

Елецкая Барбара Златковна

**Биосинтез модифицированных нуклеозидов
с нетипичными гетероциклическими основаниями**

Специальность: 1.4.9 Биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва — 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений (ИБХ РАН)

Константинова Ирина Дмитриевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор, заведующая отделом химии нуклеиновых кислот Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (НИИФХБ) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Готтих Марина Борисовна

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Хомутов Максим Алексеевич

Ведущая организация: ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИБХМ СО РАН)

Защита диссертации состоится «20» декабря 2023 г. в 11 ч 00 мин на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 на базе ИБХ РАН по адресу: 117991, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН по адресу: 117991, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 и на интернет-сайте <https://www.ibch.ru>

Автореферат разослан « »

2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ИБХ РАН,
доктор физико-математических наук



В.А.Олейников

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Аналоги пуриновых нуклеозидов, обладающие схожими с природными нуклеозидами механизмами транспорта, накопления и встраивания в ДНК и характером метаболизма, применяются в медицинской практике для лечения различных заболеваний, включая вирусные инфекции, злокачественные опухоли, ревматологические заболевания, а также инфекции, вызванные паразитами, бактериями и грибами.

Однако существуют значительные ограничения при использовании препаратов этого класса, включая системную токсичность и развитие резистентности, что уменьшает эффективность лечения. Кроме того, высокие затраты на получение данных субстанций ограничивают их доступность. Поэтому поиск новых аналогов пуриновых нуклеозидов с более низкой токсичностью, обладающих высокой активностью, и разработка эффективных методов их получения, является актуальными задачами биоорганической химии и биотехнологии.

Проведенное исследование позволило создать библиотеку новых модифицированных нуклеозидов для изучения их биологической активности и выявить среди них соединения, обладающие антипролиферативной, антивирусной или антимикробной активностью. Полученная информация о модификациях, ведущих к проявлению того или иного типа активности или изменению биодоступности аналогов нуклеозидов, позволило выявить зависимость «структура-активность» в ряду синтезированных соединений, что необходимо при разработке лекарственных препаратов на основе модифицированных нуклеозидов.

Цели и задачи исследования

Целью исследования является биосинтез трёх серий модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями (аналогов 2-аминопурина, арабинозидов 2-хлораденина, замещенных по С6 положению и флексимерных нуклеозидов, Рис.1).

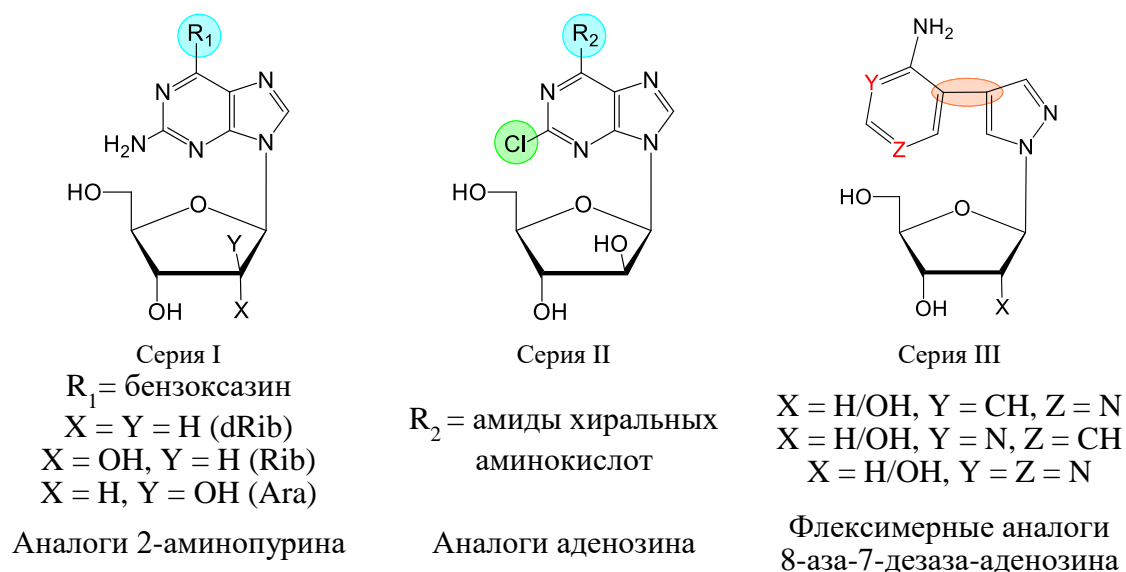


Рисунок 1 — Серии C2, C6-замещенных и флексимерных пуриновых нуклеозидов

Задачи исследования включали в себя следующие аспекты: определение субстратной специфичности пуридинуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к модифицированным основаниям и рибозидам; определение оптимальных параметров реакции трансгликозилирования, с целью достижения максимального выхода модифицированного нуклеозида; синтез новых соединений; определение устойчивости полученных нуклеозидов к воздействию аденозиндезаминазы (для соединений I и II серий); первичный скрининг биологической активности синтезированных нуклеозидов на различных биологических моделях.

Научная новизна и практическая значимость работы

Получены три серии новых нуклеозидов: а) одиннадцать нуклеозидов, модифицированных по С6 положению 2,3-дигидро-7,8-дифтор-бензоксазином с углеводными остатками трех типов – рибо-, 2-дезоксирибо- и арабинорядов, б) двенадцать арабинозидов, замещенных хиральными аминокислотами в С6 положении и атомом хлора в С2 положении пурина, в) девять флексимерных аналогов пуриновых нуклеозидов двух типов – рибо- и 2-дезоксириборядов. Проведена оптимизация ферментативных реакций синтеза и способов выделения новых замещенных модифицированных нуклеозидов трех серий. Методы легко воспроизводятся и масштабируются.

Впервые показано, что пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli* способны осуществлять реакцию гликозилирования пуриновых оснований, имеющих объемные заместители в С6 положении гетероциклического основания.

Разработан и оптимизирован высокоэффективный способ получения пуриновых арабинозидов с использованием арсенолита.

Впервые обнаружены региоизомерные продукты в процессе реакции трансгликозилирования флексимерных оснований, установлена их структура. Проведено компьютерное моделирование взаимодействий оснований и нуклеозидов в активном центре фермента, расшифрован механизм образования бисгликозидов флексимерных оснований.

Расширены представления о возможностях ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями. Исследование позволило лучше понять механизмы катализа и специфичности фермента в отношении новых гетероциклических оснований.

Создана модель для изучения субстратной специфичности аденозиндезаминазы (ADA) *E. coli* и ADA из кишечника телят (*CI*) в отношении синтезированных модифицированных нуклеозидов.

Получены данные первичного скрининга *in vitro* противовирусной активности соединений первой и третьей серий и противоопухолевой активности второй серии соединений.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтез монозамещенных аналогов аденозина из гетероциклических оснований химерных по составу, объединяющих молекулы двух классов в одной структуре: пуриновые гетероциклические основания, имеющие объемные заместители – С6-замещенные бензоксазиновые группы, присоединенные непосредственно к пуриновому основанию или через гексаноильный спейсер (*Серия I*). Получение новых нуклеозидов биокаталитическим способом из гетеродимерных оснований с тремя типами углеводного остатка: природным (рибоза и 2-дезоксирибоза) и неприродным (арабиноза). Исследование субстратной специфичности ADA из различных источников по отношению к нуклеозидам первой серии. Исследование противовирусной активности модифицированных нуклеозидов первой серии в отношении вируса герпеса 1 типа (ВПГ-1, штамм L₂) *in vitro*, включая устойчивый к ацикловиру штамм вируса (HSV-1, штамм L₂/R).

2. Синтез дизамещенных аналогов арабинозидов аденозина из соответствующих рибозидов, несущих остаток оптически активной аминокислоты в С6 положении и атом хлора в С2 положении (*Серия II*). Изучение субстратной специфичности PNP *E. coli* в отношении конъюгатов пуриновых рибозидов с хиральными аминокислотами. Исследование субстратной специфичности ADA *E. coli* по отношению к синтезированным арабинозидам. Исследование цитотоксической активности соединений на клетках лейкоцитарной лимфомы человека линии U937 (Т-лимфобластного лейкоза человека) *in vitro*.

3. Синтез флексимерных аналогов 8-аза-7-дезаза-аденозина, представляющих собой проксимальные флексимерные аналоги аденозина (4'-5, С-С связь), где первый компонент цикла флексимерного основания - пирозол вместо имидазола, который обычно входит в состав всех аналогов нуклеозидов пуринового ряда; а второй компонент - аминопиридин или аминопиримидин (*Серия III*). Изучение субстратной специфичности PNP *E. coli* в отношении флексимерных оснований. Получение серии новых нуклеозидов с тремя типами углеводного остатка: природным (рибоза и 2-дезоксирибоза) и неприродным (арабиноза). Исследование антивирусной активности флексимерных аналогов 8-аза-7-дезаза-аденозина на широкой панели

ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Исследование антибактериального действия аналогов на 10 коллекционных тест-культурах (6 грамположительных бактериях, 2 грамотрицательных бактериях и 2 грибах).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 патент, 12 тезисов докладов конференций.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: 40th FEBS Congress, 2015, Берлин; 41st FEBS Congress, 2016, Эфес; 42st FEBS Congress, 2017, Иерусалим; FEBS OPEN BIO, 2018; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике», 2014, Москва; XII Всероссийская научно-практической конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», 2015, Москва; VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2015, Москва; 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием "МедХим-Россия 2021", Волгоград, 2022; IUBMB-FEBS-PAVMB Congress, 2022 Лиссабон; Всероссийская конференция. "Синтетическая биология и биофармацевтика", 2022, Новосибирск; International scientific conference "Actual Problems of Chemistry of Natural Compounds", 2023, Ташкент.

Структура и объём работы. Диссертационная работа изложена на 119 страницах машинописного текста. Состоит из списка сокращений, введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов по выполненной работе и списка литературы, который содержит 131 ссылку. Работа содержит 60 рисунков и 13 таблиц.

Основное содержание работы

1. Синтез гетеродимерных нуклеозидов 2-аминопурина с 2,3-дигидро-7,8-дифтор-бензоксазиновыми заместителями (Серия I)

На первом этапе проводилось изучение субстратно-специфических свойств PNP *E. coli* по отношению к четырем пуриновым модифицированным гетероциклическим основаниям (Рис. 2) содержащих 2,3-дигидро-7,8-дифтор-бензоксазин с метильной группой в (*S*) или (*R*) конфигурации - **1**, присоединенный непосредственно к С6 положению пурина и через остаток аминокaproновой кислоты - **2**. Гетероциклические основания (*R,S*)-**1** и (*R,S*)-**2** были синтезированы в Лаборатории асимметрического синтеза Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН под рук. д.х.н., профессора Краснова В.П.

