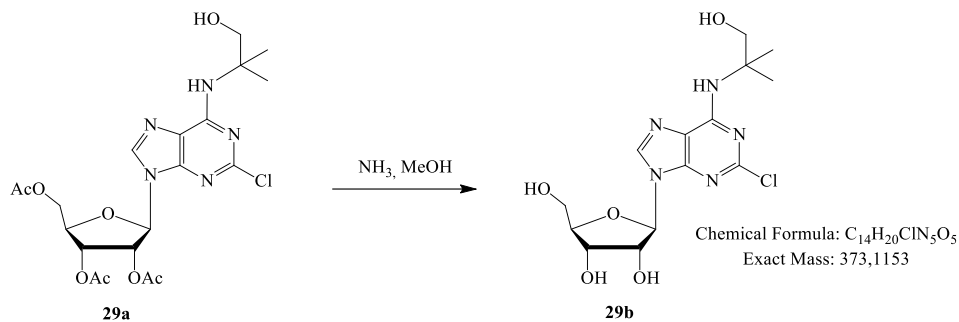
^1H ЯМР: δ 8.38 (м, 1 H, H8), 8.31 (м, 1 H, NH), 5.83 (д, $J = 5.6$, 1 H, H_{1'}), 5.45 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.18 (д, $J = 4.9$, 1 H, OH_{3'}), 5.04 (м, 1 H и 0.27 H, 1 H, OH_{5'} CH-1 циклопентан мини-форма), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.44 (м, 0.67 H, CH-1 циклопентан), 4.13 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.67 (м, 1 H, H_{5'}^a), 3.56 (м, 1 H, H_{5'}^b), 1.98 и 1.94 (м, 2 H, CH-2^a и CH-5^a cyclopentane + его мини-форма), 1.72 (м, 2 H, CH-2^b и CH-5^b циклопентан мини-форма и CH-3^b и CH-4^b циклопентан), 1.61 и 1.56 (4 м, 2 H, CH-2^a и CH-5^a циклопентан + его мини-форма и CH-2^b и CH-5^b циклопентан мини-форма и CH-3^b и CH-4^b циклопентан).

^{13}C ЯМР: δ 154.58 (C6), 154.58 (C2), 151.71 (C4 мини-форма), 149.37 (C4), 139.53 (C8), 118.42 (C5), 87.30 (C_{1'}), 85.59 (C_{4'}), 73.58 (C_{2'}), 70.26 (C_{3'}), 61.26 (C_{5'}), 53.87 (CH-1 циклопентан мини-форма), 51.64 (CH-1 циклопентан), 32.86 (CH-2 и CH-5 циклопентан мини-форма), 31.67 и 31.64 (CH-2 и CH-5 циклопентан), 23.36 и 23.25 (CH-3 и CH-4 циклопентан).

^{15}N ЯМР: δ 244.02 мини-форма и 241.52 (N7), 227,18 (N1), 171.02 (N9), 115.06 мини-форма и 107.09 (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4\text{Cl}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 368.1126, найдено 368.1081.

**2-[(2-хлор-9- β -D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил)амино]-2-метилпропан-1-ол
(29b)**



Раствор 440 мг (0.881 ммоль) нуклеозида **29a** в 8 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °С в течение 15 ч. Продукт выделен при помощи методики В. Выход 264 мг (83.8%) с чистотой 98.90% (t_{R} 4.500 мин).

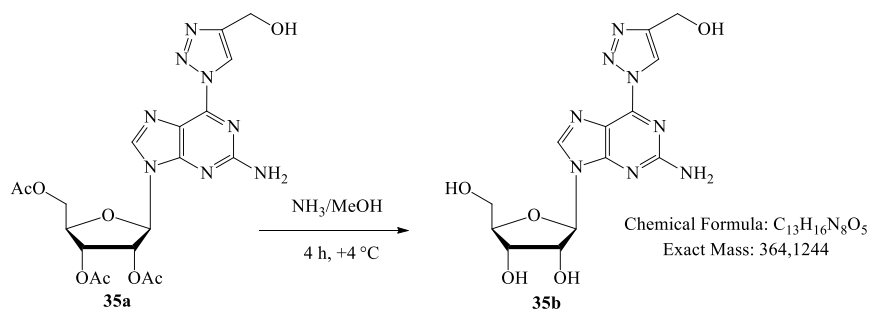
^1H ЯМР: δ 8.39 (с, 1 H, N8), 7.06 (уш.с, 1 H, NH), 5.83 (д, $J = 5.8$, 1 H, H $_1'$), 5.45 (д, $J = 6.1$, 1 H, OH $_2'$), 5.17 (д, $J = 4.6$, 1 H, OH $_3'$), 5.08 (т, $J = 5.7$, 1 H, AIB-OH), 5.03 (т, $J = 5.7$, 1 H, OH $_5'$), 4.51 (м, 1 H, H $_2'$), 4.13 (м, 1 H, H $_3'$), 3.94 (м, 1 H, H $_4'$), 3.66 (ддд, $J = 12.1, 4.5, 4.2$, 1 H, H $_5'a$), 3.56 (д, $J = 5.7$, 2 H, AIB-CH $_2$), 3.55 (ддд, $J = 12.1, 4.0, 2.1$, 1 H, H $_5'b$), 1.42 (с, 6 H, Me).

^{13}C ЯМР: δ 154.78 (C2), 152.15 (C6), 149.70 (C4), 139.74 (C8), 119.29 (C5), 87.34 (C $_1'$), 85.60 (C $_4'$), 73.56 (C $_2'$), 70.23 (C $_3'$), 67.57 (CH $_2$ -AIB), 61.24 (C $_5'$), 55.73 (C-CH $_3$), 23.19 (2 CH $_3$).

^{15}N ЯМР: δ 240.5 (N7), 171.33 (N9), 106.03 (NH).

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 374.1232, найдено 374.1220.

2-амино-9- β -D-рибофуранозил-6-[4-(3-гидроксиметил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил]-9H-пурин (35b)



Раствор 81 мг соединения **35a** растворяли в 5 мл метанола, насыщенного аммиаком, и выдерживали в течение 4 часов при температуре 4 °С. Продукт выделен при помощи методики В. Выход 52 мг (87%) с чистотой по ВЭЖХ 93.6% (t_{R} 4.739).

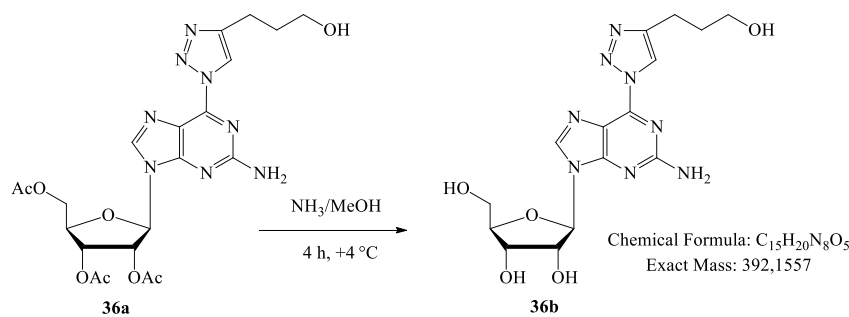
^1H ЯМР: δ 8.98 (с, 1 H, H5-triazole), 8.51 (с, 1 H, H8), 7.03 (уш.с, 1.92 H, NH₂), 5.91 (д, $J = 5.7$, 1 H, H_{1'}), 5.49 (м, 0.87 H, OH_{2'}), 5.40 (м, 0.94 H, CH₂OH), 5.18 (м, 0.92 H, OH_{3'}), 5.05 (м, 0.95 H, OH_{5'}), 4.68 (м, 2 H, CH₂OH), 4.55 (м, 1 H, H_{2'}), 4.17 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.68 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.58 м. д. (м, 1 H, H_{5'b}).

^{13}C ЯМР: δ 159.88 (C2), 156.34 (C4), 148.76 (C4-triazole), 144.62 (C6), 141.76 (C8), 122.65 (C5-triazole), 115.48 (C5), 86.56 (C_{1'}), 85.32 (C_{4'}), 73.47 (C_{2'}), 70.17 (C_{3'}), 61.14 (C_{5'}), 54.81 м. д. (CH₂OH).

^{15}N ЯМР: δ 358.65 (N3-triazole), 253.62 (N1 or N2-triazole), 240.59 (N7), 213.89 и 202.32 (N1 и N3), 167.96 (N9), 84.75 м. д. (NH₂).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₃H₁₆N₈O₅ [M+H]⁺ 363.1165, найдено 363.1293.

2-амино-9-β-D-рибофуранозил-6-[4-(3-гидроксипропил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил]-9H-пурин (36b)



Раствор 41 мг соединения **36a** растворяли в 5 мл метанола, насыщенного аммиаком, и выдерживали в течение 4 часов при температуре 4 °С. Продукт выделен при помощи методики В. Выход 30 мг (96.7%) с чистотой по ВЭЖХ 95.0% (tr 5.785).

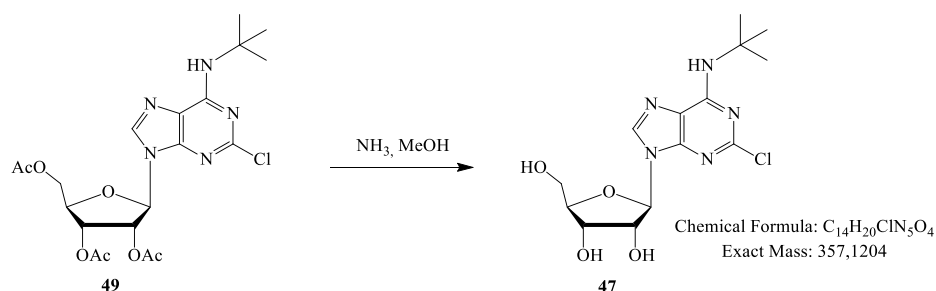
^1H ЯМР: δ 8.84 (с, 1 H, H5-triazole), 8.49 (с, 1 H, H8), 7.00 (с, 2 H, NH₂), 5.91 (д, $J = 5.75$, 1 H, H_{1'}), 5.53 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.22 (м, 1 H, OH_{3'}), 5.06 (уш.т, $J \sim 5.2$, OH_{5'}), 4.53 (м, 2 H, CH₂OH и H_{2'}), 4.17 (м, 1 H, H_{3'}), 3.94 (м, 1 H, H_{4'}), 3.67 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.58 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.49 (м, 2 H, CH₂CH₂CH₂OH), 2.82 (т, $J = 7.6$, 2 H, CH₂CH₂CH₂OH), 1.85 м. д. (м, 2 H, CH₂CH₂CH₂OH).

^{13}C ЯМР: 159.86 (C2), 156.29 (C4), 147.42 (C4-triazole), 144.70 (C6), 141.66 (C8), 121.76 (C5-triazole), 115.50 (C5), 86.56 (C_{1'}), 85.27 (C_{4'}), 73.49 (C_{2'}), 70.13 (C_{3'}), 61.11 (C_{5'}), 59.78 (CH₂OH), 31.88 (CH₂CH₂OH), 21.31 (CH₂CH₂CH₂OH).

^{15}N ЯМР: 360.9 (N3-triazole), 253.3 (N1 or N2-triazole), 240.9 (N7), 213.7 и 202.2 (N1 и N3), 168.0 (N9), 84.6 (NH₂).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₅H₂₀N₈O₅ [M+H]⁺ 393.1635, найдено 393.1644.

N⁶-трет-Бутил-2-хлор-аденозин (47)



К раствору 24 мг (0.066 ммоль) нуклеозида **49** в 5 мл метанола, насыщенного аммиаком, выдерживали при 4 °С в течение 24 ч. Ход реакции контролировали методом ТСХ на силикагеле (хлороформ–метанол, 10:1). Продукт выделен при помощи методики С. Выход 15 мг (86.5%) с чистотой 98.80% (t_R 11.014 мин).

¹H ЯМР: δ 8.39 (с, 1 H, H8), 7.46 (уш.с, 0.87 H, NH), 5.83 (д, $J = 5.9$, 1 H, H_{1'}), 5.46 (м, 1 H, OH_{1'}), 5.19 (м, 1 H, OH_{2'}), 5.04 (т, $J = 5.6$, 1 H, OH_{5'}), 4.52 (м, 1 H, H_{2'}), 4.14 (м, 1 H, H_{3'}), 3.95 (м, 1 H, H_{4'}), 3.66 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.57 (м, 1 H, H_{5'b}), 1.50 м. д. (с, 9 H, CH₃).

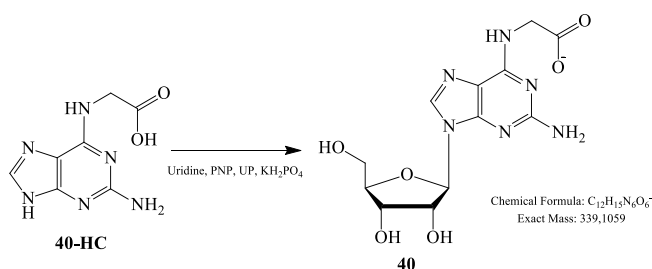
¹³C ЯМР: δ 154.67 (C6), 152.16 (C2), 149.23 (C4), 139.54 (C8), 118.86 (C5), 87.31 (C_{1'}), 85.60 (C_{4'}), 73.55 (C_{2'}), 70.25 (C_{3'}), 61.26 (C_{5'}), 52.02 (NHCH), 28.52 м. д. (CH₃).

¹⁵N ЯМР: δ 241.1 (N7), 218.9 (N3), 170.9 (N9), 113.4 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₄H₂₀N₅O₄Cl [M–H][–] 356.1125, найдено 356.1120.

3.5. Ферментативный синтез рибозидов при помощи реакции трансгликозилирования

Триэтиламонийная соль N-(2-амино-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил)глицина (**40**)



Растворили 100 мг N-(2-амино-9H-пурин-6-ил)глицина (0.481 ммоль) в 480 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0). Добавляли 703.3 мг уридина (2.879 ммоль) и рН реакционной смеси довели до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 144 мкл PNP (201 ед. акт.) и 72 мкл UP (122 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 99% в течение 3 часов.

Реакционную смесь очищали при помощи ионообменной хроматографии с использованием ионообменной смолы DEAE 650С, объем колонки – 60 мл, градиент H₂O–TEAB 0–0.1 М, фракции упаривали на роторном испарителе, растворяли в 8.5 мл

дистиllированной воды и проводили двойную перекристаллизацию в воде. Продукт был получен в виде триэтиламмонийной соли в количестве 45.98 мг с выходом 22% и чистотой 99.40% (t_R 4.590).

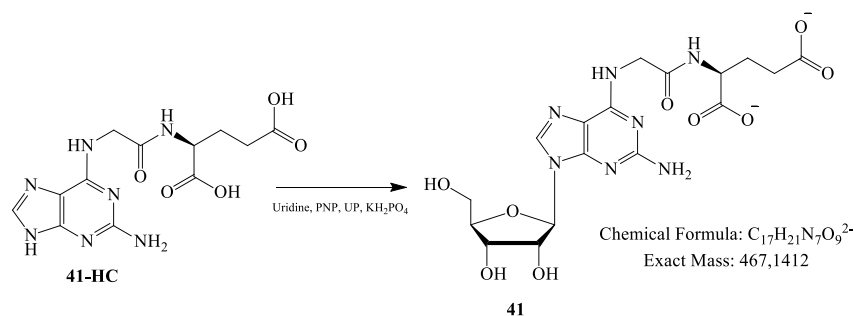
1H ЯМР: δ 7.95 (с, 1 H, H8), 7.40 (м, 0.88 H, NH), 5.83 (м, 2 H, NH₂), 5.74 (д, $J = 6.2$, 1 H, H1'), 4.51 (м, 1 H, H2'), 4.11 и 4.07 (м, 2.69 H, H3' и NHCH₂COOH), 3.91 (м, 1 H, H4'), 3.65 и 3.54 (2м, 1 H, 1 H, H5'a, H5'b), 3.06 (q, 0.24 H, CH₂ TEA), 1.17 м. д. (т, 0.28 H, CH₃ TEA).

^{13}C ЯМР: δ 171.83 (NHCH₂COOH), 159.74 (C6), 154.64 (C2), 136.19 (C8), 113.75 (C5), 86.92 (C1'), 85.37 (C4'), 73.19 (C2'), 70.57 (C3'), 61.61 (C5'), 45.58 (CH₃ TEA), 41.26 (NHCH₂COOH), 8.61 м. д. (CH₂ TEA).

^{15}N ЯМР: δ 240.64 (N7), 196.15 и 178.68 (N1, N3), 166.4 (N9), 78.8 (NH₂), 77.78 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₂H₁₅N₆O₆ [M+2H]⁺ 341.1215, найдено 341.2010.

Триэтиламмонийная соль N-[N-(2-амино-9-(β-D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил)глицил]-L-глутаминовой кислоты (41)



Растворяли 50 мг N-[N-(2-амино-9H-пурин-6-ил)глицил]-L-глутаминовой кислоты (0.148 ммоль) в 144 мл 4 mM калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 217.2 мг уридина (0.889 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 44 мкл PNP (62 ед. акт.) и 22 мкл UP (38 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °C. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 98% в течение 3 часов.

Реакционную смесь очищали при помощи ионообменной хроматографии с использованием ионообменной смолы DEAE 650C, объем колонки – 20 мл, градиент H₂O–TEAB 0–0.1 M. Целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на колонке объемом 45 мл на обращенной фазе C18 в градиенте 0% – 50% EtOH в воде. Выход 19 мг (19%) с чистотой 97.90% (t_R 3.150).