Тестовые реакции показали, что исследованные основания (конъюгаты 2-аминопурина с энантиомерами 3-метил-3,4-дигидро-2Н-[1,4]бензоксазина (*R,S*)-**1** и (*R,S*)-**2** - субстраты для рекомбинантной PNP *E. coli*. Кроме того, была показана возможность введения остатков рибозы, 2-дезоксирибозы и арабинозы (Рис. 2).

Конфигурация хирального центра в случае с 6-замещенными основаниями, имеющими гексаноильный спейсер (*S*)-**2** и (*R*)-**2**, и конфигурация хирального центра существенно не влияли на субстратно-специфические свойства PNP *E. coli*.

Необходимо отметить различия в скорости реакции для гетероциклических оснований (*R*)-**1** и (*S*)-**1**, имеющих бензоксазиновый заместитель, присоединенный непосредственно к пуриновому основанию. Из-за (*S*)-конфигурации метильной группы в бензоксазиновом заместителе скорость реакции трансгликозилирования ниже (красная линия на графиках), чем у аналогичного (*R*)-изомера.

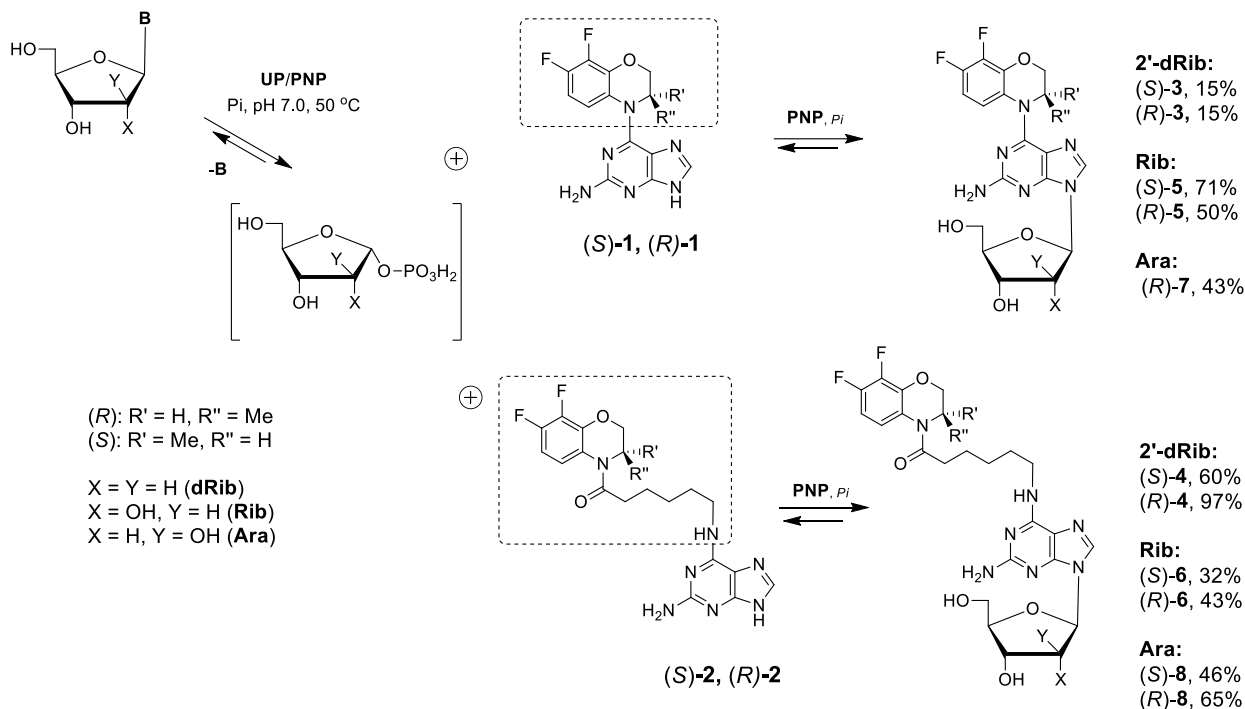


Рисунок 2 — Ферментативное трансгликозилирование 6-замещенных аналогов 2-аминопурина с использованием рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз (PNP – Пурииннуклеозидфосфорилаза *E. coli*, UP – Уридинфосфорилаза *E. coli*, Pi – фосфат неорганический)

На Рис. 3-5 приведены полученные с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) данные по конверсии оснований в соответствующие нуклеозиды.

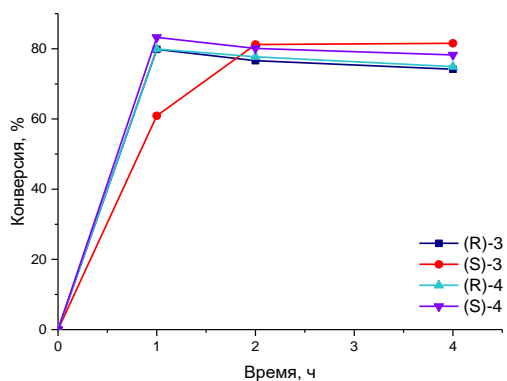


Рисунок 3 — Конверсия оснований (S,R)-1 и (S,R)-2 в 2'-дезоксирибозиды (S,R)-3 и (S,R)-4

Условия тестовых реакций: основание-акцептор (2 мМ), донор углеводного основания 2'-дезоксиинозин (2'-dIno), уридин (Urd), 1-β-D-арабинофуранозилурацил (AraU) (6 мМ). В каждую реакцию добавляли 5 ед. акт. PNP *E. coli*, в случае использования Urd и AraU добавляли еще 5 ед. акт. UP *E. coli*. Реакции проводили в 5 мМ калий-фосфатном буфере при pH 7, термостатировали 4 часа при 50 °С.

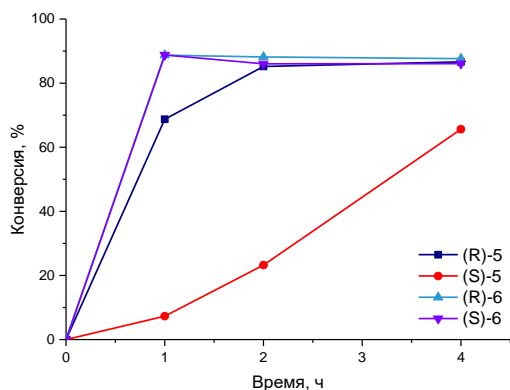


Рисунок 4 — Конверсия оснований (S,R)-1 и (S,R)-2 в рибозиды (S,R)-5 и (S,R)-6

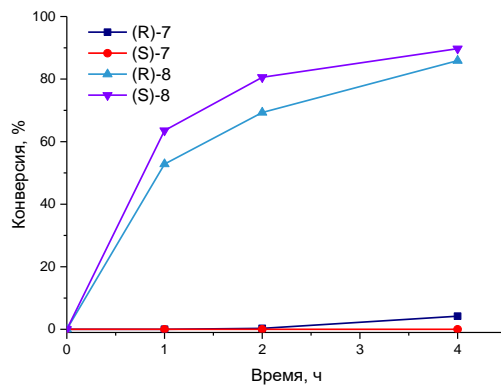


Рисунок 5 — Конверсия оснований (S,R)-1 и (S,R)-2 в арабинозиды (R)-7 и (S,R)-8

Особенно хорошо разница в эффективности синтеза видна на примере арабинозилирования. Арабинозилирование соединений (*R*)-4 и (*S*)-4 (Рис. 5), в которых объемный гетероциклический фрагмент отделяется от пуринового соединения спейсером, протекало быстро и характеризовалось высокой конверсией (89–91% за 4 ч). Превращение азотистого основания (*R*)-3 в арабинозид (*R*)-6 составляло всего 4.19% через 4 часа.

При увеличении времени реакции до 15 дней выход нуклеозида (*R*)-6 достигал 43%. В то же время (*S*)-энантиомер азотистого основания 3 не подвергается арабинозилированию; продукт реакции не был обнаружен через 9 дней (данные ВЭЖХ-МС).

Для синтеза рибозидов была оценена возможность использования различных доступных доноров остатка рибозы: аденозина (Ado); инозина (Ino); уридина (Urd). Конверсия основания (*R*)-2 в рибозид (*R*)-4 практически не зависела от донора рибозы. Аналогичные данные были получены и в случае синтеза 2'-дезоксирибозидов реакцией с различными донорами 2-дезоксирибофуранозы: 2'-дезоксаденозин (2'-dAdo), 2'-дезоксиинозин (2'-dIno) и 2'-дезоксиуридин (2'-dUrd). Конверсия практически не зависела от типа нуклеозида-донора. В аналогичных экспериментах были определены оптимальные условия для ферментативного синтеза арабинозидов. Превращение соединений (*R*)-1 и (*S,R*)-2 в соответствующие арабинозиды проводилось в присутствии PNP *E. coli* и α -D-арабинофуранозил-1-фосфата (1-P-Ara), который образовывался *in situ* из 1- β -D-арабинофуранозилурацила (AraU) под действием рекомбинантной UP *E. coli*.

Варьируя количество фермента PNP *E. coli* (от 5 до 0.5 ед. акт.) и соотношение основание/донор от 1:1.5 до 1:3 (Рис. 8), получили оптимальное соотношение параметров синтеза новых нуклеозидов.

Выбраны для наработки нуклеозидов следующие параметры:

- в качестве доноров - 2'-dIno, Urd или AraU;
- соотношение гетероциклическое основание:донор углеводного остатка - 1:3;
- концентрация ферментов
 - для дезоксирибозидов: 0.5 ед. акт./мл,
 - для рибозидов 1 ед. акт./мл UP и 0.5 ед. акт./мл PNP;
 - для арабинозидов: 1 ед. акт./мл UP и 0.5 ед. акт./мл PNP;
- pH 7.0 (5-10 мМ калий-фосфатный буфер);
- температура 50 °C.

В результате синтезировано восемь новых модифицированных нуклеозидов с *природными* типами углеводного остатка и три новых, имеющих в составе неприродный углеводный остаток - *арабинозу*. Соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов были получены ¹H и ¹³C ЯМР спектральные данные (включая [¹H,¹H] и [¹H,¹³C] 2D: COSY, HSQC, HMBC и NOE спектры).

2. Изучение субстратной специфичности аденозиндезаминазы ADA *E. coli* и из кишечника теленка (ADA CI)

Так как действие внутриклеточного фермента ADA может привести к деактивации аналогов аденозина, изучили субстратную специфичность модифицированных нуклеозидов первой серии по отношению к рекомбинантной аденозиндезаминазе *E. coli* (ADA *E. coli*) и аденозиндезаминазы, выделенной из кишечника теленка (ADA CI). Выбор ADA CI обусловлен тем, что этот фермент по своим характеристикам близок к ADA человека и показывает почти одинаковые значения K_m и k_{cat} для аденозина и его аналогов.