1H ЯМР: δ 7.95 (с, 1 H, H8), 7.80 (м, 0.8 H, NH-Glu), 7.51 (м, 0.55 H, NH-Gly), 5.85 (с, 1.56 H, NH₂), 5.74 (д, $J = 6.16$, 1 H, H1'), 5.37 (м, 1.62 H, OH_{2'} и OH_{3'}), 5.07 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.52 (м, 1 H, H2'), 4.11, 4.08 и 4.00 (м, 4.18 H, H3', CH-Glu и CH₂-Gly), 3.91 (м, 1.12 H, H4'), 3.65 и 3.54 (2 м, 1.31 H и 1.65 H, H5'a и H5'b), 2.67 (м, 6.96 H, CH₂-TEA), 2.26 и 2.19 (2 м, 1

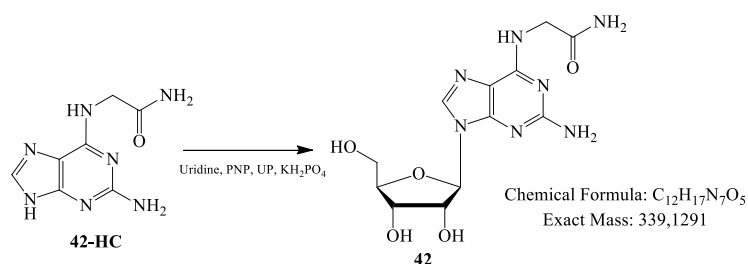
H и 1 H, $\text{CH}_2\text{COOH-Glu}$), 1.89 и 1.71 (2м, 1 H и 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH-Glu}$), 1.02 м. д. (т, $J = 7.15, 10.75$ H, $\text{CH}_3\text{-TEA}$).

^{13}C ЯМР: δ 174.15 ($\gamma\text{-CO-Glu}$), 172.97 ($\alpha\text{-CO-Glu}$), 168.53 (CO-Gly), 159.79 (C6), 154.62 (C2), 150.96 (C4), 136.19 (C8), 113.70 (C5), 86.92 (C1'), 85.34 (C4'), 73.14 (C2'), 70.55 (C3'), 61.57 (C5'), 52.01 (CH-Glu), 45.52 ($\text{CH}_2\text{-TEA}$), 31.57 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH-Glu}$), 27.87 ($\text{CH}_2\text{CH-Glu}$), 10.40 м. д. ($\text{CH}_3\text{-TEA}$).

^{15}N ЯМР: δ 240.65 (N7), 166.40 (N9), 118.98 (NH), 118.53 (NH мини-форма).

HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_6$ $[\text{M}+3\text{H}]^+$ 470.1, найдено 470.2.

Амид N-(2-амино-9-(β -D-рибофуранозил)-9H-пурин-6-ил)-глицина (42)



Растворили 100 мг амида N-(2-амино-9H-пурин-6-ил)глицина (0.483 ммоль) в 120 мл 8 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 234.0 мг уридина (0.959 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 240 мкл PNP (336 ед. акт.) и 240 мкл UP (408 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 99% в течение 2 часов.

Смесь концентрировали на ротормном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на сорбенте с обращенной фазой C18 (колонка 50 мл, градиент этанола в воде 0–30%). Выход 81.0 мг (49%) с чистотой 99.70% (t_R 6.257 в изократическом режиме 2% В).

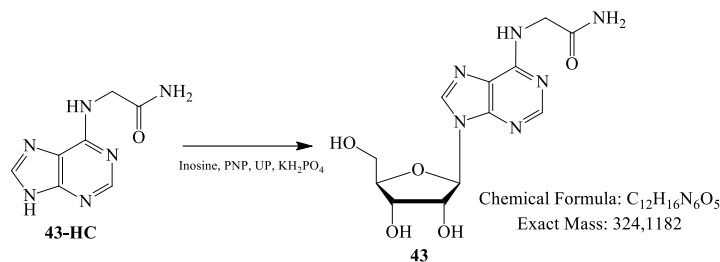
^1H ЯМР: δ 8.07 (м, 0.17 H, NH), 7.96 (2 с, 1 H, H8), 7.29 и 7.24 (1 H, CONH_2 и CONH_2 мини-форма), 7.07 и 7.02 (1 H, CONH_2 мини-форма и CONH_2), 5.85 и 5.83 (м, 2 H, C2-NH₂), 5.74 (уш,д, 1 H, H1'), 5.37 (м, 2 H, OH_{2'} и OH_{5'}), 5.10 (м, 1 H, OH_{3'}) 4.51 (м, 1 H, H_{2'}), 4.11 (м, 1 H, H_{3'}), 4.05 и 3.98 (м, 1.60 H, $\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$), 3.91 (м, 1 H, H_{4'}), 3.65 (м, 1.5 H, H_{5'a}) 3.54 м. д. (м, 1 H, H_{5'b}).

^{13}C ЯМР: δ 171.40 ($\text{NHCH}_2\text{CONH}_2$), 170.86 169.70 159.78 (C6), 154.71 (C2), 150.83 (C4), 136.13 (C8), 113.78 (C5), 86.92 (C1'), 85.36 (C4'), 73.19 (C2'), 70.54 (C3'), 61.60 (C5'), 42.60 м. д. (NHCH_2COOH).

^{15}N ЯМР: δ 240.4 (N7), 196.9 и 179.0 (N1 и N3), 167.2 (N9), 106.1 м. д. (NH), 103.6 (CONH_2), 78.6 м. д. (C2-NH₂).

HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_7\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 340.1369, найдено 340.1300.

Амид N-(9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил)-глицина (43)



Растворяли 100 мг амида N-(9H-пурин-6-ил)глицина (0.507 ммоль) в 250 мл 10 mM калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 670.0 мг инозина (2.500 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 50 мкл PNP (70 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 91% в течение 2 часов.

Целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на сорбенте с обращенной фазой C18 (колонка 50 мл, градиент этанола в воде 0–50%). Выход 117.0 мг (69%) с чистотой 99.76% (*t_r* 8.921 в изократическом режиме 100% А).

¹H ЯМР: δ 8.39 (с, 1 H, H8), 8.22 (с, 1 H, H2), 7.76 (м, 0.8 H, NHCH), 7.36 (с, 1 H, NH₂), 7.00 (с, 1 H, NH₂), 5.91 (д, *J* = 6.2, 1 H, H1'), 5.36 и 5.22 (2 м, 3 H, OH-Ribose), 4.62 (м, 1 H, H2'), 4.16 (м, 1 H, H3'), 4.03 (м, 1.5 H, CH₂^{Gly}), 3.97 (м, 1 H, H4'), 3.69 (м, 2 H, H5'a), 3.56 м. д. (м, 1 H, H5'b).

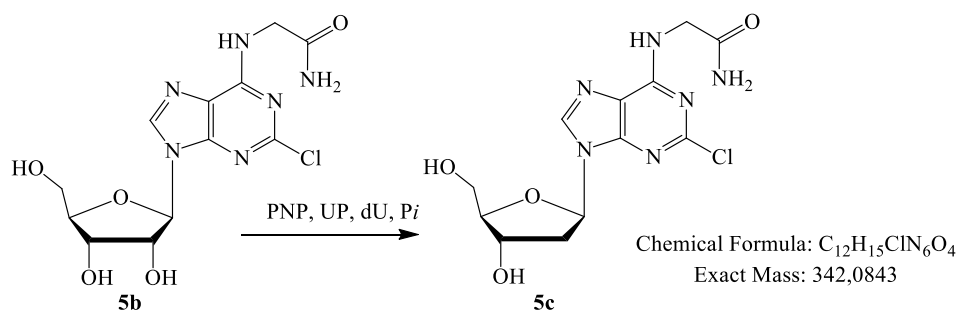
¹³C ЯМР: δ 171.02 (CONH₂), 154.42 (C6), 152.06 (C2), 148.39 (C4), 139.92 (C8), 119.87 (C5), 87.87 (C1'), 85.77 (C4'), 73.41 (C2'), 70.52 (C3'), 61.55 (C5'), 42.73 м. д. (NHCH₂).

¹⁵N ЯМР: δ 240.5 (N7), 170.0 мини-форма (N9), 103.1 (NH₂), 81.0 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₂H₁₆N₆O₅ [M+H]⁺ 325.1260, найдено 325.1300.

3.6. Ферментативный синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов при помощи реакции трансгликозилирования

Амид N-[2-хлор-9-(β-D-2-дезоксифуранозил)-9H-пурин-6-ил]-глицина (5c)



Растворяли 70 мг амида N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-глицина (5b) (0.195 ммоль) в 28 мл 35 mM калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 224.0 мг 2'-дезоксуридина (0.975 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ.

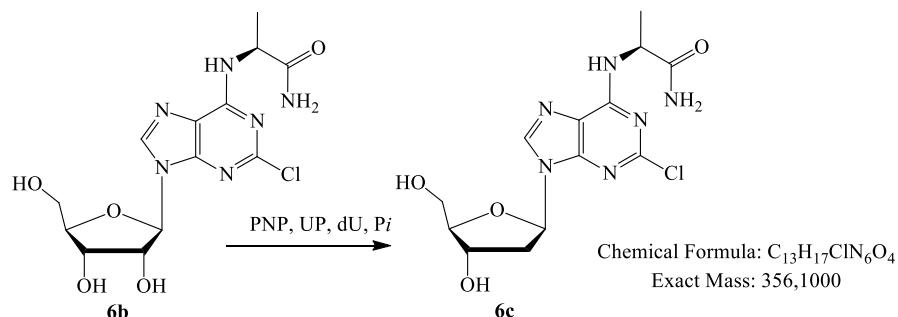
В реакционную смесь добавляли 58 мкл PNP (81 ед. акт.) и 98 мкл UP (167 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 88%, затем к раствору добавляли 9 мл метанола (25% по объему). Смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи препаративной ВЭЖХ по обращенной фазе C18 в градиенте 10% – 50% MeOH в воде. Выход 26 мг (38%) с чистотой 99.66% (t_R 5.486 в изократическом режиме 12% В, t_R 11.930 в 0-100% В).

^1H ЯМР: δ 8.39 и 8.36 (2 с, 1 Н, Н8 и его мини-форма), 8.17 (уш.т., $J = 5.2$, 0.79 Н, $\text{NH}-\text{CH}$) и 7.91 (м, 0.2 Н, $\text{NH}-\text{CH}$ мини-форма), 7.40 (с, 1 Н, CO-NH), 7.06 и 7.00 (2 с, 1 Н, CO-NH), 6.29 (т, $J = 6.8$, 1 Н, $\text{H}_{1'}$), 5.30 (д, $J = 4.3$, 1 Н, $\text{OH}_{3'}$), 4.94 (т, $J = 5.6$, 1 Н, $\text{OH}_{5'}$), 4.45 (м, 0.31 Н, NHCH_2 мини-форма), 4.40 (м, 1 Н, $\text{H}_{3'}$), 3.99 (уш. д, 1.61 Н, NHCH_2), 3.87 (м, 1 Н, $\text{H}_{4'}$), 3.61 (ддд, $J = 11.8, 6.4, 4.8$, 1 Н, $\text{H}_{5'a}$), 3.52 (ддд, $J = 11.8, 6.2, 5.1$, 1 Н, $\text{H}_{5'b}$), 2.66 (тд, $J = 13.2, 6.4$, 1 Н, $\text{H}_{2'a}$), 2.30 м. д. (тд, $J = 13.1, 6.1, 3.6$, 1 Н, $\text{H}_{2'b}$).

^{13}C ЯМР: δ 170.29 (CONH_2), 154.99 (C6), 152.76 (C2), 149.24 (C4), 139.83 (C8), 118.70 (C5), 87.85 (C_4'), 83.52 ($\text{C}_{1'}$), 70.56 ($\text{C}_{3'}$), 61.51 ($\text{C}_{5'}$), 45.30 (NHCH_2 мини-форма, HSQC данные), 42.71 (NHCH_2), 39.08 м. д. ($\text{C}_{2'}$).

^{15}N ЯМР: δ 240.8 (N7), 227.4 (N1), 175.2 (N9), 92.9 (NH мини-форма), 84.9 м. д. (NH). HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_4\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 343.0922, найдено 343.0910.

Амид N-[2-хлор-9-(β -D-2-дезоксирибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-аланина (6c)



Растворили 50 мг амида N-[2-хлор-9- β -D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-аланина (6b) (0.134 ммоль) в 19 мл 35 mM калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 151.8 мг 2'-дезоксидуридина (0.670 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 13 мкл PNP (19 ед. акт.) и 40 мкл UP (68 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 88.5%, затем к раствору добавляли 7 мл метанола (27% по объему).

Смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на сорбенте с обращенной фазой C18 (колонка 40 мл, градиент метанола в воде 0 – 15%). Выход 25.4 мг (53%) с чистотой 99.23% (t_R 7.446 в изократическом режиме 12% В).

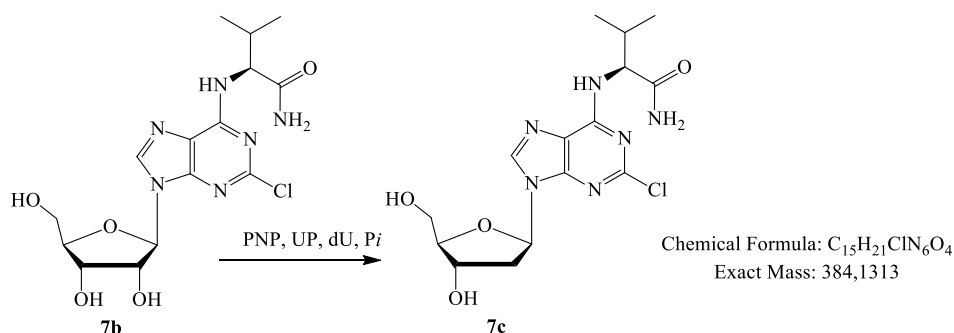
^1H ЯМР: δ 8.40 (с, 1 H, H8), 7.99 (уш. д, 0.16 H, NH-CH), 7.91 (д, $J = 6.9$, 0.76 H, NH-CH), 7.44 и 7.42 (2 с, 1 H, CONH₂), 7.09 и 7.04 (2 с, 1 H, CONH₂), 6.28 (т, $J = 6.8$, 1 H, H_{1'}), 5.32 (м, 0.17 H, CHNH), 5.31 (д, $J = 3.9$, 1 H, OH_{3'}), 4.94 (т, $J = 5.4$, 1 H, OH_{5'}), 4.61 (м, 0.77 H, CHNH), 4.40 (м, 1 H, H_{3'}), 3.87 (м, 1 H, H_{4'}), 3.61 (тд, $J = 11.8, 5.3, 4.3$, 1 H, H_{5'a}), 3.52 (тд, $J = 11.9, 4.8, 4.4$, 1 H, H_{5'b}), 2.66 (тд, $J = 13.4, 6.6$, 1 H, H_{2'a}), 2.30 (тд, $J = 13.1, 6.2, 3.5$, 1 H, H_{2'b}), 1.41 м. д. (д, $J = 7.2$, 3 H, CHCH₃).

^{13}C ЯМР: δ 172.69 (CONH₂), 154.08 (C6), 149.20 (C4), 139.92 (C8), 118.4 (C5), 87.90 (C_{4'}), 83.56 (C_{1'}), 70.5 (C_{3'}), 61.51 (C_{5'}), 51.33 (NHCH мини-форма), 49.10 (NHCH), 39.21 (C_{2'}), 18.11 м. д. (CH-CH₃).

^{15}N ЯМР: δ 89.6 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₃H₁₈N₆O₄Cl [M+H]⁺ 357.1078, найдено 357.1011.

Амид N-[2-хлор-9-(β-D-2-дезоксирибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-валина (7c)



Растворили 150 мг амида N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-валина (7b) (0.375 ммоль) в 188 мл 7 mM калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 598.24 мг 2'-дезоксинуридина (2.622 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 18.5 мкл PNP (26 ед. акт.) и 94 мкл UP (160 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °C. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ.

Через 2 часа смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на сорбенте с обращенной фазой C18 (колонка 40 мл, градиент этанола в воде 0 – 10%). Выход 68.0 мг (47%) с чистотой 99.60% (tr 3.014 в изократическом режиме 20% B).

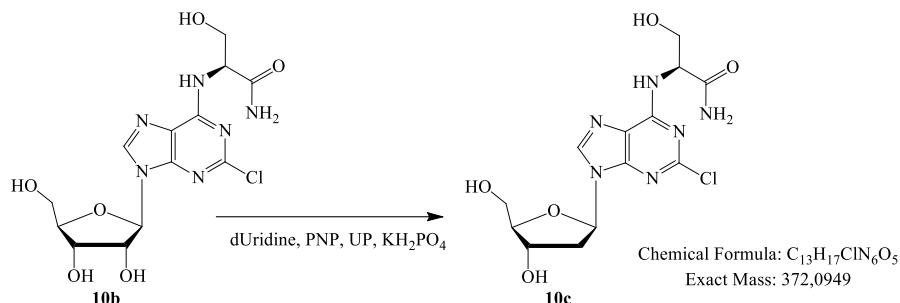
^1H NMR: δ 8.42 (с, 1 H, H8), 7.81 и 7.47 (2 д, 0.21 H и 0.78 H, NH), 7.54, 7.36, 7.19 и 7.14 (4 с, 0.75 H, 0.22 H и 1 H, NH₂), 6.28 (т, $J = 6.7$, 1 H, H_{1'}), 5.31 (м, 1.21 H, $^{\alpha}\text{CH-Val}$ и OH_{3'}), 4.93 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.52 (м, 0.75 H, $^{\alpha}\text{CH-Val}$), 4.40 (м, 1 H, H_{3'}), 3.86 (м, 1 H, H_{4'}), 3.60 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.52 (м, 1 H, H_{5'b}), 2.66 (м, 1 H, H_{2'a}), 2.30 (м, 1 H, H_{2'b}), 2.18 (м, 1 H, $^{\beta}\text{CH-Val}$), 0.94 м. д. (м, 6 H, CH₃-Val).