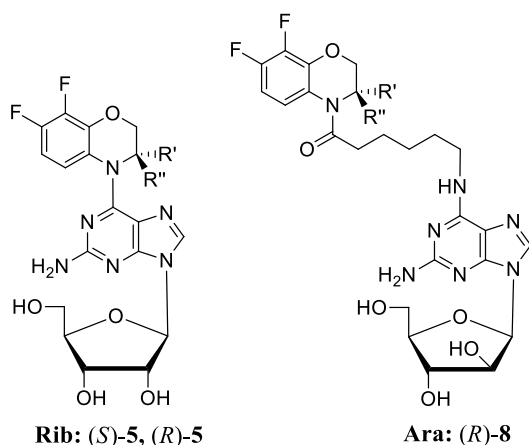
Для установления корреляции структура-активность в качестве контроля были выбраны следующие соединения: природные субстраты фермента: аденозин (Ado), 2'-дезоксаденозин (2'-dAdo), и представитель арабинозидов – 1- β -D-арабинофуранозиаденозин (AraA, видарабин). Скорость дезаминирования в контрольных реакциях проявила следующую зависимость: Ado > 2'-dAdo > AraA. Через 1 и 24 часа реакционные смеси с гетеродимерными модифицированными нуклеозидами не содержали продуктов реакции по данным ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Таким образом было установлено, что соединения первой серии - это не субстраты аденозиндезаминаз ADA *E. coli* и ADA CI. Результаты эксперимента подтвердили предположение, что введением в молекулу заместителей (в нашем случае бензоксазиновых) в 6 положение гетероциклического основания можно защитить пуриновые нуклеозиды от нежелательного воздействия ADA.

3. Исследование противовирусной активности бензоксазиновых нуклеозидов Серии I *in vitro*

Тестирование антивирусной активности синтезированных нуклеозидов проводилось в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

В работе использовали эталонный штамм L₂ вируса герпеса простого типа 1 (ВПГ-1/ L₂), полученный из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, а также штамм ВПГ-1/L₂/R, глубоко резистентный к ацикловиру и родственным соединениям. В качестве референс-препаратов использовали следующие соединения: ацикловир (9-[(2-гидроксиэтокси)-метил]гуанин, фоскарнет (тринатриевая соль фосфономуравьиной кислоты) и рибавирин (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид). Противовирусную активность модифицированных нуклеозидов оценивали в отношении вируса герпеса 1 типа (ВПГ-1, штамм L₂). Цитотоксические свойства соединений, в отношении клеток Vero E6 определяли путем инкубации культуры клеток в присутствии нуклеозидов **4–6**, **8** и гетероциклических оснований **1–2** в диапазоне исследуемых концентраций (до 1000 мкг/мл) в течение 72 ч.

Нуклеозид (*S*)-**6** можно отнести к малотоксичным соединениям: Соединения (*S*)-, (*R*)-**4** и (*S*)-, (*R*)-**6** проявляют минимальную противовирусную активность только в субтоксичной концентрации (индекс селективности, ХТИ = ЦД₅₀/ИД₅₀, 1 ÷ 3), значения ЦД₅₀, характеризующие уровень токсичности для культуры клеток Vero E6, близки или превышают концентрацию 1000 мкг/мл. Их цитотоксичность оказалась ниже цитотоксичности оснований (*S*)-, (*R*)-**1** и (*R*)-**2**. Другие нуклеозиды проявляли умеренную цитотоксичность (ЦД₅₀ > 300 мкг/мл).



(*R*): R' = H, R'' = Me
(*S*): R' = Me, R'' = H

Рисунок 6 — Структурные формулы наиболее активных соединений в Серии I

Рибозиды **5** (Рис. 6) проявляют значительную селективную активность в отношении ВПГ-1 *in vitro*, включая устойчивый к ацикловиру штамм вируса (HSV-1, штамм L₂/R).

Наблюдаемый противовирусный эффект соединений в равной степени выражен на обеих использованных вирусных моделях, то есть не зависит от чувствительности ВПГ-1 к АЦВ.

Соединения (*S*)-**6** и (*R*)-**6** проявляют невысокую, но достоверную противовирусную активность на модели вируса герпеса простого типа ВПГ-1/ L₂ *in vitro*, включая штамм вируса ВПГ-1/L₂/R, глубоко резистентный к ацикловиру. Как следует из представленных результатов, рибозиды можно отнести к низкотоксичным соединениям (величины ЦД₅₀, характеризующие уровень их токсичности для культуры клеток, близки или превышают концентрацию 1000 мкг/мл). (*S*)-**6** и (*R*)-**6** малотоксичны для культуры клеток Vero E6 при использовании метода визуального наблюдения и при оценке жизнеспособности клеток (с помощью метода определения жизнеспособности клеточных культур окрашиванием трипановым синим).

4. Синтез модифицированных по 6-му положению аналогов 2-хлорпурина (Серия II)

Второй частью работы была разработка эффективного подхода к синтезу дизамещенных пуриновых арабинонуклеозидов, несущих остаток оптически активной аминокислоты или ее аналога в С6 положении и модифицированных по С2 положению атомом хлора.

Используя свойство PNP осуществлять обмен углеводных остатков с одного основания на другое, было решено в качестве донора основания в синтезе этой серии нуклеозидов использовать модифицированные по С2, С6-положениям пуриновые рибозиды. Данное решение обусловлено использованием более простых химических методов модификации природного нуклеозида гуанозина при получении рибозидов, когда триацетат рибозы выступает в качестве

защитной группы высоко реакционноспособного N9 атома пурина. Кроме того, при проведении реакции трансгликозилирования также важна растворимость субстрата: рибозиды зачастую более чем в 10 раз лучше растворимы, чем соответствующие гетероциклические основания.

Все исследованные рибозиды, содержащие хлор во 2-м положении и амидные производные аминокислот в С6 положении пуринового основания, оказались хорошими субстратами в реакции трансарабинозилирования (Рис. 7). Как показали эксперименты, равновесие реакции в большей степени смещено в сторону синтеза целевых арабинозидов.

Рибозиды 2-хлор-6-замещенных пуринов синтезированы в Лаборатории биотехнологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

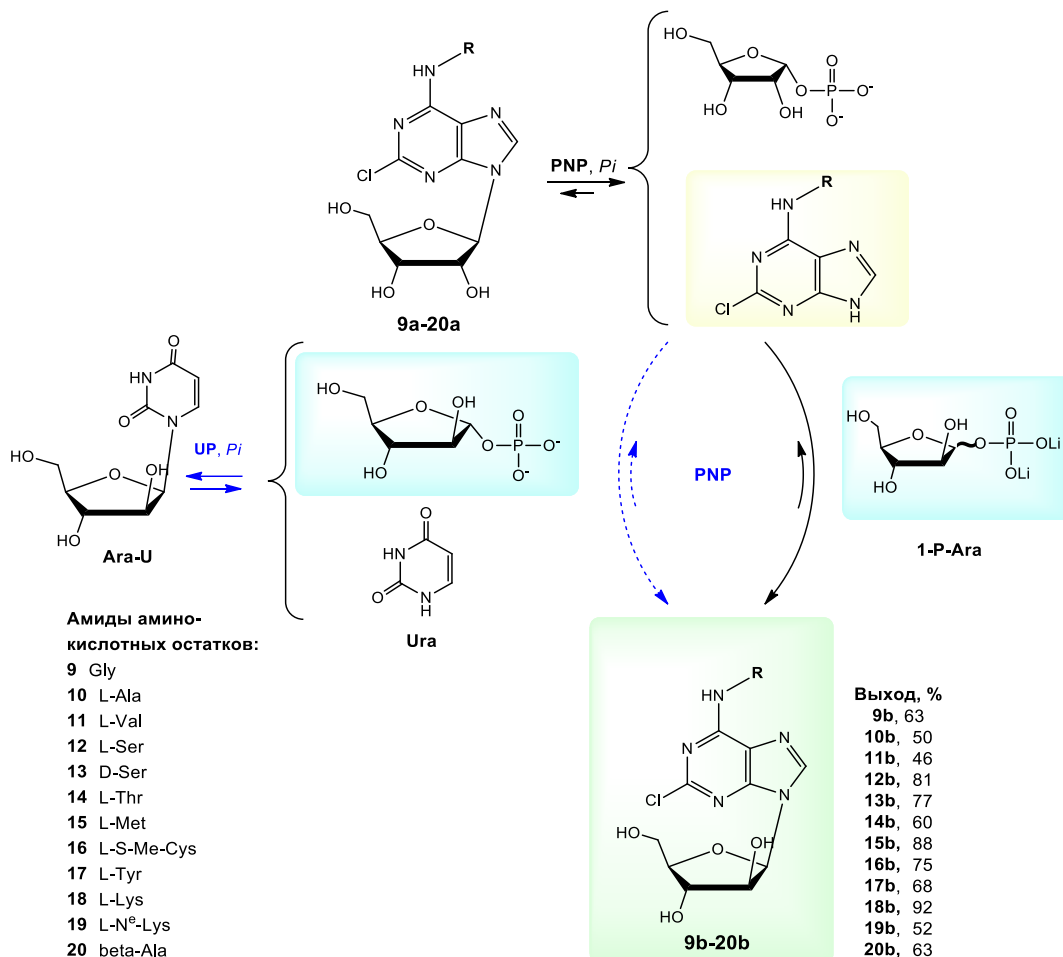


Рисунок 7 — Варианты получения пуриновых арабинозидов (PNP – пуриннуклеозид-фосфорилаза *E. coli*, UP – уридинфосфорилаза *E. coli*, Pi - неорганический фосфат, 1-P-Ara - 1-фосфат арабинозы)

Реакцию трансгликозилирования можно проводить двумя способами: используя в качестве донора арабинозы синтетический 1-фосфат арабинозы (1-P-Ara) (Konstantinova, Antonov et al. 2011) или 1-β-D-арабинофуранозилурацил (Ara-U). В первом случае применяется пуриннуклеозидфосфорилаза (PNP) (Рис. 7, черная стрелка). Во втором случае используются два фермента - PNP и уридинфосфорилаза (UP) (Mikhailopulo and Miroshnikov 2010) (Рис 17, пунктирная стрелка). AraU легко синтезировать из уридина через 2,2'-ангидроуридин по методу I. Wempen (Wempen and Fox 1967).

Для примера на Рис. 8 приведена зависимость конверсии рибозида **9a** в арабинозид **9b**. Лучшим донором арабинозы оказался AraU: концентрация продукта в смеси достигала 82% (по данным ВЭЖХ) при пятикратном избытке донора AraU (зеленая линия тренда). Конверсия рибозида в арабинозид была максимальной (до 90 % за 5 дней) при 5-кратном избытке AraU. Поэтому синтез нуклеозидов **9b** – **20b** проводили именно из AraU при его 5-кратном избытке.

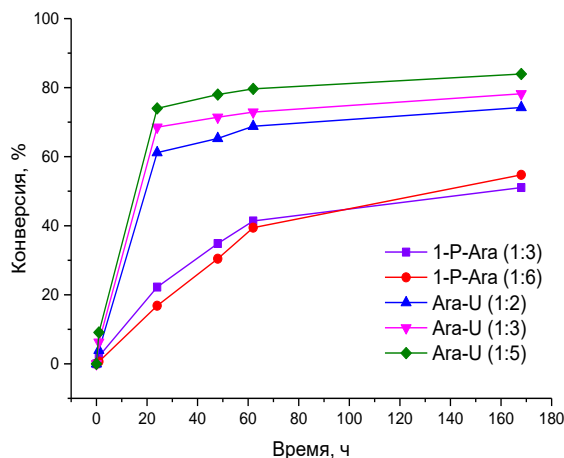


Рисунок 8 — Зависимость превращения рибозида **9a** в арабинозид **9b** от типа и количества донора арабинозы

Реакционные смеси (1.0 мл) содержали: 1 мМ модифицированного рибозида **9a**; 3 или 6 мМ 1-P-Ara или 2, 3 или 5 мМ Ara-U, 3.9 ед. акт. PNP, 4.5 ед. акт. UP в 2 мМ калий-фосфатном буфере (pH7.0).

В результате оптимизации были выбраны следующие условия ферментативного синтеза арабинозидов: соотношение модифицированный рибозид к AraU 1:5; количество ферментов - 0.8 единиц на 1 мкмоль субстрата и 0.18 единиц UP на 1 мкмоль Ara-U, pH 7.0, 50 °C.

5. Арсенолиз в синтезе модифицированных пуриновых арабинонуклеозидов Серии II.

Во время проведения экспериментов было обнаружено, что хроматографическая подвижность исходных рибозидов и продуктов ферментативной реакции – арабинозидов очень близка (HPLC реакционной смеси синтеза 6-N-[L-аланиламидо]-2-хлор-9-бета-D-арабинофуранозил-пурина **10b** приведена на Рис. 10A). Обычно по окончании ферментативной реакции кроме целевого арабинозида в реакционной смеси присутствует небольшое количество (до 8 %) исходного рибозида и соответствующее гетероциклическое пуриновое основание. Близкая подвижность исходного нуклеозида (7.014 мин) и продукта-арабинозида (7.248 мин) осложняла выделение целевого продукта (Рис. 10A)

Для упрощения состава реакционных смесей мы решили использовать процесс арсенолиза рибозидов. Известно, что PNP катализирует реакцию обратимого фосфоролиза рибозидов, который становится необратимым при замене фосфата арсенатом (арсенолиз) (Kline and Schramm 1993). Ранее мы показали, что при синтезе арабинозидов модифицированных пуринов из соответствующих рибозидов конкурентная реакция арсенолиза позволяет упрощать составы ферментативных смесей за счет вывода рибозы из сферы реакции (Konstantinova, Fateev et al. 2016). В присутствии солей мышьяковой кислоты в активном центре PNP из рибозида образуется интермедиат - нестабильное соединение α -D-рибозо-1-арсенат. Будучи крайне неустойчивым, в водных растворах он быстро гидролизует до рибозы и неорганического арсената, в результате чего реакция становится необратимой (Рис. 9).

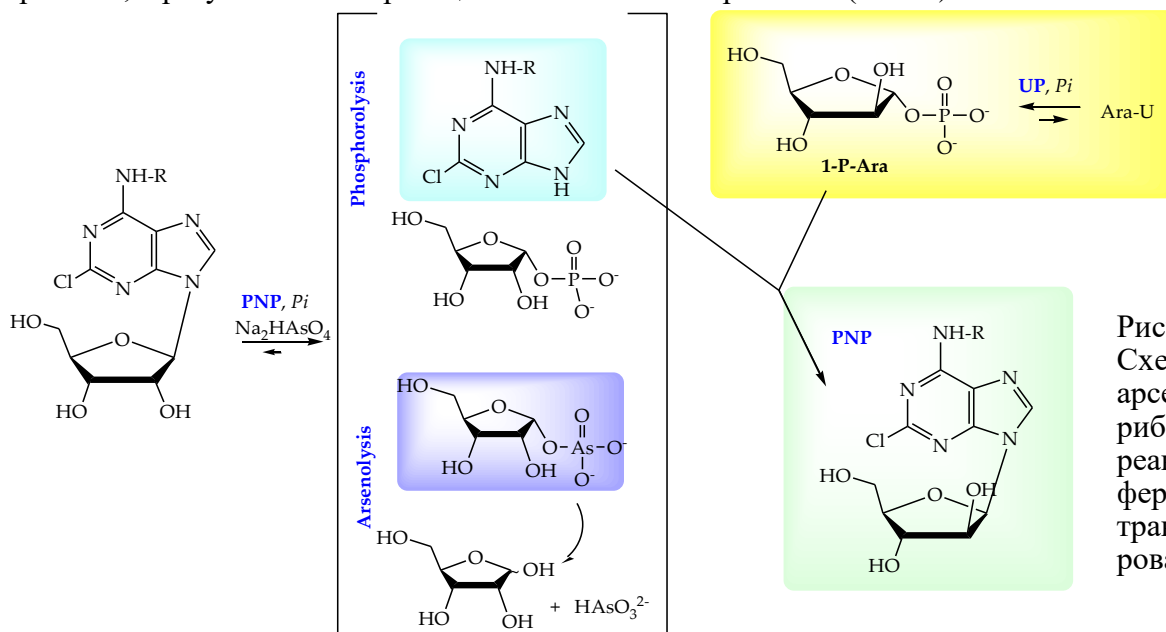


Рисунок 9 — Схема процесса арсенолиза рибозидов в реакции ферментативного трансгликозилирования

Арсенат арабинозы в реакционной смеси практически не образуется при добавлении каталитического количества арсената натрия Na_2HAsO_4 (до 0.5 мМ). За счет этого синтез арабинозидов в реакционной смеси носит преобладающий характер. Интересно, что модифицированные нуклеозиды ряда арабинозы практически не подвергаются арсенолизу – <0.5% за 24 ч при 50 °С.

При добавлении в реакционную смесь каталитических количеств арсената натрия Na_2HAsO_4 (до 0.5 мМ) содержащийся в реакции исходный рибозид в течение 24 ч быстро гидролизался до соответствующего гетероциклического основания. Это позволило селективно вывести из реакции ферментативного синтеза *D*-рибофуранозу. В оптимизированных условиях было синтезировано двенадцать новых модифицированных нуклеозидов.

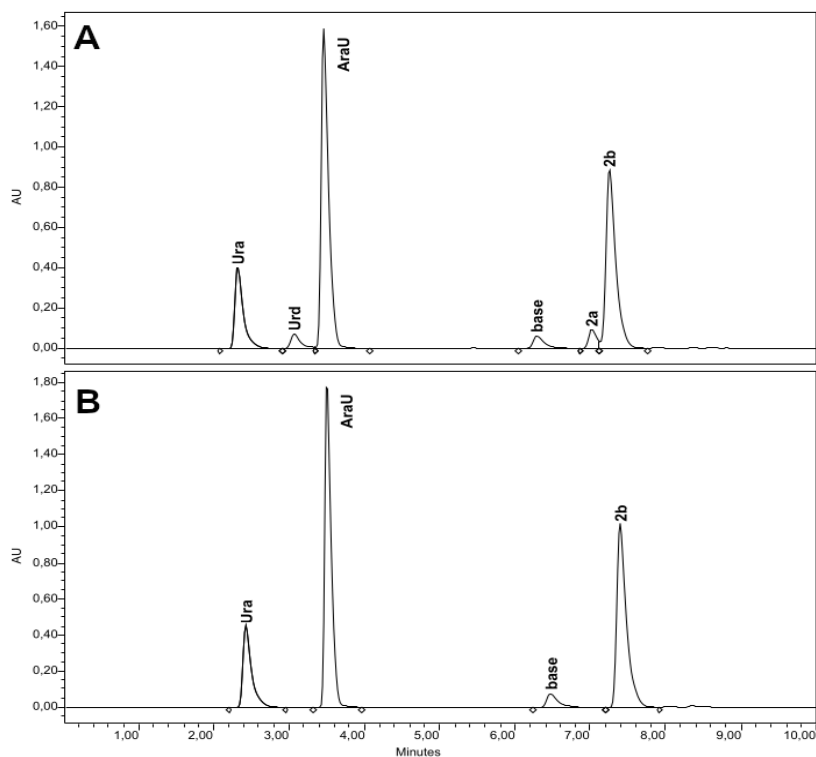


Рисунок 10 — ВЭЖХ-профили реакционной смеси для синтеза производного аланина **2b** без арсената (А) и с арсенатом натрия (В)

В результате использования арсенолиза рибозидов количество компонентов в реакционных смесях (по данным ВЭЖХ) уменьшается с шести до четырех (Рис. 10В) и существенно облегчается выделение целевых продуктов. Поэтому для выделения целевых нуклеозидов мы использовали обычную колоночную хроматографию вместо препаративной ВЭЖХ.

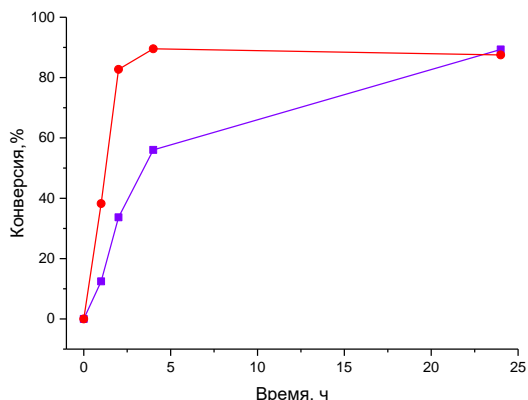


Рисунок 11 — Зависимость скорости синтеза арабинозида **15b** от момента добавления арсената в реакционную смесь.

Красная линия: арсенат добавлен в реакцию в начале синтеза. Фиолетовая линия: арсенат добавлен в реакцию через 24 ч после начала синтеза.

На Рис. 11 приведены данные, из которых следует, что в случае добавления арсената в начале синтеза метионинового арабинозида **15b** в первые 10 часов равновесие сильно смещается в сторону образования арабинозида, однако с течением времени (24 ч) обе реакции приходят к

одному равновесному состоянию. Использование арсената помогает добиться более высокой конверсии рибозида за более короткий промежуток времени.