^{13}C NMR: δ 172.34 (CONH₂), 154.68 (C6), 152.73 (C2), 151.58 (C4 мини-форма), 149.38 (C4), 139.99 (C8), 118.48 (C5), 87.87 (C_{4'}), 83.55 (C_{1'}), 70.53 (C_{3'}), 61.48 (C_{5'}), 60.98 и 58.82 ($^{\alpha}\text{CH-Val}$), 39.06 (C_{2'}) (перекрыт сигналом ДМСО-d₆, определен по спектру HSQC), 30.54 ($^{\beta}\text{CH-Val}$), 19.11, 18.26 и 17.42 м. д. (CH₃-Val).

^{15}N NMR: δ 239.7 (N7), 227.0 (N1), 175.4 (N9), 106.5, 106.2, 103.3 и 103.1 (NH_2), 100.7 и 92.7 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_4\text{Cl}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 383.1235, найдено 383.1323.

Амид N-[2-хлор-9-(β -D-2-дезоксирибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-серина (10с)



Растворили 100 мг амида N-[2-хлор-9- β -D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-серина (**10b**) (0.257 ммоль) в 256 мл 6 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 350.50 мг 2'-дезоксидуридина (1.535 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 90 мкл PNP (126 ед. акт.) и 77 мкл UP (130 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. При достижении конверсии 81% через 3.5 часа реакцию останавливали 90 мл этанола (26%).

Смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на сорбенте с обращенной фазой C18 (колонка 40 мл, градиент этанола в воде 0–10%). Выход 44.0 мг (45%) с чистотой 99.64% (t_{R} 6.200 в изократическом режиме 7% В).

^1H ЯМР: δ 8.42 и 8.39 (s и m, 1 H, H8), 7.60 (m, 0.81 H, NH), 7.48 (m, 1 H, NH_2), 7.17 и 7.13 (c, 1 H, NH_2), 6.29 (t, $J = 6.7$, 1 H, $\text{H}_{1'}$), 5.37 (m, 0.79 H, $^{\alpha}\text{CH-Ser}$ мини-форма и OH-Ser), 4.96 (m, 1.35 H, $\text{OH}_{3'}$ и $\text{OH}_{5'}$), 4.62 (m, 0.76 H, $^{\alpha}\text{CH-Ser}$), 4.40 (m, 1 H, $\text{H}_{3'}$), 3.87 (m, 1 H, $\text{H}_{4'}$), 3.81 (m, 2 H, $^{\beta}\text{CH}_2\text{-Ser}$), 3.61 (дд, $J = 4.4$ Гц; 11.5, 1 H, $\text{H}_{5'a}$), 3.52 (дд, $J = 4.2$ Гц; 11.7, 1 H, $\text{H}_{5'b}$), 2.66 (m, 1 H, $\text{H}_{2'a}$), 2.30 м. д. (m, 1 H, $\text{H}_{2'b}$).

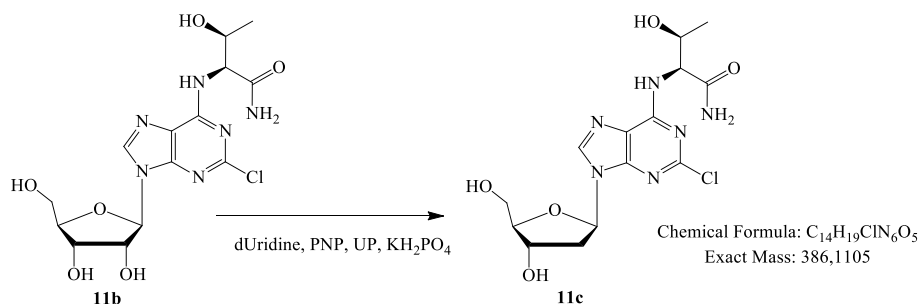
^{13}C ЯМР: δ 171.31 (CONH_2), 154.57 (C6), 152.72 (C2), 151.65 (C4 мини-форма, данные HSQC), 149.32 (C4), 140.03 (C8), 118.75 (C5), 87.89 (C4'), 83.60 (C1'), 70.57 (C3'), 61.53 (C5' и CH_2), 58.32 (CH мини-форма) 56.08 (CH) 39.09 м. д. (C2').

^{15}N ЯМР: δ 240.2 (N7), 174.5 (N9), 105.0 м. д. (NH_2).

HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_5\text{Cl}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 371.0871, найдено 371.1069.

Амид N-[2-хлор-9-(β -D-2-дезоксирибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-треонина

(11с)



Растворили 100 мг амида N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-L-треонина (**11b**) (0.248 ммоль) в 62 мл 28 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0). Добавляли 396.00 мг 2'-дезоксиуридина (1.736 ммоль) и рН реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 50 мкл PNP (70 ед. акт.) и 44 мкл UP (75 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. При достижении конверсии 81% через 2 часа реакцию останавливали 20 мл этанола (25%).

Смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на сорбенте с обращенной фазой C18 (колонка 44 мл, градиент этанола в воде 0–7%). Выход 31.0 мг (32%) с чистотой 99.34% (t_R 6.700 в изократическом режиме 7% В).

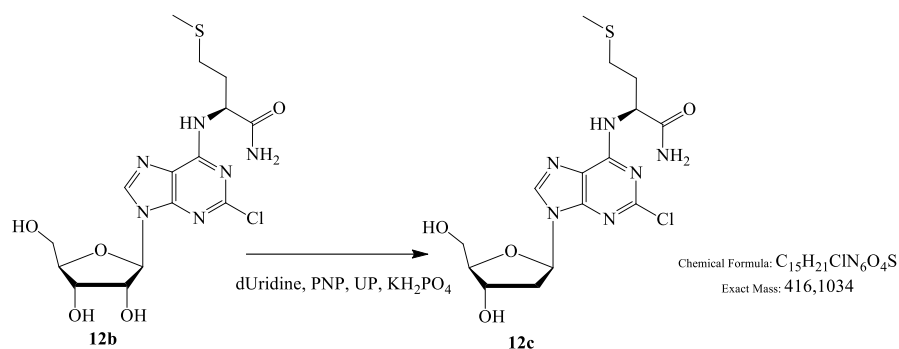
¹H ЯМР: δ 8.44 и 8.40 (2 уш.с, 1 H, H8 и H8 мини-форма), 7.49 и 7.44 (2 уш.с, 1 H, NH₂ и NH₂ мини-форма), 7.33 (м, 0.20 H, NH мини-форма), 7.26 (уш.д, 0.82 H, NH), 7.14 и 7.11 (2 уш.с, 1 H, NH₂ и NH₂ мини-форма), 6.29 (уш.т, 1 H, H₁'), 5.33 (м, 1.18 H, αCH-Thr мини-форма и OH_{3'}'), 5.13 (м, 0.80 H, CHOH), 4.95 (м, 1.18 H, OH_{5'}'), 4.53 (м, 0.80 H, αCH-Thr), 4.41 (м, 1 H, H_{3'}'), 4.19 (м, 1 H, βCH-Thr и βCH-Thr мини-форма), 3.87 (м, 1 H, H_{4'}'), 3.60 (м, 1 H, H_{5'a}'), 3.53 (м, 1 H, H_{5'b}'), 2.67 (м, 1 H, H_{2'a}'), 2.30 (м, 1 H, H_{2'b}'), 1.12 м. д. (уш. д, 3 H, γCH₃-Thr).

¹³C ЯМР: δ 171.54 (CONH₂), 154.92 (C6), 152.71 (C2), 149.30 (C4), 140.14 (C8), 118.69 (C5), 87.88 (C_{4'}'), 83.59 (C_{1'}'), 83.30 (C_{1'} мини-форма), 70.52 (C_{3'}'), 66.61 (βCH-Thr), 61.48 (C_{5'} и αCH-Thr мини-форма), 59.12 (αCH-Thr), 39.09 (C_{2'}'), 20.40 м. д. (γCH₃-Thr).

¹⁵N ЯМР: δ 239.6 (N7), 226.9 (N1), 175.4 (N9), 105.2 (NH₂), 95.7 мини-форма и 87.6 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₄H₁₉N₆O₅Cl [M+H]⁺ 387.1184, найдено 387.1189.

**Амид N-[2-хлор-9-(β-D-2-деоксирибофуранозил)-9H-пурин-6-ил]-L-метионина
(12c)**



Растворили 200 мг амида *N*-[2-хлор-9-β-*D*-рибофуранозил-9*H*-пурин-6-ил]-*L*-метионина (**12b**) (0.462 ммоль) в 463 мл 7 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0). Добавляли 740.00 мг 2'-дезоксиуридина (3.245 ммоль) и рН реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 140 мкл PNP (196 ед. акт.) и 140 мкл UP (238 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ.

Через 4 часа смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на сорбенте с обращенной фазой C18 (колонка 40 мл, градиент этанола в воде 0 – 10%). Выход 101.0 мг (52%) с чистотой 99.50% (*t_R* 3.340 в изократическом режиме 20% В).

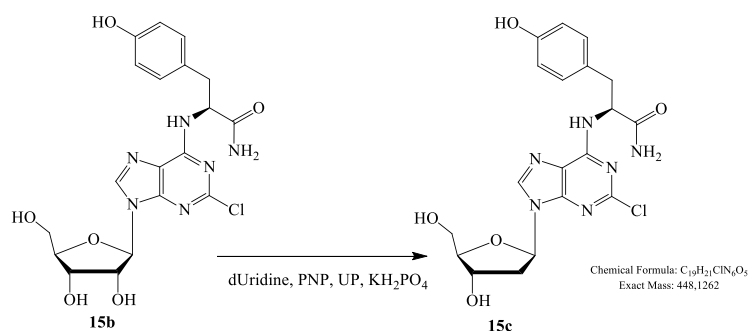
¹H ЯМР: δ 8.40 (м, 1 H, H₈), 8.11 (м, 1 H, NH) 7.44 и 7.10 (2 м, 1 H и 1 H, NH₂), 6.29 (т, *J* = 6.7, 1 H, H_{1'}), 5.39 и 4.68 (2 м, 0.20 H и 0.74 H, αCH-Met), 5.31 (д, *J* = 3.9, 1 H, OH_{3'}), 4.94 (м, 1 H, OH_{5'}), 4.40 (м, 1 H, H_{3'}), 3.87 (м, 1 H, H_{4'}), 3.60 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.52 (м, 1 H, H_{5'b}), 2.67 (м, 1 H, H_{2'a}), 2.56 (м, 2 H, γCH₂-Met), 2.30 (м, 2 H, H_{2'b}), 2.10 (м, 2 H, βCH-Met), 2.05 м. д. (м, 3 H, CH₃-Met).

¹³C ЯМР: δ 173.43 (CONH₂), 155.34 (C₆), 153.25 (C₂), 149.96 (C₄), 140.45 (C₈), 119.26 (C₅), 88.45 (C_{4'}), 84.14 (C_{1'}), 71.15 (C_{3'}), 62.09 (C_{5'}), 55.90 и 53.59 (αCH-Met), 39.71 (C_{2'}) (перекрыт сигналом ДМСО-*d*₆, определен по спектру HSQC), 31.76 (βCH-Met), 30.43 (γCH₂-Met), 15.07 м. д. (CH₃-Met).

¹⁵N ЯМР: δ 241.0 (N₇), 228.0 (N₁), 175.0 (N₉), 103.9 (NH₂), 102.9 и 95.2 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₅H₂₁N₆O₄ClS [M-H]⁻ 415.0955, найдено 415.1167.

Амид *N*-[2-хлор-9-β-*D*-2-дезоксирибофуранозил-9*H*-пурин-6-ил]-*L*-тирозина (**15c**)



Растворили 190 мг амида *N*-[2-хлор-9-β-*D*-рибофуранозил-9*H*-пурин-6-ил]-*L*-тирозина (**15b**) (0.409 ммоль) в 41 мл 70 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0).

Добавляли 719.0 мг 2'-дезоксиаденозина (3.152 ммоль) и рН реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 20 мкл PNP (29 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ.

Через 4 часа смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на сорбенте с обращенной фазой C18 (колонка 44 мл, градиент этанола в воде 0 – 12%). Выход 43.91 мг (24%) с чистотой 99.60% (t_R 4.133).

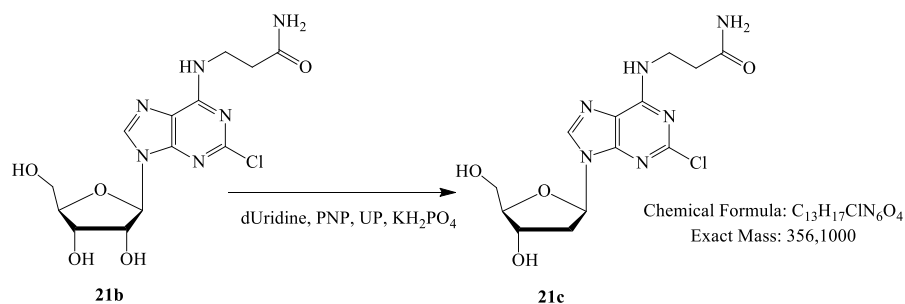
1H ЯМР: δ 8.37 (м, 1 H, C8), 8.02 и 7.85 (2 м, 0.20 H и 0.67 H, NH), 7.56, 7.49, 7.15 (3 с, 0.74 H, 0.24 H и 0.76 H, NH₂), 7.08 (м и д, $J = 7.4, 2.26$ H, NH₂ и ^{benz}CH-Tyr), 6.61 (д, 2 H, $J = 7.6, 2$ ^{benz}CH-Tyr), 6.26 (т, $J = 6.4, 1$ H, C1'), 5.49 и 4.76 (2 м, 0.23 H и 0.77, ^αCH-Tyr), 5.31 (м, 0.48 H, OH_{3'}), 4.94 (м, 0.52 H, OH_{5'}), 4.39 (м, 1 H, H_{3'}), 3.85 (м, 1 H, H_{4'}), 3.59 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.51 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.06 и 2.84 (2 м, 1.72 H и 0.21 H, ^βCH₂-Tyr), 2.65 (м, 1 H, H_{2'a}), 2.28 м. д. м. д. (м, 1 H, H_{2'b}).

^{13}C ЯМР: δ 173.30 (CONH₂), 156.33 (^{benz}C-Tyr), 155.10 (C6), 153.23 (C2), 151.97 (C4 мини-форма), 149.84 (C4), 140.45 (C8), 130.55 (^{benz}CH-Tyr), 128.41(^{benz}C-Tyr), 119.11 (C5) 115.36 (^{benz}CH-Tyr), 88.44 (C_{4'}) 84.11 (C_{1'}) 71.12 (C_{3'}) 62.08 (C_{5'}) 58.50 (^αCH-Tyr мини-форма), 55.92 (^αCH-Tyr), 39.71 (C_{2'}) (перекрыт сигналом ДМСО-*d*₆, определен по спектру HSQC), 36.86 м. д. (^βCH₂-Tyr).

^{15}N ЯМР: δ 243.2 (N7 мини-форма), 240.6 (N7), 227.0 (N1), 174.7 (N9), 104.0 (NH₂), 103.8 мини-форма и 95.5 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₉H₂₁N₆O₅Cl [M-H]⁻ 447.1184, найдено 447.1287.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-2-дезоксирибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-β-аланина (21c)



Растворили 70 мг (0.188 ммоль) амида N-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-β-аланина (**21b**) в 30 мл 35 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0). Добавляли 240.0 мг 2'-дезоксидуридина (1.050 ммоль) и рН реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 63 мкл PNP (88 ед. акт.) и 105 мкл UP (178 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 83.7%, затем к раствору добавляли 10 мл метанола (25% по объему). Смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи препаративной ВЭЖХ на

сорбенте с обращенной фазой C18 в градиенте 10–60% MeOH в воде. Выход 49 мг (73%) с чистотой 98.93% (t_R 7.839 в изократическом режиме 12% B).

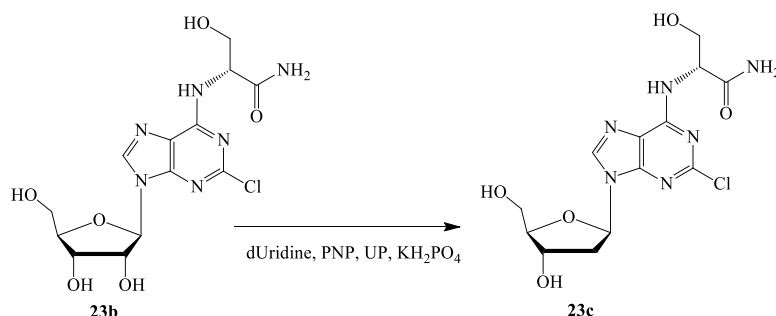
1H ЯМР: 8.39 и 8.36 (2 с, 1 H, H8), 8.19 (м, 0.77 H, NHCH), 8.10 (уш. сигн., 0.16 H, NHCH), 7.35 и 7.30 (2 с, 0.79 и 0.17 H, CO-NH₂), 6.85 (с, 1 H, CO-NH₂), 6.27 (т, $J = 6.8$, 1 H, H1'), 5.31 (д, $J = 4.1$, 1 H, OH3'), 4.94 (т, $J = 5.5$, 1 H, OH5'), 4.40 (м, 1 H, H3'), 4.03 и 3.62 (2 м, 0.35 и 1.56 H, CH₂-NH), 3.86 (м, 1 H, H4'), 3.61 (ддд, $J \sim 11.9, 5.0$, 1 H, H5'a), 3.52 (ддд, $J = 11.9, 5.2, 4.8$, 1 H, H5'b), 2.65 (ддд, $J = 13.5, 6.1, 3.5$, 1 H, H2'a), 2.43 (т, $J = 7.2$, 2 H, CH₂CONH₂), 2.29 м. д. (ддд, $J = 13.3, 6.3, 3.5$, 1 H, H2'b).