Синтезировано двенадцать дизамещенных пуриновых арабинонуклеозидов, несущих остаток оптически активной аминокислоты или ее аналога в С6 положении и модифицированных по С2 положению атомом хлора, соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов были получены ^1H и ^{13}C ЯМР спектральные данные (включая $[\text{1H},\text{1H}]$ и $[\text{1H},\text{13C}]$ 2D: COSY, HSQC, HMBC и NOE спектры).

6. Изучение субстратной специфичности аденозиндезаминазы ADA *E. coli*

Оценивали устойчивость полученных соединений к действию аденозиндезаминазы *E. coli* (Рис. 12). Для установления корреляции структура-активность в биологических экспериментах дополнительно синтезировали шесть нуклеозидов: 9- β -D-арабинофуранозил-2-амино-6-(N α -глицинил)-пурин (**21**), 9- β -D-арабинофуранозил-2-амино-6-(N α -глициниламидо)-пурин (**22**), 2-хлораденозин (Cl-Ado, **23**), 2-хлор-9- β -D-арабинофуранозиладенин (Cl-AraA, **24**), 2-хлор-6-*O*-метил-(9- β -D-арабинофуранозил)гуанин (Cl-Nelar, **25**), 2-фтор-6-*O*-метил-(9- β -D-арабинофуранозил)гуанин (F-Nelar, **26**). Нуклеозиды **21** и **22**, **23** (Berzin, Dorofeeva et al. 2008), **24** (Konstantinova, Fateev et al. 2015), **25** и **26** (Fateev, Kostromina et al. 2021) были синтезированы в лаборатории по ранее разработанным методикам.

Все арабинонуклеозиды **9b** – **20b** были устойчивы к бактериальной ADA. Кроме того, атом хлора/фтора в положении С2 пурина предотвращает связывание нуклеозидов с активным центром ADA. Оба арабинофуранозида глицина 2-хлораденина **9b** и 2-аминоаденина **22** не являются субстратами бактериальной ADA. Введение амида аминокислоты в положение С6 пурина делает нуклеозиды устойчивыми к аденозиндезаминазе.

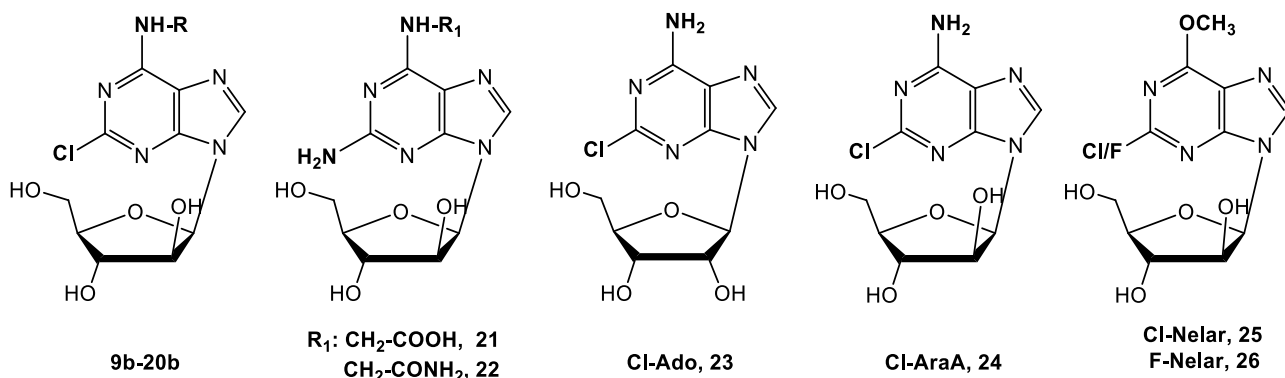


Рисунок 12 — Тестирование субстратной специфичности ADA *E. coli* по отношению к синтезированным нуклеозидам

Изучено ингибирование бактериальной аденозиндезаминазы полученными соединениями. В качестве контрольного соединения для тестирования ADA использовали аденозин. Затем аденозин дезаминировали в присутствии синтезированных нуклеозидов. Синтезированные соединения в концентрации 0.1 мМ мало влияли на ферментативную активность ADA, снижая скорость дезаминирования аденозина менее чем на 10%. Нуклеозиды **12b**, **23** и **24** снижали скорость дезаминирования аденозина под действием ADA на 23%, 63% и 54% соответственно.

При изучении кинетики фосфоролита аденозина в присутствии изучаемых аналогов, было показано, что соединения являются конкурентными ингибиторами.

Таблица 1 — Ингибирование аденозиндезаминазы *E. coli*

Ингибитор	K _i , мМ
2-хлораденозин, 23	0.078 ± 0.012
2-хлорарабиноаденозин, 24	0.13 ± 0.02
12b	1.2 ± 0.2

2-Хлораденозин оказался лучшим ингибитором среди тестируемых соединений. При замене рибозы на арабинозу (соединение **24**) K_i увеличивается в 1.7 раза. Введение фрагмента серина в положение С6 пурина (соединение **12b**) увеличивало K_i в 9.2 раза. Соединения **23**, **24** и **12b** являются конкурентными ингибиторами.

7. Исследование цитотоксической активности 2,6-замещенных пуриновых арабинозидов на опухолевых клетках человека *in vitro*

Выполнено в Лаборатории клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения Российский онкологический научный центр им Н.Н. Блохина г. Москва.

Изучение цитотоксической активности соединений проводили на клетках лейкоемической моноцитарной лимфомы человека линии U937 (Т-лимфобластного лейкоза человека) *in vitro*. В качестве препарата сравнения использовали известный противолейкозный препарат – 2-амино-9-β-D-арабино-фуранозил-6-метоксипурин (неларабин). Цитотоксическую активность оценивали по влиянию соединений на выживаемость клеток с помощью МТТ-теста.

Для соединений **12b** и **23** показана тенденция дозозависимого повышения цитотоксической активности, при этом значения IC_{50} составляют 16.0 и 22.0 мкМ, соответственно (Рис. 13). Цитотоксическая активность соединений сопоставима с активностью стандарта сравнения ($IC_{50} = 3.3$ мкМ).

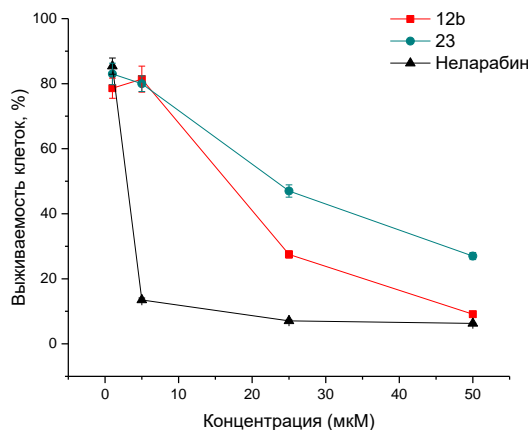
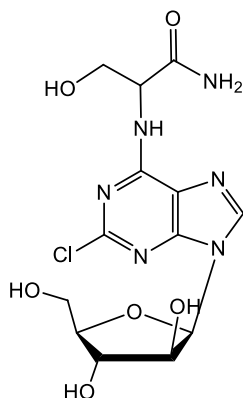


Рисунок 12 — Структурная формула активного соединений **12b** в Серии II

Рисунок 13 — Зависимость выживаемости клеток линии U937 от концентрации соединений **12b**, **23** и препарата сравнения неларабина

Остальные 2,6-замещенные пуриновые арабинозиды оценены как неперспективные в соответствии с заданным критерием активности при испытании на клетках линии U937 (IC_{50} более 50 мкМ). Тестирование Cl-Неларабина **25** или F-Неларабина **26** показало отсутствие противоопухолевых свойств ($IC_{50} > 50$ мкМ).

Выявлена корреляция между отсутствием свойств субстрата ADA у синтезированных арабинозидов и низкой противоопухолевой активностью в отношении клеток Т-лимфобластного лейкоза человека. ADA не может заменить аминокислотный остаток в положении С6 на гидроксил с образованием аналога активной молекулы Aга-G. Можно сделать вывод, что антипролиферативное действие соединения **12b** не зависит от действия внутриклеточной ADA. Таким образом, механизм антипролиферативной активности аналога серина **12b** отличается от механизма неларабина.

8. Флексимерные аналоги 8-аза-7-дезаза-аденозина (Серия III)

Флексимерные гетероциклические основания были синтезированы в Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН под рук. д.х.н., академика Кочеткова С.Н.

Основания 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1Н-пиразол **27**, 4-(2-аминопиридин-3-ил)-1Н-пиразол **28** и 4-(4-аминопиридин-5-ил)-1Н-пиразол **29** представляют собой проксимальные флексимерные аналоги аденозина (4'-5, С-С связь) (Рис.14). Отличительная особенность их строения - наличие пиразола вместо имидазола, который обычно входит в состав всех аналогов нуклеозидов пуринового ряда. В состав второго компонента цикла флексимерных оснований **27** и **28** входит пиридин, а в состав **29** - пиримидин.

Основания **27** – **29** оказались хорошими субстратами для PNP *E. coli* в синтезе рибозидов и 2'-дезоксирибозидов. В синтезе арабинозидов наблюдалась низкая эффективность, (образование менее 5% продукта за 96 часов). На Рис. 15 - 17 приведены полученные с помощью ВЭЖХ данные по конверсии оснований в соответствующие нуклеозиды.

Условия тестовых реакций: основание-акцептор (**27** – **29**, 2 мМ), донор углеводного основания 2'dUrd, Urd или AraU (4 мМ). В каждую реакцию смесь добавляли 3.2 ед. акт. PNP *E. coli*, в случае использования Urd и AraU добавляли еще 4 ед. акт. UP *E. coli*. Реакции проводили в 1.0 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7.0, термостатировали 96 ч при 50 °С.