^{13}C ЯМР: δ 172.42 (CONH₂), 154.81 (C6), 153.03 (C2), 149.06 (C4), 139.55 (C8), 118.50 (C5), 87.85 (C4'), 83.48 (C1'), 70.57 (C3'), 61.53 (C5'), 39.13 (C2', данные HSQC), 39.12 (NHCH₂ мини-форма, данные HSQC), 36.58 (NHCH₂), 35.56 и 34.22 м. д. (CH₂CONH₂).

^{15}N ЯМР: δ 240.6 (N7), 226.5 (N1), 175.0 (N9), 108.8 (CONH₂), 100.6 мини-форма и 92.9 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₃H₁₇N₆O₄Cl [M+H]⁺ 357.1078, найдено 357.1011.

Амид N-[2-хлор-9-β-D-2-дезоксирибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-D-серина (23c)



Растворили 70 мг (0.188 ммоль) амида N^ε-[2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил]-D-серина (**23b**) в 25 мл 35 mM калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 205.3 мг 2'-дезоксидуридина (0.900 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 54 мкл PNP (75 ед. акт.) и 90 мкл UP (153 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 83.5%, затем к раствору добавляли 9 мл этанола (26% по объему).

Смесь концентрировали на ротаторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи препаративной ВЭЖХ на сорбенте с обращенной фазой C18 в градиенте 10% – 50% MeOH в воде. Выход 25.2 мг (38%) с чистотой 98.60% (t_R 3.970 в изократическом режиме 12% B).

1H ЯМР: 8.43 и 8.39 (2 с, 0.85 и 0.14 H, H8), 7.66 и 7.58 (2 уш. д, 0.09 H и 0.68 H, NHCH), 7.48 и 7.44 (2 сигн, 0.76 и 0.04 H, CONH₂), 7.18 и 7.14 (2 сигн., 0.75 и 0.09 H, CONH₂), 6.29 (т, $J = 6.8$, 1 H, H1'), 5.38 (м, 0.12 H, CHNH), 5.31 (д, $J = 4.3$, 1 H, OH3'), 5.02 и 4.93 (2 уш.т, 0.77 и 0.12 H, OH-Ser), 4.93 (т, $J = 5.6$, 1 H, OH5'), 4.62 (м, 0.76 H, CHNH), 4.40

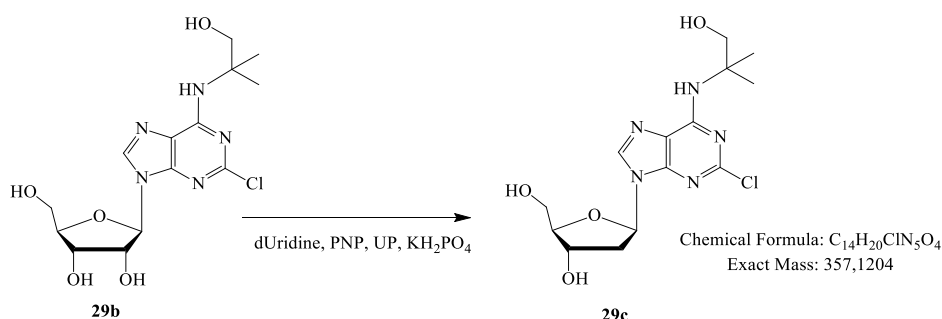
(м, 1 H, H_{3'}), 3.87 (м, 1 H, H_{4'}), 3.80 (м, 2 H, CH₂-Ser), 3.61 (дт, $J = 11.8, 5.0$, 1 H, H_{5'a}), 3.52 (ддд, $J = 11.7, 5.8, 4.6$, 1 H, H_{5'b}), 2.65 (дт, $J = 13.4, 7.0$, 1 H, H_{2'a}), 2.30 м. д. (ддд, $J = 13.2, 6.1, 3.4$, 1 H, H_{2'b}).

¹³C ЯМР: δ 171.25 (CONH₂), 154.53 (C2), 152.69 (C6), 149.32 (C4), 140.01 (C8), 118.73 (C5), 87.87 (C_{4'}), 83.55 (C_{1'}), 70.54 (C_{3'}), 61.50 (C_{5'} и CH₂OH), 58.90 (NHCH мини-форма, HSQC данные), 56.02 (NHCH), 38.95 м. д. (C_{2'}, HSQC данные).

¹⁵N ЯМР: δ 240.2 (N7), 227.5 (N1), 175.6 (N9), 105.0 (NH₂), 99.5 мини-форма и 91.3 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₄H₁₉N₆O₅Cl [M+H]⁺ 387.1184, найдено 387.1112.

2-[(2-хлор-9-β-D-2-дезоксирибофуранозил-9H-пурин-6-ил)амино]-2-метилпропан-1-ол (29c)



Растворили 70 мг (0.187 ммоль) 2-[(2-хлор-9-β-D-рибофуранозил-9H-пурин-6-ил)амино]-2-метилпропан-1-ола **29b** в 28 мл 35 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7.0). Добавляли 214.1 мг 2'-дезоксидуридина (0.938 ммоль) и pH реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 56 мкл PNP (78 ед. акт.) и 94 мкл UP (160 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 88.1%, затем к раствору добавляли 9 мл метанола (24% по объему).

Смесь концентрировали на ротационном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи препаративной ВЭЖХ на сорбенте с обращенной фазой C18 в градиенте 10% – 60% MeOH в воде. Выход 25 мг (37%) с чистотой 98.66% (t_R 6.430 в изократическом режиме 30% В).

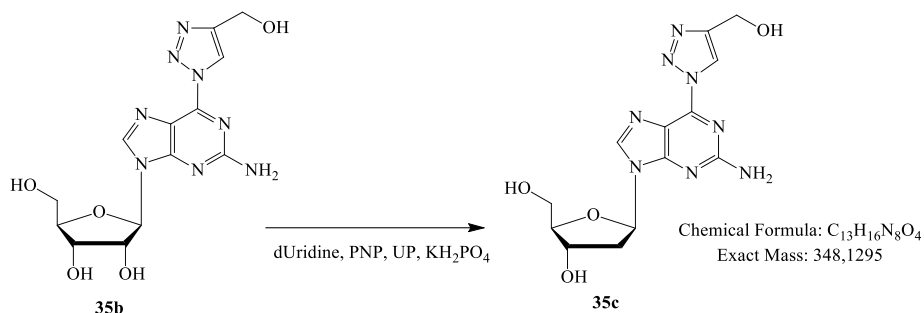
¹H ЯМР: δ 8.36 (с, 1 H, H8), 7.03 (уш. сигн, 1 H, NH), 6.27 (т, $J = 6.8$, 1 H, H_{1'1}), 5.30 (д, $J = 4.2$, 1 H, 3'-OH), 5.09 (т, $J = 5.4$, 1 H, AIB-OH), 4.93 (т, $J = 5.7$, 1 H, OH_{5'}), 4.40 (м, 1 H, H_{3'}), 3.86 (м, 1 H, H_{4'}), 3.60 (дт, $J = 11.8, 5.1$, 1 H, H_{5'a}), 3.57 (д, $J = 5.8, 2$ H, AIB-CH₂), 3.52 (ддд, $J = 11.6, 5.8, 5.0$, 1 H, H_{5'b}), 2.65 (ддд, $J = 13.4, 7.3, 6.2$, 1 H, H_{2'a}), 2.29 (ддд, $J = 13.4, 6.3, 3.6$, 1 H, H_{5'b}), 1.42 м. д. (с, 6 H, Me).

¹³C ЯМР: δ 154.76 (C2), 152.10 (C6), 148.61 (C4), 139.51 (C8), 118.97 (C5), 87.85 (C_{4'}), 83.53 (C_{1'}), 70.55 (C_{3'}), 67.59 (CH₂-AIB), 61.51 (C_{5'}), 55.71 (C-CH₃), 39.08 (C_{2'}), 23.20 м. д. (2 CH₃).

^{15}N ЯМР: δ 240.24 (N7), 175.11 (N9), 106.02 м. д. (NH).

HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 358.1282, найдено 358.1213.

2-амино-9-(β -D-2-дезоксирибофуранозил)-6-[4-(3-гидроксиметил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил]-9H-пурин (35с)



Растворили 45 мг (0.123 ммоль) 2-амино-9- β -D-рибофуранозил-6-[4-(3-гидроксиметил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил]-9H-пурина **35b** в 30 мл 35 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0). Добавляли 273.6 мг 2'-деоксиуридина (1.230 ммоль) и рН реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 38 мкл PNP (53 ед. акт.) и 38 мкл UP (65 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 88% в течение 2 часов, затем к раствору добавляли 10 мл этанола (25% по объему).

Смесь концентрировали на роторном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи препаративной ВЭЖХ на сорбенте с обращенной фазой C18 в градиенте 0% – 7% EtOH в воде. Выход 20.0 мг (46%) с чистотой 98.82% (t_{R} 5.353).

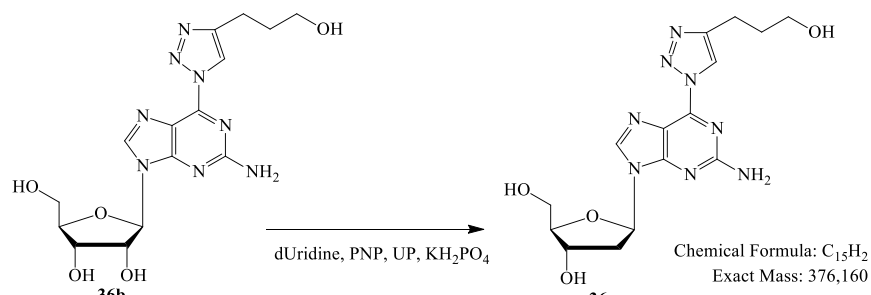
^1H ЯМР: δ 8.98 (с, 1 H, H5-triazole), 8.47 (с, 1 H, H8), 7.01 (с, 2 H, NH₂), 6.32 (т, $J = 6.8$, 1 H, H1'), 5.39 (уш.т, 1 H, OH^{click}), 5.32 (уш.д, 1 H, OH_{3'}), 4.96 (уш.т, 1 H, OH_{5'}), 4.68 (д, $J = 5.3$, 2 H, CH₂OH), 4.41 (м, 1 H, H3'), 3.87 (м, 1 H, H4'), 3.61 (м, 1 H, H5'a), 3.55 (м, 1 H, H5'b), 2.68 (м, 1 H, H2'a), 2.31 м. д. (м, 1 H, H2'b).

^{13}C ЯМР: δ 159.82 (C2), 155.91 (C4), 148.74 (C4-triazole), 144.54 (C6), 141.62 (C8), 122.64 (C5-triazole), 115.50 (C5), 87.67 (C4'), 82.82 (C1'), 70.47 (C3'), 61.43 (C5'), 54.80 (CH₂OH), 39.13 м. д. (C2', перекрыт сигналом ДМСО-*d*6 определен по спектру HSQC).

^{15}N ЯМР: δ 360.8 (N3-triazole), 253.6 (N1 or N2-triazole), 241.3 (N7), 212.6 и 202.1 (N1 и N3), 171.4 (N9), 84.5 м. д. (NH₂).

HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 347.1216, найдено 347.1281.

2-амино-9-(β -D-2-дезоксирибофуранозил)-6-[4-(3-гидроксипропил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил]-9H-пурин (36с)



Растворили 27 мг (0.069 ммоль) 9-β-*D*-рибофуранозил-2-амино-6-[4-(гидроксиметил)-1,2,3-триазол-1-ил]-пурина **36b** в 20 мл 35 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0). Добавляли 119.0 мг 2'-дезоксидуридина (0.521 ммоль) и рН реакционной смеси доводили до 7.0. Полученную смесь нагревали при перемешивании до полного растворения веществ. В реакционную смесь добавляли 14 мкл PNP (20 ед. акт.) и 21 мкл UP (35 ед. акт.), раствор термостатировали при 50 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до конверсии целевого нуклеозида 79% в течение 10 часов, затем к раствору добавляли 20 мл этанола (50% по объему).

Смесь концентрировали на ротонном испарителе до минимального объема и целевой продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии на колонке объемом 30 мл на сорбенте с обращенной фазой C18 в градиенте 0% – 15% EtOH в воде. Выход 6.6 мг (25%) с чистотой 95.00% (*t_R* 5.353).

¹H ЯМР: δ 8.84 (с, 1 H, H5-triazole), 8.46 (с, 1 H, H8), 6.98 (с, 2 H, NH₂), 6.32 (т, *J* = 6.7, 1 H, H_{1'}), 5.31 (уш.д, 1 H, OH_{3'}), 4.96 (ушир.т, OH_{5'}), 4.53 (ушир.т, 1 H, CH₂OH), 4.41 (м, 1 H, H_{3'}), 3.87 (м, 1 H, H_{4'}), 3.60 (м, 1 H, H_{5'a}), 3.55 (м, 1 H, H_{5'b}), 3.49 (м, 2 H, CH₂OH), 2.81 (т, *J* = 7.6, 2 H, CH₂CH₂CH₂OH), 2.67 (м, 1 H, H_{2'a}), 2.31 (м, 1 H, H_{2'b}), 1.84 м. д. (м, 2 H, CH₂CH₂CH₂OH).

¹³C ЯМР: δ 159.80 (C2), 155.89 (C4), 147.41 (C4-triazole), 144.64 (C6), 141.54 (C8), 121.76 (C5-triazole), 115.53 (C5), 87.66 (C_{4'}), 82.81 (C_{1'}), 70.46 (C_{3'}), 61.43 (C_{5'}), 59.78 (CH₂OH), 38.94 (C_{2'}, перекрыт сигналом ДМСО-*d*₆ определен по спектру HSQC), 31.87 (CH₂CH₂OH), 21.31 м. д. (CH₂CH₂CH₂OH).

¹⁵N ЯМР: δ 360.8 (N3-triazole), 253.1 (N1 или N2-triazole), 240.7 (N7), 213.5 и 202.1 (N1 и N3), 171.5 (N9), 84.4 м. д. (NH₂).

HRMS (ESI) вычислено для C₁₅H₂₀N₈O₄ [M+H]⁺ 377.1677, найдено 377.1687.

Заключение

В результате выполнения комплекса экспериментальных работ можно сделать следующие выводы:

- 1) показано, что химически синтезированные двадцать четыре 2-хлорзамещенных рибонуклеозида с остатками амидов хиральных аминокислот и линейными/разветвленными аминоспиртами в N⁶ положении аденозина не проявляют цитотоксичности в опытах с клетками линий HepG2 и LS174T, при этом являются частичными агонистами A₁ аденозиновых рецепторов; активность трех нуклеозидов, имеющих в структуре остатки серинола, аланинола и β-аминоизобутилового спирта, превосходит активность известного селективного агониста аденозиновых рецепторов типа A₁ 2-хлор-N⁶-циклопентиладенозина или близка к ней;
- 2) исследованы фотофизические свойства полученных химическим синтезом C6-1,2,3-триазол-1-илзамещенных пуриновых рибонуклеозидов (4 соединения) и полученных при помощи реакции трансгликозилирования соответствующих 2'-дезоксирибозидов (2 соединения); показано, что все соединения проявляли большой стоксов сдвиг (до 200 нм) в водно-ацетонитрильном растворе;
- 3) осуществлен ферментативный синтез рибозидов 2-Н-пурина (1 соединение) и 2-амино-пурина (3 соединения), замещенных остатками глицина и глицинглутаминовой кислоты в C6 положении основания для тестирования в качестве агонистов аденозиновых рецепторов;
- 4) показана принципиальная возможность биосинтеза новых аналогов клофарабина – 2'-дезоксидефтор арабинозидов – из рибозидов 2-хлорзамещенных аденозинов с остатками амидов хиральных аминокислот в N⁶ положении;
- 5) проведено исследование аномалии в спектрах ЯМР нуклеозидов 2-хлораденина: с использованием двумерной гетероядерной спектроскопии ЯМР впервые доказано наличие внутримолекулярной водородной связи между N7 атомом пурина и СН протоном заместителя при N⁶ атоме аденина, приводящее к образованию заторможенной структуры нуклеозида.

Список сокращений

- 5'-NT – 5'-нуклеотидаза
- ADA – аденозиндезаминаза
- ADP – аденозиндифосфат
- AR – аденозиновый рецептор
- ССРА – 2-хлор-N⁶-циклопентиладенозин
- CDP – цитидиндифосфат
- CLARITY – Cladribine tablets treating multiple sclerosis orally
- Cl-IB-MECA – 2-хлор-N⁶-(3-иодобензил)-аденозин-5'-N-метил-уронамид
- COSY – correlated spectroscopy
- CPA – N⁶-циклопентиладенозин
- CuAAC – Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
- dATP – дезоксиаденозинтрифосфат
- dCK – дезоксицитидинкиназа
- DPCPX – 8-циклопентил-1,3-дипропилксантин
- E. coli* – *Escherichia coli*
- ESI – ионизация электрораспылением
- FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- GPCR – рецепторы, сопряжённые с G-белком
- HMBC – heteronuclear Multiple Bond Correlation
- HRMS – high Resolution Mass-Spectrometry
- HSQC – heteronuclear Single Quantum Coherence
- IB-MECA – N⁶-(3-иодобензил)-аденозин-5'-N-метил-уронамид
- ICI – immune checkpoint inhibitors
- LC-MS – liquid chromatography–mass spectrometry
- NMR – ядерный магнитный резонанс
- PNP – пурииннуклеозидфосфорилаза
- S_NAr – нуклеофильное ароматическое замещение
- UDP – уридинтрифосфат
- UP – уридинфосфорилаза
- АМФ – аденозинмонофосфат
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – N,N-диметилформаид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖНВЛП – жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТГФ – тетрагидрофуран

ТСХ – тонкослойная хроматография

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

цАМФ – циклоаденозинмонофосфат

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Список использованной литературы

- [1] W. Al Jaroudi and A. E. Iskandrian. Regadenoson: a new myocardial stress agent //Journal of the American College of Cardiology. – 2009. – Т. 54. – №. 13. – С. 1123-1130.
- [2] S. G. Johnson and S. Peters. Advances in pharmacologic stress agents: focus on regadenoson //Journal of nuclear medicine technology. – 2010. – Т. 38. – №. 3. – С. 163-171.
- [3] A. E. Iskandrian *et al.* Adenosine versus regadenoson comparative evaluation in myocardial perfusion imaging: results of the ADVANCE phase 3 multicenter international trial //Journal of nuclear cardiology. – 2007. – Т. 14. – С. 645-658. doi: 10.1016/j.nuclcard.2007.06.114.
- [4] A. Saini, R. Patel, S. Gaba, G. Singh, G. D. Gupta, and V. Monga. Adenosine receptor antagonists: Recent advances and therapeutic perspective //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2022. – Т. 227. – С. 113907. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113907.
- [5] I. Bellezza, A. Tucci, and A. Minelli. 2-Chloroadenosine and human prostate cancer cells //Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). – 2008. – Т. 8. – №. 7. – С. 783-789.
- [6] A. Minelli, I. Bellezza, A. Tucci, M. G. Rambotti, C. Conte, and Z. Culig. Differential involvement of reactive oxygen species and nucleoside transporters in cytotoxicity induced by two adenosine analogues in human prostate cancer cells //The Prostate. – 2009. – Т. 69. – №. 5. – С. 538-547. doi: <https://doi.org/10.1002/pros.20900>.
- [7] A. Minelli, I. Bellezza, M. Agostini, S. Bracarda, and Z. Culig. Mechanism of 2-chloroadenosine toxicity to PC3 cell line //The Prostate. – 2006. – Т. 66. – №. 13. – С. 1425-1436. doi: <https://doi.org/10.1002/pros.20458>.
- [8] K. L. Seley-Radtke and M. K. Yates. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold //Antiviral research. – 2018. – Т. 154. – С. 66-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.004>.
- [9] M. K. Yates and K. L. Seley-Radtke. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold //Antiviral research. – 2019. – Т. 162. – С. 5-21.
- [10] G. Romeo, U. Chiacchio, A. Corsaro, and P. Merino. Chemical synthesis of heterocyclic– sugar nucleoside analogues //Chemical reviews. – 2010. – Т. 110. – №. 6. – С. 3337-3370.
- [11] M. Ferrero and V. Gotor. Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides, and C-nucleosides //Chemical Reviews. – 2000. – Т. 100. – №. 12. – С. 4319-4348.
- [12] I. A. Mikhailopulo and A. I. Miroshnikov. New trends in nucleoside biotechnology //Acta Naturae (англоязычная версия). – 2010. – Т. 2. – №. 2 (5). – С. 36-58.
- [13] S. C. Cosgrove and G. J. Miller. Advances in biocatalytic and chemoenzymatic synthesis of nucleoside analogues //Expert Opinion on Drug Discovery. – 2022. – Т. 17. – №. 4. – С. 355-364. doi: 10.1080/17460441.2022.2039620.
- [14] S. Man, Y. Lu, L. Yin, X. Cheng, and L. Ma. Potential and promising anticancer drugs from adenosine and its analogs //Drug Discovery Today. – 2021. – Т. 26. – №. 6. – С. 1490-1500.
- [15] T. Robak, E. Lech-Maranda, A. Korycka, and E. Robak. Purine nucleoside analogs as immunosuppressive and antineoplastic agents: mechanism of action and clinical activity //Current medicinal chemistry. – 2006. – Т. 13. – №. 26. – С. 3165-3189. doi: 10.2174/092986706778742918.
- [16] P. Robak and T. Robak. Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias //Cancer treatment reviews. – 2013. – Т. 39. – №. 8. – С. 851-861.

- [17] S. K. Vodnala *et al.* Structure–activity relationships of synthetic cordycepin analogues as experimental therapeutics for African trypanosomiasis //Journal of medicinal chemistry. – 2013. – Т. 56. – №. 24. – С. 9861-9873. doi: 10.1021/jm401530a.
- [18] W. B. Parker. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer //Chemical reviews. – 2009. – Т. 109. – №. 7. – С. 2880-2893. doi: 10.1021/cr900028p.
- [19] D. Baker, G. Pryce, S. S. Herrod, and K. Schmierer. Potential mechanisms of action related to the efficacy and safety of cladribine //Multiple Sclerosis and Related Disorders. – 2019. – Т. 30. – С. 176-186. doi: 10.1016/j.msard.2019.02.018.
- [20] E. Beutler. Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) //The Lancet. – 1992. – Т. 340. – №. 8825. – С. 952-956.
- [21] G. Giovannoni. Cladribine to treat relapsing forms of multiple sclerosis //Neurotherapeutics. – 2017. – Т. 14. – №. 4. – С. 874-887. doi: 10.1007/s13311-017-0573-4.
- [22] D. A. Carson, J. Kaye, and J. E. Seegmiller. Lymphospecific toxicity in adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency: possible role of nucleoside kinase (s) //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1977. – Т. 74. – №. 12. – С. 5677-5681. doi: 10.1073/pnas.74.12.5677.
- [23] R. Hirschhorn, V. Levytska, B. Pollara, and H. J. Meuwissen. Evidence for Control of Several Different Tissue-specific Isozymes of Adenosine Deaminase by a le Genetic Locus //Nature New Biology. – 1973. – Т. 246. – №. 155. – С. 200-202.
- [24] G. Cristalli *et al.* Purine and 1-deazapurine ribonucleosides and deoxyribonucleosides: synthesis and biological activity //Journal of medicinal chemistry. – 1991. – Т. 34. – №. 7. – С. 2226-2230. doi: 10.1021/jm00111a044.
- [25] H. Kawasaki, C. J. Carrera, L. D. Piro, A. Saven, T. J. Kipps, and D. A. Carson. Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'-nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine //Blood. – 1993. – Т. 81. – №. 3. – С. 597-601.
- [26] W. B. Parker, A. Bapat, J.-X. Shen, A. J. Townsend, and Y. Cheng. Interaction of 2-halogenated dATP analogs (F, Cl, and Br) with human DNA polymerases, DNA primase, and ribonucleotide reductase //Molecular pharmacology. – 1988. – Т. 34. – №. 4. – С. 485-491.
- [27] S. E. Huff, J. M. Winter, and C. G. Dealwis. Inhibitors of the cancer target ribonucleotide reductase, past and present //Biomolecules. – 2022. – Т. 12. – №. 6. – С. 815.
- [28] S. Wisitpitthaya *et al.* Cladribine and fludarabine nucleotides induce distinct hexamers defining a common mode of reversible RNR inhibition //ACS chemical biology. – 2016. – Т. 11. – №. 7. – С. 2021-2032.
- [29] J. Griffig, R. Koob, and R. L. Blakley. Mechanisms of inhibition of DNA synthesis by 2-chlorodeoxyadenosine in human lymphoblastic cells //Cancer research. – 1989. – Т. 49. – №. 24 Part 1. – С. 6923-6928.
- [30] R. Hermann *et al.* Review of transporter substrate, inhibitor, and inducer characteristics of cladribine //Clinical Pharmacokinetics. – 2021. – Т. 60. – №. 12. – С. 1509-1535. doi: 10.1007/s40262-021-01065-3.
- [31] S. G. Meuth *et al.* Long-term management of multiple sclerosis patients treated with cladribine tablets: an expert opinion //Expert Opinion on Pharmacotherapy. – 2020. – Т. 21. – №. 16. – С. 1965-1969. doi: 10.1080/14656566.2020.1792885.
- [32] Правительство добавило в перечень жизненно необходимых препаратов 22 новых лекарства // «Ведомости» – ведущее деловое издание России. [Электронный ресурс]. 2021. Дата публикации: 24 декабря 2021. URL: <https://www.vedomosti.ru/society/news/2021/12/24/902548-zhiznenno-neobhodimih-preparatov> (дата обращения: 1 октября 2023 г.).
- [33] V. Gandhi and W. Plunkett. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine //Clinical pharmacokinetics. – 2002. – Т. 41. – С. 93-103.
- [34] E. Månsson *et al.* Down-regulation of deoxycytidine kinase in human leukemic cell lines resistant to cladribine and clofarabine and increased ribonucleotide reductase activity

contributes to fludarabine resistance //Biochemical pharmacology. – 2003. – T. 65. – №. 2. – C. 237-247. doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01484-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01484-3).

[35] G. R. Goodman, E. Beutler, and A. Saven. Cladribine in the treatment of hairy-cell leukaemia //Best Practice & Research Clinical Haematology. – 2003. – T. 16. – №. 1. – C. 101-116.

[36] A. Zhenchuk, K. Lotfi, G. Juliusson, and F. Albertioni. Mechanisms of anti-cancer action and pharmacology of clofarabine //Biochemical pharmacology. – 2009. – T. 78. – №. 11. – C. 1351-1359. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.06.094>.

[37] S. Faderl, V. Gandhi, M. J. Keating, S. Jeha, W. Plunkett, and H. M. Kantarjian. The role of Clofarabine in hematologic and solid malignancies—Development of a next-generation nucleoside analog //Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society. – 2005. – T. 103. – №. 10. – C. 1985-1995.

[38] P. L. Bonate, L. Arthaud, W. R. Cantrell, K. Stephenson, J. A. Secrist, and S. Weitman. Discovery and development of clofarabine: a nucleoside analogue for treating cancer //Nature reviews Drug discovery. – 2006. – T. 5. – №. 10. – C. 855-863. doi: 10.1038/nrd2055.

[39] H. M. Kantarjian, S. Jeha, V. Gandhi, M. Wess, and S. Faderl. Clofarabine: past, present, and future //Leukemia & lymphoma. – 2007. – T. 48. – №. 10. – C. 1922-1930. doi: 10.1080/10428190701545644.

[40] W. B. Parker *et al.* Effects of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl) adenine on K562 cellular metabolism and the inhibition of human ribonucleotide reductase and DNA polymerases by its 5'-triphosphate //Cancer research. – 1991. – T. 51. – №. 9. – C. 2386-2394.

[41] K. C. Xie and W. Plunkett. Deoxynucleotide pool depletion and sustained inhibition of ribonucleotide reductase and DNA synthesis after treatment of human lymphoblastoid cells with 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl) adenine //Cancer research. – 1996. – T. 56. – №. 13. – C. 3030-3037.

[42] C. Xie and W. Plunkett. Metabolism and actions of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-adenine in human lymphoblastoid cells //Cancer research. – 1995. – T. 55. – №. 13. – C. 2847-2852.

[43] H. M. Kantarjian *et al.* Phase I clinical and pharmacology study of clofarabine in patients with solid and hematologic cancers //Journal of Clinical Oncology. – 2003. – T. 21. – №. 6. – C. 1167-1173. doi: 10.1200/JCO.2003.04.031.

[44] M. S. Drenichev, V. E. Oslovsky, and S. N. Mikhailov. Cytokinin Nucleosides—Natural compounds with a unique spectrum of biological activities //Current topics in medicinal chemistry. – 2016. – T. 16. – №. 23. – C. 2562-2576. doi: 10.2174/1568026616666160414123717.

[45] B. C. Persson, B. Esberg, Ó. Ólafsson, and G. R. Björk. Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA //Biochimie. – 1994. – T. 76. – №. 12. – C. 1152-1160. doi: [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90044-2).

[46] M. H. Fleysler, A. Bloch, M. T. Hakala, and C. A. Nichol. Synthesis and biological activity of some new N6-substituted purine nucleosides //Journal of Medicinal Chemistry. – 1969. – T. 12. – №. 6. – C. 1056-1061. doi: 10.1021/jm00306a021.

[47] J. Voller *et al.* The natural cytokinin 2OH3MeOBAR induces cell death by a mechanism that is different from that of the “classical” cytokinin ribosides //Phytochemistry. – 2017. – T. 136. – C. 156-164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.004>.

[48] A. Mittelman, J. T. Evans, and G. B. Chheda. Cytokinins as chemotherapeutic agents //Annals of the New York Academy of Sciences. – 1975. – T. 255. – №. 1. – C. 225-234.

[49] J. Voller *et al.* Anticancer activity of natural cytokinins: A structure–activity relationship study //Phytochemistry. – 2010. – T. 71. – №. 11-12. – C. 1350-1359.

[50] M. Bifulco, A. M. Malfitano, M. C. Proto, A. Santoro, M. G. Caruso, and C. Laezza. Biological and pharmacological roles of N6-isopentenyladenosine: an emerging

anticancer drug //Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). – 2008. – T. 8. – №. 2. – C. 200-204.

[51] M. Rajabi, J. Mehrzad, E. Gorincioi, and E. Santaniello. Antiproliferative activity of N⁶-isopentenyladenosine on HCT-15 colon carcinoma cell line //Nucleic Acid Therapeutics. – 2011. – T. 21. – №. 5. – C. 355-358.

[52] P. Mlejnek and P. Doležel. Apoptosis induced by N⁶-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells //Toxicology in vitro. – 2005. – T. 19. – №. 7. – C. 985-990.

[53] M. H. Fleysher, R. J. Bernacki, and G. A. Bullard. Some short-chain N⁶-substituted adenosine analogs with antitumor properties //Journal of medicinal chemistry. – 1980. – T. 23. – №. 12. – C. 1448-1452. doi: 10.1021/jm00186a031.

[54] T. Béres *et al.* Tandem mass spectrometry identification and LC–MS quantification of intact cytokinin nucleotides in K-562 human leukemia cells //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2010. – T. 398. – C. 2071-2080.

[55] J. Voller *et al.* Anti-cancer activities of cytokinin ribosides //Phytochemistry Reviews. – 2019. – T. 18. – C. 1101-1113. doi: 10.1007/s11101-019-09620-4.

[56] C. Laezza *et al.* N⁶-isopentenyladenosine inhibits cell proliferation and induces apoptosis in a human colon cancer cell line DLD1 //International journal of cancer. – 2009. – T. 124. – №. 6. – C. 1322-1329.

[57] F. Colombo *et al.* Pharmacogenomics and analogues of the antitumour agent N⁶-isopentenyladenosine //International journal of cancer. – 2009. – T. 124. – №. 9. – C. 2179-2185.

[58] J. M. Lowenstein, Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle //Physiological reviews. – 1972. – T. 52. – №. 2. – C. 382-414. doi: 10.1152/physrev.1972.52.2.382.

[59] J. Jaeken *et al.*, Adenylosuccinase deficiency: an inborn error of purine nucleotide synthesis //European journal of pediatrics. – 1988. – T. 148. – C. 126-131. doi: 10.1007/bf00445919.

[60] D. N. Ward, J. Wade, E. F. Walborg, and T. S. Osdene. The synthesis of N-(6-Purinyloxy) amino acids. amino acids with a single reactive amino group^{1a} //The Journal of Organic Chemistry. – 1961. – T. 26. – №. 12. – C. 5000-5005. doi: 10.1021/jo01070a054.

[61] V. P. Krasnov *et al.* Synthesis and antimycobacterial activity of N-(2-aminopurin-6-yl) and N-(purin-6-yl) amino acids and dipeptides //Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2016. – T. 26. – №. 11. – C. 2645-2648. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.04.017.

[62] V. V. Musiyak *et al.* Synthesis and antimycobacterial activity of purine conjugates with (S)-lysine and (S)-ornithine //Mendeleev Communications. – 2019. – T. 29. – №. 1. – C. 11-13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.01.002>.

[63] V. P. Krasnov *et al.* Synthesis of enantiomers of N-(2-aminopurin-6-yl) amino acids //Russian Chemical Bulletin. – 2015. – T. 64. – C. 2106-2113. doi: 10.1007/s11172-015-1125-x.

[64] V. V. Musiyak *et al.* Stereochemical aspects in the synthesis of novel N-(purin-6-yl) dipeptides as potential antimycobacterial agents //Amino Acids. – 2021. – T. 53. – №. 3. – C. 407-415.

[65] D. S. Letham and H. Young, Letham D. S., Young H. The synthesis and cytokinin activities of N-(purin-6-yl) amino acids //Phytochemistry. – 1971. – T. 10. – №. 1. – C. 23-28. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90246-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90246-2).

[66] S. Matsubara, T. Fujii, and T. Nishitani. Cytokinin Activities of N-(Purin-6-yl) amino Acids, N-(Purin-6-yl) peptides and Related Compounds (A. NATURAL SCIENCE) //The scientific reports of the Kyoto Prefectural University. Natural science and living science. – 1988. – T. 39. – C. 1-6.

[67] H. Iwamura, M. Yada, K. Koshimizu, and S. Matsubara. Synthesis and comparative cytokinin activities of N-(Purin-6-yl)-d-and-l-amino acid methyl esters

//Agricultural and Biological Chemistry. – 1978. – T. 42. – №. 5. – С. 1009-1014. doi: 10.1080/00021369.1978.10863099.