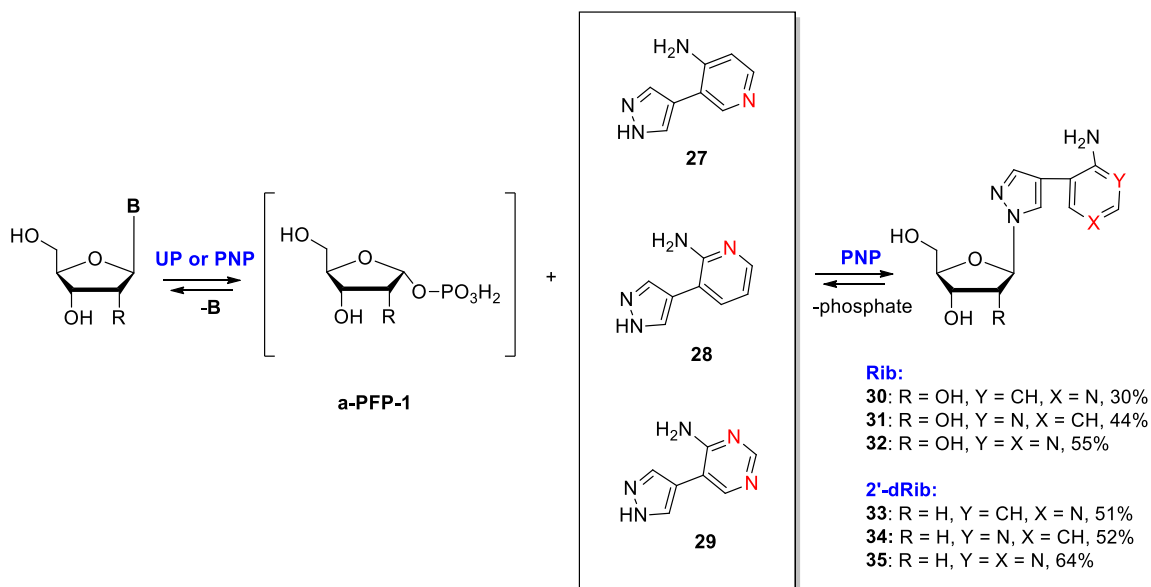


Рисунок 14 — Ферментативное трансгликозилирование флексимерных оснований с использованием рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз *E. coli*

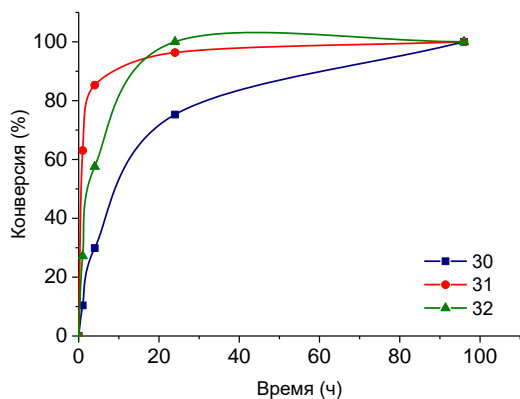


Рисунок 15 — Конверсия флексимерных оснований **27** – **29** в рибозиды **30** – **32**

Условия тестовых реакций: основание-акцептор (**27** – **29**, 2 мМ), донор углеводного основания 2'dUrd, Urd или AraU (4 мМ). В каждую реакцию смесь добавляли 3.2 ед. акт. PNP *E. coli*, в случае использования Urd и AraU добавляли еще 4 ед. акт. UP *E. coli*. Реакции проводили в 1.0 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7.0, термостатировали 96 ч при 50 °С.

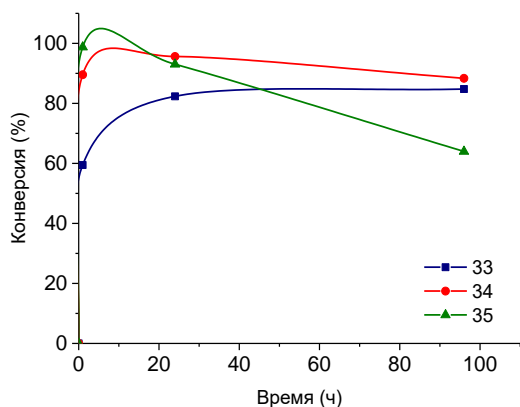


Рисунок 16 — Конверсия флексимерных оснований **27–29** в 2'-дезоксирибозиды **33–35**

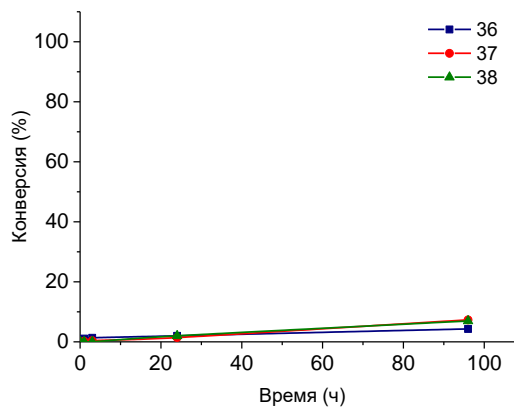


Рисунок 17 — Конверсия флексимерных оснований **27–29** в арабинозиды **36–38**

При оптимизации ферментативного синтеза с использованием различных доноров рибозы (аденозин (Ado); инозин (Ino); уридин (Urd)) и доноров 2-дезоксирибозы (2'-деоксиинозин (2'dIno); 2'-деоксиуридин (2'-dUrd)) было установлено, что конверсия оснований в нуклеозиды не зависела от типа донора углеводного остатка. При увеличении соотношения основание:донор углеводного остатка свыше 1:2 изменения не наблюдались. Уменьшение концентрации ферментов до 0.1 ед. акт./мл PNP и до 0.2 ед. акт./мл для UP уменьшало скорость образование конечного нуклеозида и увеличивало время реакции, но не влияло на конверсию, которая со временем достигала во всех экспериментах 98-100%. Полученные зависимости были одинаковы для флексимерных оснований **27 - 29**.

В результате оптимизации ферментативного синтеза были выбраны следующие условия препаративного синтеза нуклеозидов:

- в качестве донора углеводного остатка выбраны 2'-dUrd и Urd,
- соотношение основание:донор углеводного остатка 1:2,
- температура реакции 50 °С, pH 7.0 (10 мМ калий-фосфатный буфер),
- концентрация ферментов: 0.8 ед. акт./мл UP, 0.3 ед. акт./мл PNP.

9. Побочные продукты реакции трансгликозилирования (4-аминопиридин-3-ил)-1*H*-пиразола

Из трех представленных оснований в случае трансгликозилирования флексимера 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1*H*-пиразола **27** с использованием рекомбинантной PNP *E. coli* было обнаружено образование побочных продуктов реакции. Для определения структур этих образовавшихся соединений была проведена оптимизации условий синтеза с целью максимального накопления их в реакционных смесях. Затем осуществили их хроматографическое выделение и провели характеризацию с использованием методов масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии.

При синтезе рибозида **30** наблюдалось образование двух минорных продуктов **39** и **40**. Для 2'-дезоксирибозида **33** получался один минорный продукт **41** (Рис. 18).

В случае рибозилирования флексимерного основания **27** в первые сутки преимущественно наблюдается образование изомера **39**, где гликозилирование происходит по азоту аминопиридинового цикла. При дальнейшей инкубации реакционной смеси наблюдается одновременное увеличение количества изомера **40** и уменьшение количества изомера **39**, что, возможно, обусловлено вторичным гликозилированием изомера **39** по азоту пиразольного цикла (Рис. 19). В случае дезоксирибозилирования отмечается преимущественное гликозилирование по пиразольному циклу **33** и образование продукта бисгликозилирования **41** (Рис. 20).

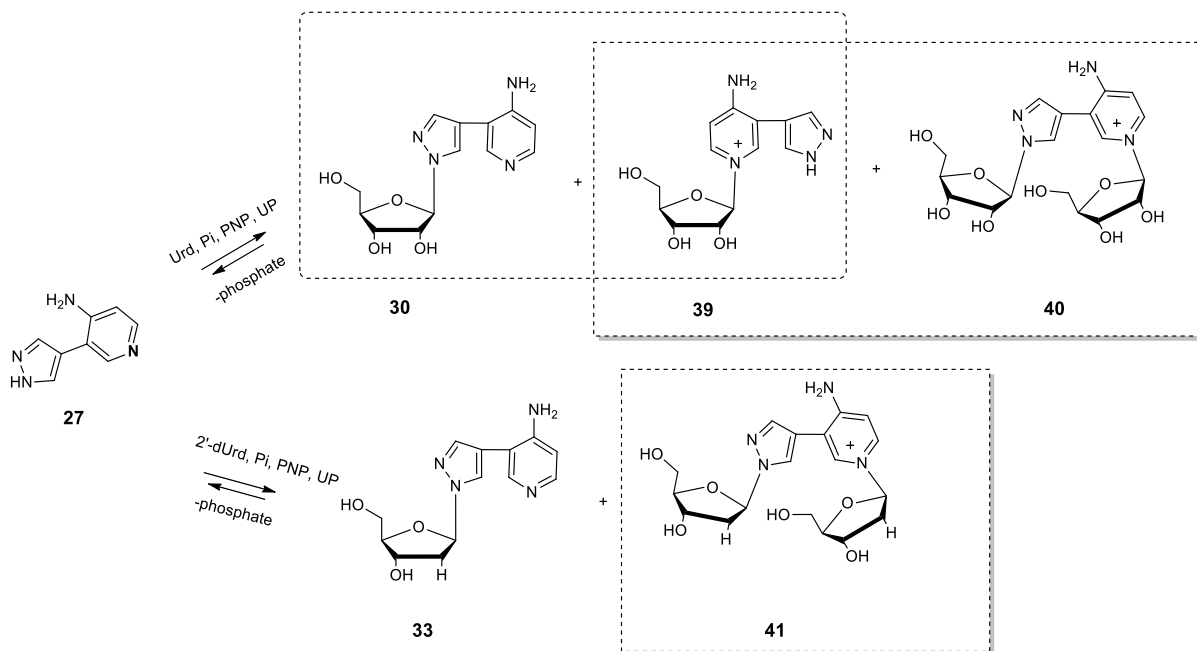


Рисунок 18 — Ферментативное трансгликозилирование флексимерного основания **27** с образованием побочных продуктов реакции.

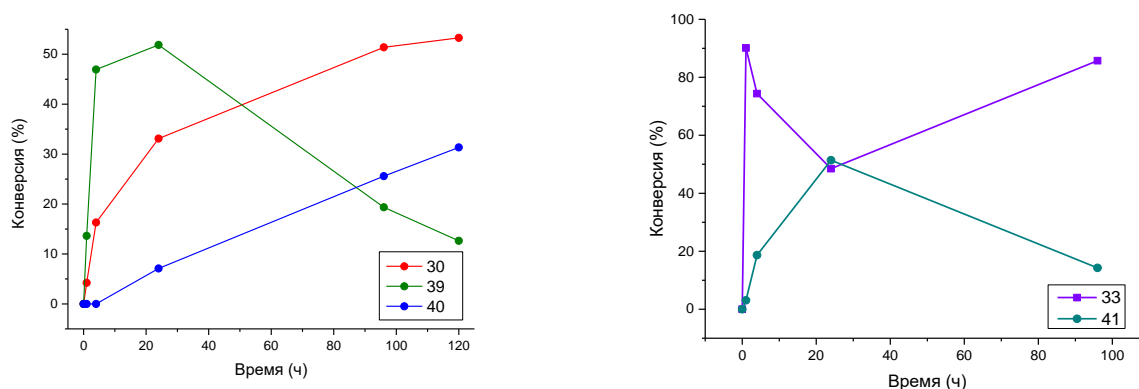


Рисунок 19 — Конверсия основания **27** в рибозиды **30**, **39** и бисгликозид **40**

Рисунок 20 — Конверсия основания **27** в 2'-дезоксирибозид **33** и бисгликозид **41**

Условия реакций: флексимерное основание **27** (2 мМ), Urd (20 мМ) или 2'-dUrd 20 мМ) в 1.0 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0), 1.5 ед. акт. PNP и 4 ед. акт. UP, 50 °С, 96 ч.

Для основания **27** были установлены оптимальные соотношения субстратов и количество ферментов в реакционной смеси и время реакции для получения максимально возможного количества минорных продуктов и установления их структуры.

В результате оптимизации ферментативного синтеза были выбраны следующие условия синтеза «аномальных» нуклеозидов:

- в качестве донора углеводного остатка выбраны 2'-dUrd и Urd,
- соотношение основание:донор углеводного остатка 1:10,
- температура реакции 50 °С, рН 7.0 (10 мМ калий-фосфатный буфер),
- концентрация ферментов: 0.8 ед. акт./мл UP, 1.5 ед. акт./мл PNP.

Таким образом, синтезировано девять новых флексимерных нуклеозидов, соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов были получены ^1H и ^{13}C ЯМР спектральные данные (включая $[\text{}^1\text{H}, \text{}^1\text{H}]$ и $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C}]$ 2D: COSY, HSQC, HMBC и NOE спектры).

10. Зависимость образования миноров флексимерных нуклеозидов от pH.

Было изучено влияние pH реакционной смеси на конверсию флексимерного основания в минорные и целевой нуклеозиды. Так как диапазон работы фермента составляет от 5.0 до 9.0 pH, реакции проводили в этом интервале pH. Условия тестовых реакций: основание-акцептор (2 мМ), донор углеводного основания 2'dUrd и Urd (20 мМ). В каждую реакционную смесь добавляли 1.5 ед. акт. PNP *E. coli*. Реакции проводили в 1.0 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7.0, 120 ч при 50 °С.

Была установлена зависимость образования пиразольного рибозида **30**, апинопиридинового рибозида **39** и бис-рибозида **40** от pH. Образование изомерного пиридингликозида в большей степени зависило от pH реакционной смеси: продукт нестабилен при pH 8 – 9, а при pH 5 – 7 его конверсия достигает 34 - 44%. При pH 8 – 9 конверсия основания **27** в рибозид **30** быстро достигает 36 % в течение 2 часов, а затем постепенно снижается до 10 – 14% в течение 48 часов. Конверсия основания **27** в бис-гликозид **40** при pH 8 - 9 была максимальной и составляла 32% за 120 часов. Образование продукта двойного гликозилирования останавливалось после того, как пиридингликозид **39** исчезал в реакционной смеси. На основании этих данных можно предположить, что именно пиридинрибозид **39** подвергается вторичному гликозилированию в активном центре фермента.

11. Квантово-химический анализ *ab initio*

Для подтверждения полученных данных и объяснения полученной pH-зависимости для флексимерного основания **27** был проведен кванто-химический анализ (*ab initio*), моделирующий структуру основания при разных значениях pH.

Квантово-химический анализ структуры флексимерного основания **27** (метод *ab initio* 6-31G**, СКО <0.3 ккал/моль) совместно с анализом литературных данных для структурно родственных гетероциклических соединений позволяет сделать следующие предположения.

Прежде всего, квантово-химический анализ свободной молекулы основания **27** показал, что пиразольный и пиридиновый фрагменты расположены в разных плоскостях (не компланарны), в некоторых случаях в близко перпендикулярных плоскостях. Такая ориентация двух фрагментов молекулы свидетельствует о слабом электронном влиянии одного на другой. Протонирование пиридинового фрагмента не изменяет электронной структуры пиразольного фрагмента, и наоборот, депротонирование пиразольного фрагмента приводит к незначительным изменениям пиридинового фрагмента.

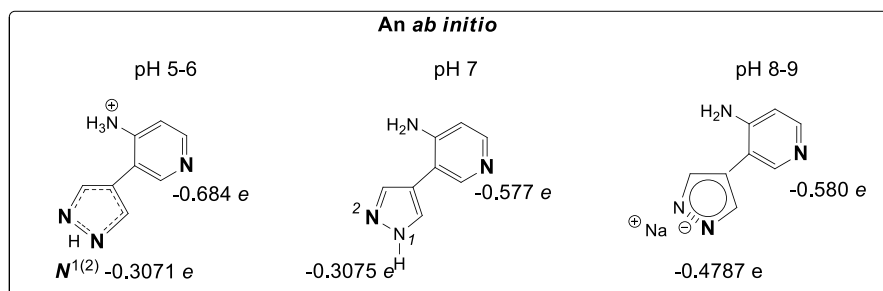


Рисунок 21 — Наиболее вероятные электронные структуры флексимерного основания **27** при различных значениях pH реакционной среды

Квантово-химический анализ соединения **27** в свободном состоянии в зависимости от формы аниона показал, что парциальный заряд sp^2 -атома азота пиридиновых фрагментов изменяется незначительно [$\Delta N_{аром} = -0.5803 - (-0.5759) = -0.0044 e$], в то время как парциальный заряд атома азота sp^2 пиразольного фрагмента существенно изменяется [$\Delta e = -0.4787 - (-0.3071) = -0.1716$] в сторону увеличения нуклеофильности (Рис. 21). По-видимому, это и является решающим фактором, определяющим наблюдаемые различия в скорости реакции синтеза региоизомеров рибозидов на начальной стадии реакции при pH 8-9 реакционной среды.

12. Сравнение ЯМР-спектров нуклеозида **39** с известными соединениями: анализ структурных характеристик

Существование нуклеозида **39** возможно в двух таутомерных формах: amino- и имино. Сначала предположили, что продукт существует в amino-форме, тогда ЯМР-спектр мог быть похож на спектр никотинамидрибозида (Fateev, Antonov et al. 2014). В нашем случае у минорного флексимерного рибозида **39** было обнаружено три сигнала N-H групп с химическими сдвигами 13.34, 8.55 и 7.42 м.д. (все сигналы широкие). Было замечено существенное расхождение в химических сдвигах протонов NH₂ группы: 7.42 и 8.55 м.д. Форма сигналов и химсдвиги не коррелировались с опубликованными данными ЯМР- спектров никотинамидрибозида.

В связи с этим было принято решение провести сравнительный анализ ЯМР спектров нового синтезированного нуклеозида с известными спектрами клитидина (Shirahama, H et al. 1998) (Рис. 22). Это позволило сделать выводы о структурных характеристиках и конформационных особенностях нового соединения, а также выявить возможные сходства и различия между никотинамид рибозидом, флексимерным рибозидом **39** и Клитидином.

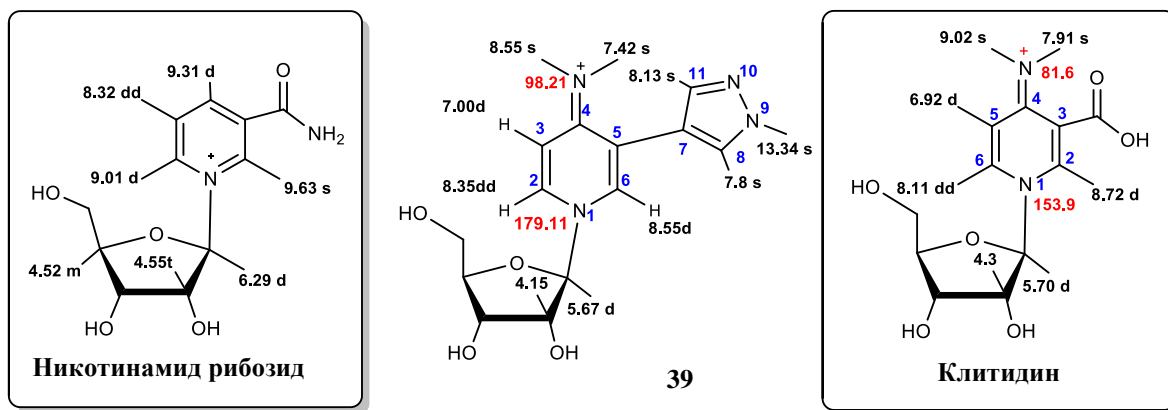


Рисунок 22 — Сравнение химсдвигов протонов в спектрах ЯМР никотинамид рибозида, флексимерного рибозида **39** и Клитидина

В литературе представлены данные ЯМР для клитидина со значениями химических сдвигов протонов иминогруппы 7.91 и 9.02 м.д. (Shirahama, H et al. 1998). Химические сдвиги протонов и формы сигналов спектра нашего нуклеозида и клитидина довольно близки, что может указывать на структурную аналогию между этими двумя соединениями и, скорее всего, нуклеозид **39** существует в имино-форме.

13. Моделирование взаимодействия флексимеров в активном сайте PNP *E. coli*

Для объяснения появления побочных продуктов в реакции гликозилирования основания **27** была предпринята попытка предсказать взаимодействие лиганда (в данном случае, флексимерных нуклеозидов) с активным центром PNP *E. coli* с использованием метода молекулярного моделирования.

Перед стыковкой флексимеров были проанализированы кристаллографические структуры пуриноклеозидфосфорилазы *E. coli*, депонированные на сайте ProteinDataBase. Это был шаг, необходимый для определения наиболее частых взаимодействий (водородные связи, π - π -стакинг и т. д.) активного центра PNP с различными вариантами лигандов. Были рассмотрены комплексы PNP со следующими соединениями в активном центре: 7-дезагипоксантин (PDB: 1PR5), ацикловир (PDB: 5I3C) и формицин А (PDB: 1K9S).

Сайт взаимодействия с пуриновыми основаниями формируется следующими остатками: Ser90, Cys91, Gly92, Ala156, Phe159, Phe 167, Val178, Glu179, Met180, Asp204 и Ile206. Четыре остатка - Ala156, Phe159, Val178 и Met180 - объединяются в гидрофобный карман, окружающий пуриновое основание. Остаток Asp204 взаимодействует и с атомом N7, и с заместителем при атоме C6 (=O) пуринового основания. Остаток Phe159 образует угол 60° с плоскостью пуринового кольца, что обеспечивает π - π взаимодействие между ароматическими системами, поддерживая их близко друг к другу. Сайт взаимодействия с рибозой сформирован следующими остатками: Met64, Phe159, Val178, Glu179, Met180, Glu181. Остаток Glu181 образует водородные связи с 2'- и 3'-гидроксильными группами рибозы.