[68] H.-Y. Niu, S.-X. Bai, S. Wu, G.-R. Qu, and H.-M. Guo. Synthesis of Chiral N-(Purin-6-yl) amino Acid Derivatives by using Natural Amino Acids as Starting Materials //Asian Journal of Organic Chemistry. – 2012. – T. 1. – №. 3. – С. 238-244. doi: 10.1002/ajoc.201200081.

[69] D. Cīrule, K. Ozols, O. Platnieks, Ē. Bizdēna, I. Māliņa, and M. Turks. Synthesis of purine nucleoside—amino acid conjugates and their photophysical properties //Tetrahedron. – 2016. – T. 72. – №. 29. – С. 4177-4185. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.05.043>.

[70] P. Shende and K. Vyas. A work on synthesis and characterization of novel purine amino acid derivatives with antimicrobial evaluation //Eur. J. Biomed. Pharm. Sci. – 2017. – T. 4. – С. 735-743.

[71] M. Tuncbilek, A. Kucukdumlu, E. B. Guven, D. Altiparmak, and R. Cetin-Atalay. Synthesis of novel 6-substituted amino-9-(β-d-ribofuranosyl) purine analogs and their bioactivities on human epithelial cancer cells //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2018. – T. 28. – №. 3. – С. 235-239. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.12.070.

[72] Е. Шубникова, Т. Букатина, Н. Вельц, Д. Каперко, Г. Кутехова. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа: новые риски нового класса противоопухолевых средств //Безопасность и риск фармакотерапии. – 2020. – Т. 8. – №. 1. – С. 9-22.

[73] P. Darvin, S. M. Toor, V. Sasidharan Nair, and E. Elkord. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers //Experimental & molecular medicine. – 2018. – T. 50. – №. 12. – С. 1-11.

[74] R. J. Walsh, R. Sundar, and J. S. J. Lim. Immune checkpoint inhibitor combinations—current and emerging strategies //British Journal of Cancer. – 2023. – T. 128. – №. 8. – С. 1415-1417. doi: 10.1038/s41416-023-02181-6.

[75] R. Offringa, L. Kötzner, B. Huck, and K. Urbahns. The expanding role for small molecules in immuno-oncology //Nature Reviews Drug Discovery. – 2022. – T. 21. – №. 11. – С. 821-840.

[76] Q. Zhou *et al.* Immunotherapy strategy targeting programmed cell death ligand 1 and CD73 with macrophage-derived mimetic nanovesicles to treat bladder cancer //Molecular Pharmaceutics. – 2021. – T. 18. – №. 11. – С. 4015-4028.

[77] J. L. Jeffrey, K. V. Lawson, and J. P. Powers. Targeting metabolism of extracellular nucleotides via inhibition of ectonucleotidases CD73 and CD39 //Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – T. 63. – №. 22. – С. 13444-13465.

[78] C. Xia, S. Yin, K. K. To, and L. Fu. CD39/CD73/A_{2A}R pathway and cancer immunotherapy //Molecular Cancer. – 2023. – T. 22. – №. 1. – С. 1-17.

[79] M. Zhang, X. Dai, Y. Xiang, L. Xie, M. Sun, and J. Shi. Advances in CD73 inhibitors for immunotherapy: Antibodies, synthetic small molecule compounds, and natural compounds //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – С. 115546.

[80] N. Bach, R. Winzer, E. Tolosa, W. Fiedler, and F. Brauneck. The Clinical Significance of CD73 in Cancer //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – T. 24. – №. 14. – С. 11759.

[81] G. M. das Neves, L. P. Kagami, A. M. O. Battastini, F. Figueiró, and V. L. Eifler-Lima. Targeting ecto-5'-nucleotidase: A comprehensive review into small molecule inhibitors and expression modulators //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – T. 247. – С. 115052.

[82] K. V. Lawson *et al.* Discovery of AB680: a potent and selective inhibitor of CD73 //Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – T. 63. – №. 20. – С. 11448-11468.

[83] D. Piovesan *et al.* Targeting CD73 with AB680 (quemliclustat), a novel and potent small-molecule CD73 inhibitor, restores immune functionality and facilitates antitumor immunity //Molecular Cancer Therapeutics. – 2022. – T. 21. – №. 6. – С. 948-959.

- [84] J. C. Bendell *et al.* A phase I study to evaluate the safety and tolerability of AB680 combination therapy in participants with gastrointestinal malignancies. – 2020. doi: 10.1200/JCO.2020.38.4_suppl.TPS788.
- [85] X. Du *et al.* Orally bioavailable small-molecule CD73 inhibitor (OP-5244) reverses immunosuppression through blockade of adenosine production //Journal of medicinal chemistry. – 2020. – T. 63. – №. 18. – C. 10433-10459. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01086.
- [86] J. Zhang, Y. Zhang, B. Qu, H. Yang, S. Hu, and X. Dong. If small molecules immunotherapy comes, can the prime be far behind? //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – T. 218. – C. 113356. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113356>.
- [87] B. B. Fredholm, I. J. AP, K. A. Jacobson, K. N. Klotz, and J. Linden. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors //Pharmacological reviews. – 2001. – T. 53. – №. 4. – C. 527-552.
- [88] J. Linden. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration //Molecular pharmacology. – 2005. – T. 67. – №. 5. – C. 1385-1387. doi: 10.1124/mol.105.011783.
- [89] G. J. Zoghbi and A. E. Iskandrian. Selective adenosine agonists and myocardial perfusion imaging //Journal of nuclear cardiology. – 2012. – T. 19. – C. 126-141. doi: 10.1007/s12350-011-9474-9.
- [90] Z.-G. Gao and K. A. Jacobson. Emerging adenosine receptor agonists //Expert opinion on emerging drugs. – 2007. – T. 12. – №. 3. – C. 479-492.
- [91] A. Kalda, L. Yu, E. Oztas, and J.-F. Chen. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease //Journal of the neurological sciences. – 2006. – T. 248. – №. 1-2. – C. 9-15.
- [92] Y.-J. Liu *et al.* Research progress on adenosine in central nervous system diseases //CNS neuroscience & therapeutics. – 2019. – T. 25. – №. 9. – C. 899-910. doi: <https://doi.org/10.1111/cns.13190>.
- [93] M. A. Costa *et al.* On the role of subtype selective adenosine receptor agonists during proliferation and osteogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells //Journal of cellular physiology. – 2011. – T. 226. – №. 5. – C. 1353-1366. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.22458>.
- [94] P. A. Borea *et al.* The A3 adenosine receptor: history and perspectives //Pharmacological reviews. – 2015. – T. 67. – №. 1. – C. 74-102. doi: 10.1124/pr.113.008540.
- [95] S. Gessi *et al.* Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A3 adenosine subtype //Journal of cellular physiology. – 2007. – T. 211. – №. 3. – C. 826-836. doi: 10.1002/jcp.20994.
- [96] L. Madi *et al.* The A₃ adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition //Clinical Cancer Research. – 2004. – T. 10. – №. 13. – C. 4472-4479. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0651.
- [97] K. A. Jacobson and Z. G. Gao. Adenosine receptors as therapeutic targets //Nature reviews Drug discovery. – 2006. – T. 5. – №. 3. – C. 247-264. doi: 10.1038/nrd1983.
- [98] I. J. AP, K. A. Jacobson, C. E. Müller, B. N. Cronstein, and R. A. Cunha. International union of basic and clinical pharmacology. CXII: adenosine receptors: a further update //Pharmacological reviews. – 2022. – T. 74. – №. 2. – C. 340-372. doi: 10.1124/pharmrev.121.000445.
- [99] L. Aurelio *et al.* A Structure–Activity Relationship Study of Bitopic N 6-Substituted Adenosine Derivatives as Biased Adenosine A₁ Receptor Agonists //Journal of medicinal chemistry. – 2018. – T. 61. – №. 5. – C. 2087-2103. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00047.
- [100] K. A. Jacobson *et al.* Structure-guided drug design for adenosine and P2Y receptors //Computational and Structural Biotechnology Journal. – 2015. – T. 13. – C. 286-298. doi: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.10.004>.
- [101] R. A. Laskowski and M. B. Swindells. LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. – 2011. doi: 10.1021/ci200227u.

- [102] M. J. Lohse, K. N. Klotz, U. Schwabe, G. Cristalli, S. Vittori, and M. Grifantini. 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A₁ adenosine receptors //Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. – 1988. – T. 337. – C. 687-689. doi: 10.1007/bf00175797.
- [103] K.-N. Klotz *et al.* Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes—characterization of stably transfected receptors in CHO cells //Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. – 1997. – T. 357. – C. 1-9.
- [104] P. Fabera *et al.* Adenosine A₁ Receptor Agonist 2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosine and Hippocampal Excitability During Brain Development in Rats //Frontiers in Pharmacology. – 2019. – T. 10. – C. 656.
- [105] K. A. Jacobson, D. K. Tosh, S. Jain, and Z.-G. Gao. Historical and current adenosine receptor agonists in preclinical and clinical development //Frontiers in cellular neuroscience. – 2019. – C. 124.
- [106] K. O. Elkholy, O. Hegazy, A. Okunade, S. Aktas, and T. Ajibawo. Regadenoson stress testing: a comprehensive review with a focused update //Cureus. – 2021. – T. 13. – №. 1.
- [107] S. Ferré and F. Ciruela. Functional and neuroprotective role of striatal adenosine A_{2A} receptor heterotetramers //Journal of Caffeine and Adenosine Research. – 2019. – T. 9. – №. 3. – C. 89-97.
- [108] M. A. Schwarzschild, L. Agnati, K. Fuxe, J.-F. Chen, and M. Morelli. Targeting adenosine A_{2A} receptors in Parkinson's disease //Trends in neurosciences. – 2006. – T. 29. – №. 11. – C. 647-654.
- [109] J.-F. Chen and R. A. Cunha. The belated US FDA approval of the adenosine A_{2A} receptor antagonist istradefylline for treatment of Parkinson's disease //Purinergic signalling. – 2020. – T. 16. – C. 167-174.
- [110] G. R. Milne and T. M. Palmer. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A_{2A} adenosine receptor //The Scientific World Journal. – 2011. – T. 11. – C. 320-339. doi: 10.1100/tsw.2011.22.
- [111] Z.-G. Gao and K. A. Jacobson. A_{2B} adenosine receptor and cancer //International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – №. 20. – C. 5139.
- [112] L. Seitz *et al.* Safety, tolerability, and pharmacology of AB928, a novel dual adenosine receptor antagonist, in a randomized, phase 1 study in healthy volunteers //Investigational New Drugs. – 2019. – T. 37. – №. 4. – C. 711-721.
- [113] S. K. Subudhi *et al.* ARC-6: A phase 1b/2, open-label, randomized platform study to evaluate efficacy and safety of etrumadenant (AB928)-based treatment combinations in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC). – 2021.
- [114] P. G. Baraldi, D. Preti, P. A. Borea, and K. Varani. Medicinal chemistry of A₃ adenosine receptor modulators: pharmacological activities and therapeutic implications //Journal of medicinal chemistry. – 2012. – T. 55. – №. 12. – C. 5676-5703.
- [115] P. Fishman. Drugs targeting the A₃ adenosine receptor: human clinical study data //Molecules. – 2022. – T. 27. – №. 12. – C. 3680.
- [116] S. L. Cheong *et al.* The A₃ adenosine receptor as multifaceted therapeutic target: pharmacology, medicinal chemistry, and in silico approaches //Medicinal Research Reviews. – 2013. – T. 33. – №. 2. – C. 235-335.
- [117] E. W. van Tilburg *et al.* 5'-O-alkyl ethers of N, 2-substituted adenosine derivatives: partial agonists for the adenosine A₁ and A₃ receptors //Journal of medicinal chemistry. – 2001. – T. 44. – №. 18. – C. 2966-2975. doi: 10.1021/jm001114o.
- [118] Z.-G. Gao *et al.* Structural determinants of A₃ adenosine receptor activation: nucleoside ligands at the agonist/antagonist boundary //Journal of medicinal chemistry. – 2002. – T. 45. – №. 20. – C. 4471-4484. doi: 10.1021/jm020211+.
- [119] Z.-g. Gao and K. A. Jacobson. 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosine, adenosine A₁ receptor agonist, antagonizes the adenosine A₃ receptor //European journal of pharmacology. – 2002. – T. 443. – №. 1-3. – C. 39-42. doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01552-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01552-2).

- [120] K. A. Jacobson, S. Moro, Y.-C. Kim, and A.-H. Li, A₃ adenosine receptors: protective vs. damaging effects identified using novel agonists and antagonists //Drug development research. – 1998. – T. 45. – №. 3-4. – C. 113-124. doi: 10.1002/(SICI)1098-2299(199811/12)45:3/4<113::AID-DDR5>3.0.CO;2-S.
- [121] S. Bar-Yehuda *et al.* The A₃ adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF- κ B signal transduction pathways //International journal of oncology. – 2008. – T. 33. – №. 2. – C. 287-295.
- [122] P. Fishman, S. Bar-Yehuda, F. Barer, L. Madi, A. S. Multani, and S. Pathak. The A₃ adenosine receptor as a new target for cancer therapy and chemoprotection //Experimental cell research. – 2001. – T. 269. – №. 2. – C. 230-236. doi: <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5327>.
- [123] S. Bar-Yehuda *et al.* Agonists to the A₃ adenosine receptor induce G-CSF production via NF- κ B activation: a new class of myeloprotective agents //Experimental hematology. – 2002. – T. 30. – №. 12. – C. 1390-1398.
- [124] S. M. Stemmer *et al.* CF102 for the treatment of hepatocellular carcinoma: a phase I/II, open-label, dose-escalation study //The oncologist. – 2013. – T. 18. – №. 1. – C. 25-26.
- [125] R. M. Stoilov *et al.* Therapeutic effect of oral CF101 in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study //Immunome Res. – 2014. – T. 11. – №. 1. – C. 1-6.
- [126] S. Morello *et al.* Cl-IB-MECA inhibits human thyroid cancer cell proliferation independently of A₃ adenosine receptor activation //Cancer biology & therapy. – 2008. – T. 7. – №. 2. – C. 278-284. doi: 10.4161/cbt.7.2.5301.
- [127] S. G. Kim *et al.* p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, Cl-IB-MECA //Biochemical pharmacology. – 2002. – T. 63. – №. 5. – C. 871-880.
- [128] J. Lu, A. Pierron, and K. Ravid. An adenosine analogue, IB-MECA, down-regulates estrogen receptor α and suppresses human breast cancer cell proliferation //Cancer research. – 2003. – T. 63. – №. 19. – C. 6413-6423.
- [129] P. Fishman *et al.* Adenosine receptors and cancer //Adenosine Receptors in Health and Disease. – 2009. – C. 399-441. doi: 10.1007/978-3-540-89615-9_14.
- [130] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, and Y. Tor. Fluorescent analogs of biomolecular building blocks: design, properties, and applications //Chemical reviews. – 2010. – T. 110. – №. 5. – C. 2579-2619. doi: 10.1021/cr900301e.
- [131] I. Novosjolova, Ē. Bizdēna, and M. Turks. Synthesis and applications of azolypurine and azolypurine nucleoside derivatives //European Journal of Organic Chemistry. – 2015. – T. 2015. – №. 17. – C. 3629-3649.
- [132] A. Matarazzo and R. H. E. Hudson. Fluorescent adenosine analogs: a comprehensive survey //Tetrahedron. – 2015. – T. 71. – №. 11. – C. 1627-1657. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.12.066>.
- [133] Y.-F. Wei, Y. Wang, X.-R. Wei, R. Sun, Y.-J. Xu, and J.-F. Ge. Adenine-based small molecule fluorescent probe for imaging mitochondrial nucleic acid //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2020. – T. 229. – C. 117865. doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117865>.
- [134] D. Ward, E. Reich, and L. Stryer. Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides: I. Formycin, 2-aminopurine riboside, 2, 6-diaminopurine riboside, and their derivatives //Journal of Biological Chemistry. – 1969. – T. 244. – №. 5. – C. 1228-1237.
- [135] L. M. Wilhelmsson. Fluorescent nucleic acid base analogues //Quarterly reviews of biophysics. – 2010. – T. 43. – №. 2. – C. 159-183.
- [136] T. M. Nordlund, S. Andersson, L. Nilsson, R. Rigler, A. Gräslund, and L. McLaughlin. Structure and dynamics of a fluorescent DNA oligomer containing the EcoRI

recognition sequence: fluorescence, molecular dynamics, and NMR studies //Biochemistry. – 1989. – T. 28. – №. 23. – C. 9095-9103.

[137] R. S. Butler, A. K. Myers, P. Bellarmine, K. A. Abboud, and R. K. Castellano. Highly fluorescent donor–acceptor purines //Journal of Materials Chemistry. – 2007. – T. 17. – №. 19. – C. 1863-1865.

[138] R. S. Butler, P. Cohn, P. Tenzel, K. A. Abboud, and R. K. Castellano. Synthesis, photophysical behavior, and electronic structure of push–pull purines //Journal of the American Chemical Society. – 2009. – T. 131. – №. 2. – C. 623-633.

[139] C. Dyrager *et al.* Synthesis and Photophysical Characterisation of Fluorescent 8-(1H-1,2,3-Triazol-4-yl)adenosine Derivatives //European Journal of Organic Chemistry. – 2009. – C. 1515-1521. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900018>.

[140] T. Efthymiou, W. Gong, and J.-P. Desaulniers. Chemical architecture and applications of nucleic acid derivatives containing 1, 2, 3-triazole functionalities synthesized via click chemistry //Molecules. – 2012. – T. 17. – №. 11. – C. 12665-12703.

[141] D. Baraniak and J. Boryski. Triazole-modified nucleic acids for the application in bioorganic and medicinal chemistry //Biomedicines. – 2021. – T. 9. – №. 6. – C. 628.

[142] C. Atdjian, D. Coelho, L. Iannazzo, M. Ethève-Quelquejeu, and E. Braud. Synthesis of triazole-linked SAM-Adenosine conjugates: functionalization of adenosine at N-1 or N-6 position without protecting groups //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 14. – C. 3241.

[143] R. Ghoteimi *et al.* 4-Substituted-1, 2, 3-triazolo nucleotide analogues as CD73 inhibitors, their synthesis, in vitro screening, kinetic and in silico studies //Bioorganic Chemistry. – 2021. – T. 107. – C. 104577. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104577>.

[144] K. Bozorov, J. Zhao, and H. A. Aisa. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2019. – T. 27. – №. 16. – C. 3511-3531. doi: [10.1016/j.bmc.2019.07.005](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.005).

[145] L. Cosyn *et al.* 2-Triazole-substituted adenosines: a new class of selective A3 adenosine receptor agonists, partial agonists, and antagonists //Journal of medicinal chemistry. – 2006. – T. 49. – №. 25. – C. 7373-7383. doi: [10.1021/jm0608208](https://doi.org/10.1021/jm0608208).

[146] A. Kovaļovs *et al.* 1,2,3-Triazoles as leaving groups in purine chemistry: a three-step synthesis of N6-substituted-2-triazolyl-adenine nucleosides and photophysical properties thereof //Tetrahedron Letters. – 2013. – T. 54. – №. 8. – C. 850-853.

[147] M. K. Lakshman *et al.* Synthesis and biological properties of C-2 triazolylinosine derivatives //The Journal of organic chemistry. – 2012. – T. 77. – №. 14. – C. 5870-5883.

[148] S. C. Mathew *et al.* Expeditious synthesis and biological evaluation of new C-6 1, 2, 3-triazole adenosine derivatives A1 receptor antagonists or agonists //Organic & Biomolecular Chemistry. – 2010. – T. 8. – №. 17. – C. 3874-3881. doi: [10.1039/C0OB00017E](https://doi.org/10.1039/C0OB00017E).

[149] M. K. Lakshman, M. K. Singh, D. Parrish, R. Balachandran, and B. W. Day. Azide–Tetrazole equilibrium of c-6 azidopurine nucleosides and their ligation reactions with alkynes //The Journal of organic chemistry. – 2010. – T. 75. – №. 8. – C. 2461-2473. doi: [10.1021/jo902342z](https://doi.org/10.1021/jo902342z).

[150] J. Zayas *et al.* Strain promoted click chemistry of 2-or 8-azidopurine and 5-azidopyrimidine nucleosides and 8-azidoadenosine triphosphate with cyclooctynes. Application to living cell fluorescent imaging //Bioconjugate chemistry. – 2015. – T. 26. – №. 8. – C. 1519-1532. doi: [10.1021/acs.bioconjchem.5b00300](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00300).

[151] K. Ozols *et al.* Development of N⁶-methyl-2-(1,2,3-triazol-1-yl)-2'-deoxyadenosine as a novel fluorophore and its application in nucleotide synthesis //Tetrahedron Letters. – 2016. – T. 57. – №. 10. – C. 1174-1178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.02.003>.

[152] A. Burcevs *et al.* Synthesis of Fluorescent C–C Bonded Triazole-Purine Conjugates //Journal of Fluorescence. – 2023. – C. 1-7.

- [153] Z. Wen *et al.* Fluorescent 5-pyrimidine and 8-purine nucleosides modified with an N-unsubstituted 1, 2, 3-triazol-4-yl moiety //The Journal of organic chemistry. – 2019. – T. 84. – №. 6. – C. 3624-3631. doi: 10.1021/acs.joc.8b03135.
- [154] A. Dierckx *et al.* Characterization of photophysical and base-mimicking properties of a novel fluorescent adenine analogue in DNA //Nucleic acids research. – 2011. – T. 39. – №. 10. – C. 4513-4524.
- [155] R. W. Balsiger and J. A. Montgomery. Synthesis of Potential Anticancer Agents. XXV. Preparation of 6-Alkoxy-2-aminopurines² //The Journal of Organic Chemistry. – 1960. – T. 25. – №. 9. – C. 1573-1575. doi: 10.1021/jo01079a026.
- [156] J. A. Montgomery and C. Temple, Jr. Synthesis of Potential Anticancer Agents. XXIII. 9-Aminohypoxanthine and Related Compounds //Journal of the American Chemical Society. – 1960. – T. 82. – №. 17. – C. 4592-4596. doi: 10.1021/ja01502a037.
- [157] J. A. Montgomery and K. Hewson. Synthesis of Potential Anticancer Agents. XX. 2-Fluoropurines² //Journal of the American Chemical Society. – 1960. – T. 82. – №. 2. – C. 463-468. doi: 10.1021/ja01487a055.
- [158] R. K. Robins. "A NEW SYNTHESIS OF CHLOROPURINE RIBONUCLEOSIDES¹ //Journal of the American Chemical Society. – 1960. – T. 82. – №. 10. – C. 2654-2655. doi: 10.1021/ja01495a076.
- [159] R. E. Holmes and R. K. Robins. Purine nucleosides. VII. Direct bromination of adenosine, deoxyadenosine, guanosine, and related purine nucleosides //Journal of the American Chemical Society. – 1964. – T. 86. – №. 6. – C. 1242-1245. doi: 10.1021/ja01060a057.
- [160] R. A. Long, R. K. Robins, and L. B. Townsend. Purine nucleosides. XV. Synthesis of 8-amino-and 8-substituted aminopurine nucleosides //The Journal of organic chemistry. – 1967. – T. 32. – №. 9. – C. 2751-2756. doi: 10.1021/jo01284a024.
- [161] J. F. Gerster and R. K. Robins, Purine Nucleosides. XIII. The Synthesis of 2-Fluoro-and 2-Chloroinosine and Certain Derived Purine Nucleosides¹. //The Journal of organic chemistry. – 1966. – T. 31. – №. 10. – C. 3258-3262. doi: 10.1021/jo01348a037.
- [162] J. F. Gerster, J. W. Jones, and R. K. Robins. Purine Nucleosides. IV. The Synthesis of 6-Halogenated 9-β-D-Ribofuranosylpurines from Inosine and Guanosine¹ //The Journal of Organic Chemistry. – 1963. – T. 28. – №. 4. – C. 945-948. doi: 10.1021/jo01039a016.
- [163] J. Liliemark. The clinical pharmacokinetics of cladribine //Clinical pharmacokinetics. – 1997. – T. 32. – №. 2. – C. 120-131. doi: 10.2165/00003088-199732020-00003.
- [164] M. H. Fleysler, M. T. Hakala, A. Bloch, and R. H. Hall. Synthesis and biological activity of some N6-alkyladenosines //Journal of medicinal chemistry. – 1968. – T. 11. – №. 4. – C. 717-720. doi: 10.1021/jm00310a018.
- [165] M. Hocek, P. Šilhár, I. h. Shih, E. Mabery, and R. Mackman. Cytostatic and antiviral 6-aryluracil ribonucleosides. Part 7: Synthesis and evaluation of 6-substituted purine L-ribonucleosides //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2006. – T. 16. – №. 20. – C. 5290-5293. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.07.092>.
- [166] A. Link, P. Heidler, M. Kaiser, and R. Brun. Synthesis of a series of N6-substituted adenosines with activity against trypanosomatid parasites //European journal of medicinal chemistry. – 2009. – T. 44. – №. 9. – C. 3665-3671. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.02.010>.
- [167] R. Ottria *et al.* Synthesis and evaluation of in vitro anticancer activity of some novel isopentenyladenosine derivatives //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2010. – T. 18. – №. 12. – C. 4249-4254. doi: 10.1016/j.bmc.2010.04.093.
- [168] P. Šilhár *et al.* Synthesis, cytostatic and anti-HCV activity of 6-(N-substituted aminomethyl)-, 6-(O-substituted hydroxymethyl)-and 6-(S-substituted sulfanylmethyl) purine nucleosides //Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2008. – T. 16. – №. 5. – C. 2329-2366. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.11.067>.

- [169] K. Too, D. M. Brown, E. Bongard, V. Yardley, L. Vivas, and D. Loakes. Antimalarial activity of N⁶-modified purine analogues //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2007. – T. 15. – №. 16. – C. 5551-5562. doi: 10.1016/j.bmc.2007.05.038.
- [170] L. J. S. Knutsen *et al.* N-substituted adenosines as novel neuroprotective A1 agonists with diminished hypotensive effects //Journal of medicinal chemistry. – 1999. – T. 42. – №. 18. – C. 3463-3477. doi: 10.1021/jm960682u.
- [171] G. Cristalli, M. Grifantini, S. Vittori, K.-N. Klotz, and M. J. Lohse. Synthesis of 2-Azido-(R)-N⁶-p-hydroxyphenylisopropyladenosine (R-AHPIA) as Potential Photoaffinity Probe for A1 Adenosine Receptors //Nucleosides & Nucleotides. – 1986. – T. 5. – №. 2. – C. 213-222. doi: 10.1080/07328318608068674.
- [172] P. C. Srivastava, R. K. Robins, and R. B. Meyer Jr. Synthesis and properties of purine nucleosides and nucleotides //Chemistry of Nucleosides and Nucleotides: Volume 1. – Boston, MA : Springer US, 1988. – C. 113-281.
- [173] X. Lin and M. J. Robins. Mild and Efficient Functionalization at C6 of Purine 2'-Deoxynucleosides and Ribonucleosides¹ //Organic Letters. – 2000. – T. 2. – №. 22. – C. 3497-3499. doi: 10.1021/ol000255h.
- [174] Z. Janeba, X. Lin, and M. J. Robins. Functionalization of guanosine and 2'-deoxyguanosine at C6: A modified Appel process and S_NAr displacement of imidazole //Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. – 2004. – T. 23. – №. 1-2. – C. 137-147. doi: 10.1081/NCN-120027823.
- [175] I. Novosjolova, Ē. Bizdēna, and M. Turks. Synthesis of novel 2- and 6-alkyl/arylthiopurine derivatives //Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. – 2015. – T. 190. – №. 8. – C. 1236-1241. doi: 10.1080/10426507.2014.989435.
- [176] H. W. Zhang *et al.* Synthesis and evaluation of 3'-azido-2', 3'-dideoxypurine nucleosides as inhibitors of human immunodeficiency virus //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2010. – T. 20. – №. 1. – C. 60-64. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.11.031.
- [177] S. Sakata, S. Yonei, and H. Yoshino. Synthesis of 2-Substituted 6-Methyl-9-β-D-ribofuranosylpurines //Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1982. – T. 30. – №. 7. – C. 2583-2585.
- [178] P. K. Bridson, W. T. Markiewicz, and C. B. Reese. Acylation of 2', 3', 5'-tri-O-acetylguanosine //Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. – 1977. – №. 21. – C. 791-792. doi: 10.1039/C39770000791.
- [179] M. K. Lakshman, F. N. Ngassa, J. C. Keeler, Y. Q. V. Dinh, J. H. Hilmer, and L. M. Russon. Facile Synthesis of O⁶-Alkyl-, O⁶-Aryl-, and Diaminopurine Nucleosides from 2'-Deoxyguanosine //Organic letters. – 2000. – T. 2. – №. 7. – C. 927-930. doi: 10.1021/ol005564m.
- [180] J. Liu and M. J. Robins. S_NAr Displacements with 6-(Fluoro, Chloro, Bromo, Iodo, and Alkylsulfonyl) purine Nucleosides: Synthesis, Kinetics, and Mechanism¹ //Journal of the American Chemical Society. – 2007. – T. 129. – №. 18. – C. 5962-5968. doi: 10.1021/ja070021u.
- [181] E. A. Véliz and P. A. Beal. 6-Bromopurine nucleosides as reagents for nucleoside analogue synthesis //The Journal of Organic Chemistry. – 2001. – T. 66. – №. 25. – C. 8592-8598. doi: 10.1021/jo016078v.
- [182] J. F. Bunnett and R. E. Zahler. Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions //Chemical Reviews. – 1951. – T. 49. – №. 2. – C. 273-412. doi: 10.1021/cr60153a002.
- [183] J. Liu and M. J. Robins. Fluoro, Alkylsulfonyl, and Alkylsulfonyl Leaving Groups in Suzuki Cross-Coupling Reactions of Purine 2'-Deoxynucleosides and Nucleosides //Organic Letters. – 2005. – T. 7. – №. 6. – C. 1149-1151. doi: 10.1021/ol050063s.
- [184] H. J. Whitfield *et al.* Facilitation of addition-elimination reactions in pyrimidines and purines using trifluoroacetic acid in trifluoroethanol //Chemical communications. – 2003. – №. 22. – C. 2802-2803. doi: 10.1039/B308948G.

- [185] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, and Y. Saito. Palladium-assisted routes to nucleosides //Chemical reviews. – 2003. – T. 103. – №. 5. – C. 1875-1916. doi: 10.1021/cr010374q.
- [186] M. Hocek, A. Holý, I. Votruba, and H. Dvořáková. Synthesis and cytostatic activity of substituted 6-phenylpurine bases and nucleosides: application of the Suzuki– Miyaura cross-coupling reactions of 6-chloropurine derivatives with phenylboronic acids //Journal of Medicinal Chemistry. – 2000. – T. 43. – №. 9. – C. 1817-1825. doi: 10.1021/jm991167+.
- [187] H. Ren, H. An, P. J. Hatala, W. C. Stevens, J. Tao, and B. He. Versatile synthesis and biological evaluation of novel 3'-fluorinated purine nucleosides //Beilstein Journal of Organic Chemistry. – 2015. – T. 11. – №. 1. – C. 2509-2520. doi: 10.3762/bjoc.11.272.
- [188] S. Koyama, Z. Kumazawa, and N. Kashimura. Synthesis of 6-and 8-alkynylated purines and their ribonucleosides by the coupling of halopurines with alkynes //Nucleic Acids Symposium Series. – 1982. – №. 11. – C. 41-44.
- [189] A. E. A. Hassan *et al.* Synthesis and evaluation of the substrate activity of C-6 substituted purine ribosides with E. coli purine nucleoside phosphorylase: Palladium mediated cross-coupling of organozinc halides with 6-chloropurine nucleosides //European journal of medicinal chemistry. – 2012. – T. 47. – C. 167-174. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.10.039.
- [190] V. I. Tararov, S. V. Kolyachkina, C. S. Alexeev, and S. N. Mikhailov. N⁶-Acetyl-2',3',5'-tri-O-acetyladenosine; a convenient, 'Missed Out' substrate for regioselective N⁶-alkylations //Synthesis. – 2011. – C. 2483-2489. doi: 10.1055/s-0030-1260090.
- [191] S. V. Kolyachkina *et al.* N⁶-Substituted adenosines. Cytokinin and antitumor activities //Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 2011. – T. 76. – №. 11. – C. 1361-1378.
- [192] K. Ziemkiewicz, M. Warminski, R. Wojcik, J. Kowalska, and J. Jemielity. Quick Access to Nucleobase-Modified Phosphoramidites for the Synthesis of Oligoribonucleotides Containing Post-Transcriptional Modifications and Epitranscriptomic Marks //The Journal of Organic Chemistry. – 2022. – T. 87. – №. 15. – C. 10333-10348. doi: 10.1021/acs.joc.2c01390.
- [193] K. Aritomo, T. Wada, and M. Sekine. Alkylation of 6-N-acylated adenosine derivatives by the use of phase transfer catalysis //Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. – 1995. – №. 14. – C. 1837-1844.
- [194] B. Z. Eletskaia *et al.* Enzymatic synthesis of novel purine nucleosides bearing a chiral benzoxazine fragment //Chemical Biology & Drug Design. – 2019. – T. 93. – №. 4. – C. 605-616.
- [195] A. Gupte *et al.* Inhibition of siderophore biosynthesis by 2-triazole substituted analogues of 5'-O-[N-(salicyl) sulfamoyl] adenosine: antibacterial nucleosides effective against Mycobacterium tuberculosis //Journal of medicinal chemistry. – 2008. – T. 51. – №. 23. – C. 7495-7507. doi: 10.1021/jm8008037.
- [196] B. C. Bookser and N. B. Raffaele. High-throughput five minute microwave accelerated glycosylation approach to the synthesis of nucleoside libraries //The Journal of Organic Chemistry. – 2007. – T. 72. – №. 1. – C. 173-179. doi: 10.1021/jo061885l.
- [197] H. Vorbrüggen and C. Ruh-Pohlenz. Synthesis of nucleosides //Organic reactions. – 2004. – T. 55. – C. 1-630.
- [198] A. L. Kayushin *et al.* Radical dehalogenation and purine nucleoside phosphorylase E. coli: How does an admixture of 2', 3'-anhydroinosine hinder 2-fluorocordycepin synthesis //Biomolecules. – 2021. – T. 11. – №. 4. – C. 539. doi: 10.3390/biom11040539.
- [199] P. Hoyos *et al.* Biocatalyzed synthesis of glycostructures with anti-infective activity //Accounts of Chemical Research. – 2022. – T. 55. – №. 17. – C. 2409-2424. doi: 10.1021/acs.accounts.2c00136.
- [200] M. Rabuffetti *et al.* Synthesis of ribavirin, tecadenoson, and cladribine by enzymatic transglycosylation //Catalysts. – 2019. – T. 9. – №. 4. – C. 355. doi: 10.3390/catal9040355.

[201] B. Z. Eletskaia *et al.* Enzymatic Synthesis of 2-Chloropurine Arabinonucleosides with Chiral Amino Acid Amides at the C6 Position and an Evaluation of Antiproliferative Activity In Vitro //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – T. 24. – №. 7. – C. 6223.

[202] F. Kaspar *et al.* Diversification of 4'-Methylated nucleosides by nucleoside phosphorylases //ACS Catalysis. – 2021. – T. 11. – №. 17. – C. 10830-10835. doi: 10.1021/acscatal.1c02589.

[203] M. A. Huffman *et al.* Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir //Science. – 2019. – T. 366. – №. 6470. – C. 1255-1259.

[204] T. A. Krenitsky, G. W. Koszalka, and J. V. Tuttle. Purine nucleoside synthesis: an efficient method employing nucleoside phosphorylases //Biochemistry. – 1981. – T. 20. – №. 12. – C. 3615-3621. doi: 10.1021/bi00515a048.

[205] K. Herbal, J. Kitteringham, M. Voyle, and A. J. Whitehead. Synthesis of the enantiomer of nelarabine //Tetrahedron letters. – 2005. – T. 46. – №. 17. – C. 2961-2964. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.03.039>.

[206] I. A. Il'icheva, K. M. Polyakov, and S. N. Mikhailov. Strained conformations of nucleosides in active sites of nucleoside phosphorylases //Biomolecules. – 2020. – T. 10. – №. 4. – C. 552. doi: 10.3390/biom10040552.

[207] S. Kamel, I. Thiele, P. Neubauer, and A. Wagner. Thermophilic nucleoside phosphorylases: Their properties, characteristics and applications //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2020. – T. 1868. – №. 2. – C. 140304. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140304>.

[208] J. Doskočil and A. Holý. Specificity of purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* //Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 1977. – T. 42. – №. 1. – C. 370-383.

[209] I. D. Konstantinova *et al.* Chemoenzymatic method of 1, 2, 4-triazole nucleoside synthesis: Possibilities and limitations //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2013. – T. 39. – C. 53-71. doi: 10.1134/S1068162013010056.

[210] M. I. Kharitonova *et al.* New modified 2-aminobenzimidazole nucleosides: Synthesis and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1 //Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2017. – T. 27. – №. 11. – C. 2484-2487. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.100>.

[211] A. Stachelska-Wierzchowska, J. Wierzchowski, M. Górka, A. Bzowska, R. Stolarski, and B. Wielgus-Kutrowska. Tricyclic nucleobase analogs and their ribosides as substrates and inhibitors of purine-nucleoside phosphorylases III. Aminopurine derivatives //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 3. – C. 681. doi: 10.3390/molecules25030681.

[212] A. Khandazhinskaya *et al.* Novel fleximer pyrazole-containing adenosine analogues: Chemical, enzymatic and highly efficient biotechnological synthesis //Organic & Biomolecular Chemistry. – 2021. – T. 19. – №. 34. – C. 7379-7389. doi: 10.1039/D1OB01069G.

[213] W. Zhang, T. Turney, I. Surjancev, and A. S. Serianni. Enzymatic synthesis of ribo- and 2'-deoxyribonucleosides from glycofuranosyl phosphates: An approach to facilitate isotopic labeling //Carbohydrate research. – 2017. – T. 449. – C. 125-133. doi: 10.1016/j.carres.2017.07.006.

[214] C. Mao, W. J. Cook, M. Zhou, G. W. Koszalka, T. A. Krenitsky, and S. E. Ealick. The crystal structure of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase: a comparison with the human enzyme reveals a conserved topology //Structure. – 1997. – T. 5. – №. 10. – C. 1373-1383. doi: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00287-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00287-6).

[215] X. Zhou *et al.* Recombinant purine nucleoside phosphorylases from thermophiles: preparation, properties and activity towards purine and pyrimidine nucleosides //The FEBS Journal. – 2013. – T. 280. – №. 6. – C. 1475-1490. doi: 10.1111/febs.12143.

[216] H. Han *et al.* 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter //Pharmaceutical research. – 1998. – T. 15. – C. 1154-1159. doi: 10.1023/a:1011919319810.

[217] A. M. Aronov, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, and M. H. Gelb. Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design //Journal of medicinal chemistry. – 1998. – T. 41. – №. 24. – C. 4790-4799. doi: 10.1021/jm9802620.

[218] M. J. Robins and B. Uznański. Nucleic acid related compounds. 33. Conversions of adenosine and guanosine to 2, 6-dichloro, 2-amino-6-chloro, and derived purine nucleosides //Canadian Journal of Chemistry. – 1981. – T. 59. – №. 17. – C. 2601-2607. doi: 10.1139/v81-374.

[219] M. J. Robins and B. Uznański. Nucleic acid related compounds. 34. Non-aqueous diazotization with tert-butyl nitrite. Introduction of fluorine, chlorine, and bromine at C-2 of purine nucleosides //Canadian Journal of Chemistry. – 1981. – T. 59. – №. 17. – C. 2608-2611. doi: 10.1139/v81-375.

[220] K. Niiya, R. A. Olsson, R. D. Thompson, S. K. Silvia, and M. Ueeda. 2-(N'-alkylidenehydrazino) adenosines: potent and selective coronary vasodilators //Journal of medicinal chemistry. – 1992. – T. 35. – №. 24. – C. 4557-4561. doi: 10.1021/jm00102a007.

[221] S. Vittori *et al.* N-Cycloalkyl derivatives of adenosine and 1-deazaadenosine as agonists and partial agonists of the A1 adenosine receptor //Journal of medicinal chemistry. – 2000. – T. 43. – №. 2. – C. 250-260. doi: 10.1021/jm9911231.

[222] K. K. Borowicz, J. Łuszczki, and S. J. Czuczwar. 2-Chloroadenosine, a preferential agonist of adenosine A1 receptors, enhances the anticonvulsant activity of carbamazepine and clonazepam in mice //European neuropsychopharmacology. – 2002. – T. 12. – №. 2. – C. 173-179. doi: 10.1016/s0924-977x(02)00009-3.

[223] C. M. Massari, M. Zuccarini, P. Di Iorio, and C. I. Tasca. Guanosine mechanisms of action: Toward molecular targets //Frontiers in Pharmacology. – 2021. – T. 12. – C. 653146.

[224] А. Бригадирова, Я. Агацарская, Д. Салихов, А. Нагих. Метод изучения аденозиновой А1 рецепторной активности химических соединений *in vitro* //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2019. – №. 2 (70). – С. 55-57.

[225] S. Majumdar, S. Duvvuri, and A. K. Mitra. Membrane transporter/receptor-targeted prodrug design: strategies for human and veterinary drug development //Advanced drug delivery reviews. – 2004. – T. 56. – №. 10. – C. 1437-1452.

[226] A. K. Pathak, V. Pathak, L. E. Seitz, W. J. Suling, and R. C. Reynolds. 6-Oxo and 6-thio purine analogs as antimycobacterial agents //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2013. – T. 21. – №. 7. – C. 1685-1695. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.054>.

[227] J. A. Modi and K. Patel. Design, synthesis of some 2, 6, 9-trisubstituted purinyl thioureido derivatives and evaluation of antimicrobial activity //Medicinal Chemistry Research. – 2012. – T. 21. – №. 8. – C. 1660-1664.

[228] Y. Voynikov, V. Valcheva, G. Momekov, P. Peikov, and G. Stavrakov. Theophylline-7-acetic acid derivatives with amino acids as anti-tuberculosis agents //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2014. – T. 24. – №. 14. – C. 3043-3045. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.026>.

[229] G. Stavrakov *et al.* Design, Synthesis, and Antimycobacterial Activity of Novel Theophylline-7-Acetic Acid Derivatives With Amino Acid Moieties //Chemical Biology & Drug Design. – 2016. – T. 87. – №. 3. – C. 335-341.

[230] G. W. Koszalka *et al.* 6-N-substituted derivatives of adenine arabinoside as selective inhibitors of varicella-zoster virus //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1991. – T. 35. – №. 7. – C. 1437-1443. doi: 10.1128/AAC.35.7.1437.

- [231] J. R. Hanrahan and D. W. Hutchinson. The enzymatic synthesis of antiviral agents //Journal of biotechnology. – 1992. – T. 23. – №. 2. – C. 193-210. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90092-N](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90092-N).
- [232] I. D. Konstantinova *et al.* A chemo-enzymatic synthesis of β -D-arabinofuranosyl purine nucleosides //Synthesis. – 2011. – C. 1555-1560. doi: 10.1055/s-0030-1260010.
- [233] I. V. Fateev *et al.* The chemoenzymatic synthesis of clofarabine and related 2'-deoxyfluoroarabinosyl nucleosides: the electronic and stereochemical factors determining substrate recognition by *E. coli* nucleoside phosphorylases //Beilstein journal of organic chemistry. – 2014. – T. 10. – №. 1. – C. 1657-1669.
- [234] I. D. Konstantinova *et al.* Chemo-enzymatic synthesis and biological evaluation of 5, 6-disubstituted benzimidazole ribo- and 2'-deoxyribonucleosides //Synthesis. – 2012. – C. 272-280. doi: 10.1055/s-0032-1317782.
- [235] A. O. Denisova *et al.* The Chemoenzymatic Synthesis of 2-Chloro- and 2-Fluorocordyceps //Synthesis. – 2017. – T. 49. – №. 21. – C. 4853-4860. doi: 10.1055/s-0036-1590804.
- [236] M. Dračinský and R. Pohl. NMR studies of purines //Annual Reports on NMR Spectroscopy. – Academic Press, 2014. – T. 82. – C. 59-113.
- [237] A. K. Bakkestuen, L.-L. Gundersen, D. Petersen, B. T. Utenova, and A. Vik. Synthesis and antimycobacterial activity of agelasine E and analogs //Organic & Biomolecular Chemistry. – 2005. – T. 3. – №. 6. – C. 1025-1033.
- [238] H. Roggen and L. L. Gundersen. Synthetic Studies Directed towards Agelasine Analogs—Synthesis, Tautomerism, and Alkylation of 2-Substituted N-Methoxy-9-methyl-9H-purin-6-amines. – 2008.
- [239] T. Fujii, T. Saito, T. Itaya, K. Kizu, Y. Kumazawa, and S. Nakajima. Syntheses of 9-Alkyl-2-deuterio-N⁶-methoxyadenines and 2-Deuterio-N⁶, 9-dimethyladenine: Tautomerism in 9-Substituted N⁶-Alkoxyadenines //Chemical and pharmaceutical bulletin. – 1987. – T. 35. – №. 11. – C. 4482-4493.
- [240] Y. V. Morozov, F. Savin, V. Chekhov, E. Budowsky, and D. Y. Yakovlev. Photochemistry of N⁶-methoxyadenosine and of N⁴-hydroxycytidine and its methyl derivatives I: Spectroscopic and quantum chemical investigation of ionic and tautomeric forms: syn-anti isomerization //Journal of Photochemistry. – 1982. – T. 20. – №. 3. – C. 229-252.
- [241] D. Baranowski, G. Framski, E. Wyszko, and T. Ostrowski. Studies on structure of kinetin riboside and its analogues by variable-temperature NMR //Journal of Molecular Structure. – 2019. – T. 1195. – C. 110-118. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.05.112>.
- [242] R. Novotná, Z. Trávníček, and I. Popa. X-ray crystallographic and NMR study of the tautomerism in kinetin, kinetin riboside and their derivatives: A comparison between the solid state and solution //Journal of Molecular Structure. – 2010. – T. 963. – №. 2-3. – C. 202-210.
- [243] D. Martin and C. Reese. Restricted rotation in methylated derivatives of adenosine and cytidine //Chemical Communications (London). – 1967. – №. 24. – C. 1275-1276.
- [244] J. D. Engel and P. H. Von Hippel. Effects of methylation on the stability of nucleic acid conformations. Monomer level //Biochemistry. – 1974. – T. 13. – №. 20. – C. 4143-4158. doi: 10.1021/bi00717a013.
- [245] G. Dodin, M. Dreyfus, and J.-E. Dubois. Restricted rotation in 6-methylaminopurine and analogues. Intramolecular hydrogen bonding //Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2. – 1979. – №. 4. – C. 438-442.
- [246] J. Vícha, M. Malon, P. Veselá, O. Humpa, M. Strnad, and R. Marek. ¹H-, ¹³C-, and ¹⁵N-NMR chemical shifts for selected glucosides and ribosides of aromatic cytokinins //Magnetic Resonance in Chemistry. – 2010. – T. 48. – №. 4. – C. 318-322. doi: 10.1002/mrc.2575.

- [247] S. Casati, A. Manzocchi, R. Ottria, and P. Ciuffreda. ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR assignments for N⁶-isopentenyladenosine/inosine analogues //Magnetic Resonance in Chemistry. – 2010. – T. 48. – №. 9. – C. 745-748. doi: 10.1002/mrc.2641.
- [248] M. S. Drenichev *et al.* Modification of the length and structure of the linker of N6-benzyladenosine modulates its selective antiviral activity against enterovirus 71 //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2016. – T. 111. – C. 84-94.
- [249] S. Casati, A. Manzocchi, R. Ottria, and P. Ciuffreda. ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR spectral assignments of adenosine derivatives with different amino substituents at C6-position //Magnetic Resonance in Chemistry. – 2011. – T. 49. – №. 5. – C. 279-283. doi: 10.1002/mrc.2736.
- [250] V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, C. S. Alexeev, P. N. Soloyev, R. S. Esipov, and S. N. Mikhailov. Synthesis of cytokinins via enzymatic arsenolysis of purine nucleosides //Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. – 2018. – T. 75. – №. 1. – C. e61. doi: <https://doi.org/10.1002/cpnc.61>.
- [251] E. M. Savelieva *et al.* In Planta, In Vitro and In Silico Studies of Chiral N⁶-Benzyladenine Derivatives: Discovery of Receptor-Specific S-Enantiomers with Cytokinin or Anticytokinin Activities //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – T. 23. – №. 19. – C. 11334.
- [252] S. M. Devine and P. J. Scammells. Synthesis and Utility of 2-Halo-O⁶-(benzotriazol-1-yl)-Functionalized Purine Nucleosides. – 2011.
- [253] E. M. Savelieva *et al.* Cytokinin activity of N6-benzyladenine derivatives assayed by interaction with the receptors in planta, in vitro, and in silico //Phytochemistry. – 2018. – T. 149. – C. 161-177. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.008>.
- [254] A. Panda, S. Satpati, A. Dixit, and S. Pal. Novel homologated-apio adenosine derivatives as A 3 adenosine receptor agonists: design, synthesis and molecular docking studies //RSC advances. – 2016. – T. 6. – №. 14. – C. 11233-11239. doi: 10.1039/C5RA26416B.
- [255] V. P. Krasnov *et al.* N-[ω -(Purin-6-yl) aminoalkanoyl] Derivatives of Chiral Heterocyclic Amines as Promising Anti-Herpesvirus Agents //European Journal of Organic Chemistry. – 2019. – T. 2019. – №. 30. – C. 4811-4821.
- [256] A. B. Reitz, D. W. Graden, A. D. Jordan, Jr., and B. E. Maryanoff. Conformational study of N-substituted adenines by dynamic proton NMR: Relatively high barrier to rotation about C6-N6 in N3, N6-disubstituted adenines //The Journal of Organic Chemistry. – 1990. – T. 55. – №. 22. – C. 5761-5766. doi: 10.1021/jo00309a021.
- [257] G. Tóth, Á. Szöllösy, I. Hermecz, Á. Horváth, and Z. Mészáros. Tautomerism of 9-formyltetrahydro-4H-pyrido [1, 2-a] pyrimidin-4-ones and their ring homologues: a ^1H , ^{13}C , and ^{15}N nuclear magnetic resonance study. – 1985.
- [258] X. S. Huang, X. Liu, K. L. Constantine, J. E. Leet, and V. Roongta. Observation of O–H...N scalar coupling across a hydrogen bond in nocathiacin I //Magnetic Resonance in Chemistry. – 2007. – T. 45. – №. 6. – C. 447-450.
- [259] A. J. Dingley and S. Grzesiek. Direct observation of hydrogen bonds in nucleic acid base pairs by internucleotide 2 J NN couplings //Journal of the American chemical Society. – 1998. – T. 120. – №. 33. – C. 8293-8297. doi: 10.1021/ja981513x.
- [260] A. Meissner and O. W. Sørensen. New Techniques for the Measurement of C' N and C' HNJ Coupling Constants across Hydrogen Bonds in Proteins //Journal of Magnetic Resonance. – 2000. – T. 143. – №. 2. – C. 387-390. doi: <https://doi.org/10.1006/jmre.1999.1998>.
- [261] A. Jansma *et al.* Verification of a designed intramolecular hydrogen bond in a drug scaffold by nuclear magnetic resonance spectroscopy //Journal of medicinal chemistry. – 2007. – T. 50. – №. 24. – C. 5875-5877. doi: 10.1021/jm700983a.
- [262] R. Muller. Encyclopedia of nuclear magnetic resonance, volume 9, advances in NMR //Spectroscopy. – 1996.

[263] I. Alkorta, J. Elguero, and G. S. Denisov. A review with comprehensive data on experimental indirect scalar NMR spin–spin coupling constants across hydrogen bonds //Magnetic Resonance in Chemistry. – 2008. – T. 46. – №. 7. – C. 599-624.

[264] D. Plochocka, A. Rabczenko, and D. B. Davies. Intramolecular hydrogen bonding and molecular conformations of nucleosides: N (6)-Dimethyl-2', 3'-isopropylidene adenosine //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis. – 1977. – T. 476. – №. 1. – C. 1-15.

[265] R. S. Esipov, A. I. Gurevich, D. V. Chuvikovskiy, L. A. Chupova, T. I. Muravyova, and A. I. Miroshnikov. Overexpression of Escherichia coli genes encoding nucleoside phosphorylases in the pET/B121 (DE3) system yields active recombinant enzymes //Protein Expression and Purification. – 2002. – T. 24. – №. 1. – C. 56-60. doi: 10.1006/prev.2001.1524.