Затем провели докинг природного субстрата (в данном случае, инозина) в активный центр для определения его наилучшей ориентации. Это было достигнуто путем проведения поиска подходящих конформаций. После успешного определения оптимального положения природного субстрата был проведен докинг новых флексимерных нуклеозидов. Основной целью этого этапа было обнаружение положений, аналогичных позиции природного субстрата, и дальнейшее исследование взаимодействий между новыми лигандами и аминокислотными остатками активного центра. В ходе анализа были учтены разнообразные типы взаимодействий, включая водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса, ионные взаимодействия и другие факторы. Стыковка была проведена в ограниченной области объемом $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$, что обеспечило достаточное пространство для размещения лиганда внутри каталитического центра. Порядок ранжирования комплексов был основан на вычисленных значениях энергии связи. Для дальнейшего анализа были выбраны состояния с наименьшей энергией, которые также характеризовались специфическими консервативными взаимодействиями лиганда и белка.

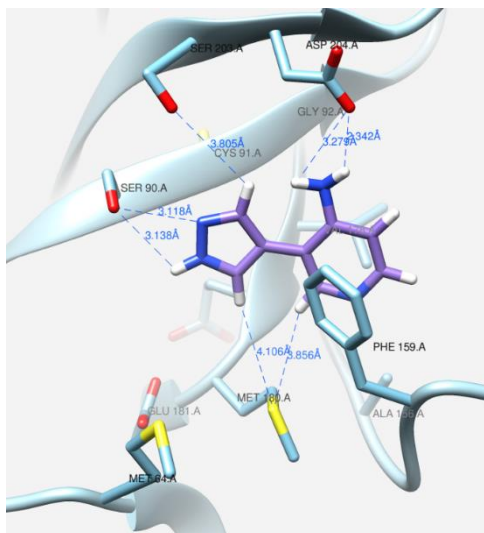
За связывание 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1Н-пиразола **27** и его ориентацию в месте связывания фермента ответственны те же аминокислотные остатки, что и при связывании природного пуринового основания. Он занимает карман, образованный следующими аминокислотами: Ser90, Met180, Ser203 и Asp204 и гидрофобным Phe159. Эксперименты по стыковке показали, что флексимерные основания и рибозиды локализуются в выбранном кармане связывания, свободная энергия связи (ΔG) и контактирующие аминокислотные остатки с типом взаимодействия указаны в Табл. 2.

Таблица 2 — Результаты стыковки инозина, флексимерного основания **27** и рибозидов **30** и **39**

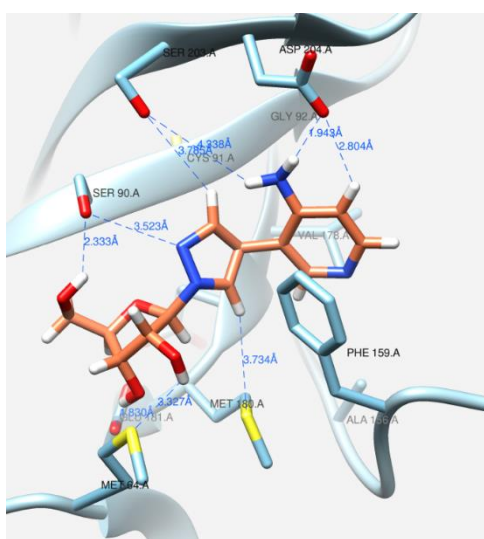
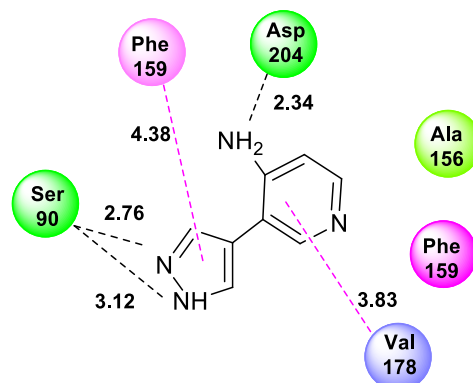
Модель	Кластер	Энергия (Ккал/моль)	ΔG (Ккал/моль)	Контактирующие АК-остатки с типом взаимодействия	
				Водородная связь	π - π взаимодействие
-	Инозин	7	13.56	-6.82	Ser90, Met64 Met180, Phe159, Val178, Glu179
Рис. 23А	Флексимерное основание 27	3	3.76	-6.55	Ser90, Asp204 Cys91, Val178
Рис. 23Б	Пиразольный рибозид 30	3	63.71	-7.07	Ser90, Cys91, Glu181, Asp204 Phe159, Val179, Met 180, Ile206
Рис. 24А	Флексимерное основание 27	4	7.00	-6.07	Ser90, Asp204 Cys91, Val178
Рис. 24Б	Пиримидиниевый рибозид 39	6	12.99	-7.80	Ser90, Met180, Glu181 Cys91, Val178
Рис. 25	Пиримидиниевый рибозид 39	0	25.75	-7.60	Ser90, Phe159, Asp204 Cys91

Благодаря гибкой структуре, которая обеспечивается С-С связью между пиразольным и пиридиниевым циклами, основание способно занимать разные позиции в активном центре. Особое внимание уделяется взаимодействиям ароматических колец аминопиримидина и пиразола с остатком Phe159 через π - π -взаимодействия.

Кроме того, важным фактором является образование водородной связи с Asp204. Когда пиридиниевый цикл размещается близко к остатку Phe159 и образуется водородная связь с аминогруппой Asp204, это позволяет азоту пиразольного кольца находиться в определенной позиции в активном центре, взаимодействовать с фосфатом рибозы и образовывать гликозидную связь (Рис. 23).



A



Б

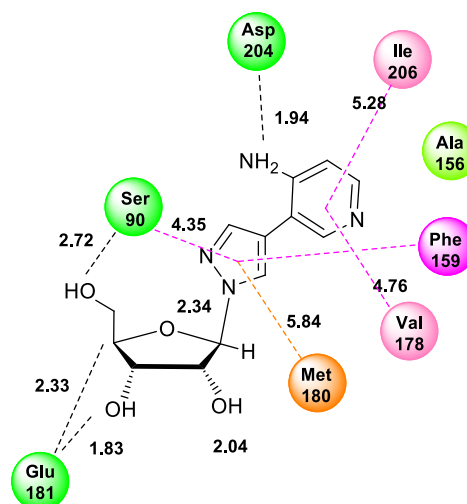
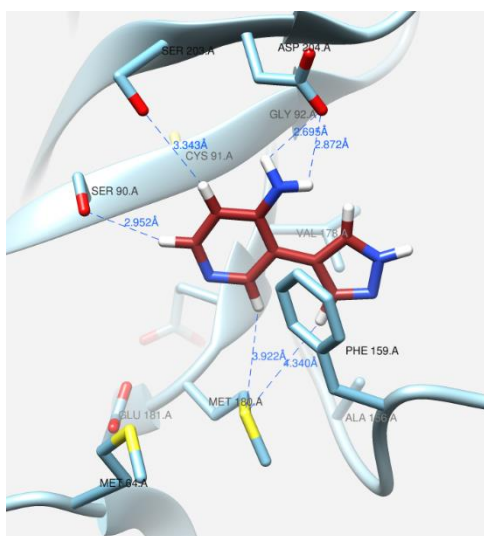


Рисунок 23 — Взаимодействия флексимерного основания **27** (А) и рибозида **30** (Б) в активном центре PNP

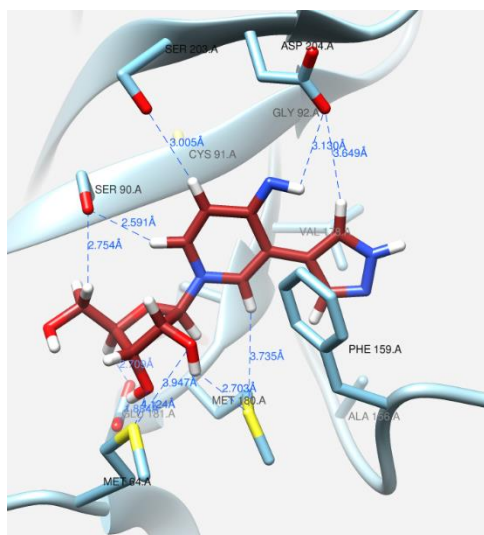
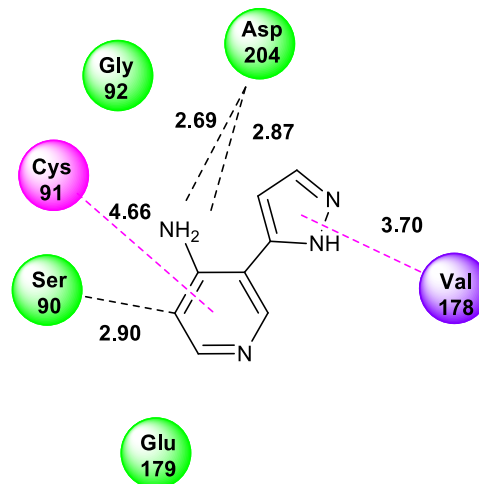
Маркировка типов взаимодействия на рисунках 23-25.

	Ван-дер-Ваальсово взаимодействие		π - π взаимодействие между двумя ароматическими группами Т-образным образом
	Водородная связь		π -взаимодействие электронного облака ароматического кольца кольца взаимодействует с амидной группой
	Углерод-водородная связь		π -взаимодействие электронного облака ароматического кольца кольца взаимодействует с алкильной группой
	π -электронное облако ароматического кольца взаимодействует с неподеленной парой электронного облака атома серы.		

Наоборот, при расположении пиразольного кольца непосредственно рядом с Phe159 и образовании водородной связи между протоном и Asp204 и, как было сказано раньше, достаточной нуклеофильности азота пиридинового цикла, происходит его гликозилирование (Рис. 24).



А



Б

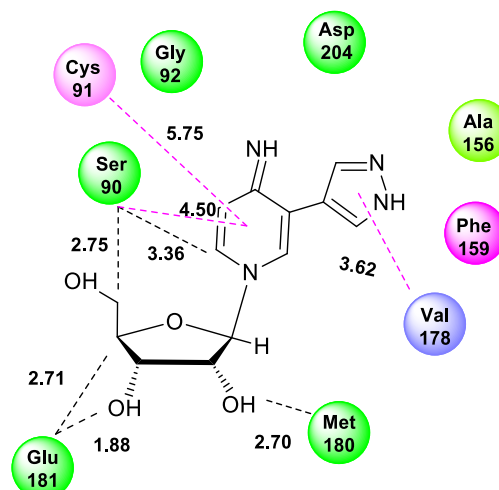


Рисунок 24 — Взаимодействия флексимерного основания **27** (А) и рибозида **39** (Б) в активном центре PNP

В случае пиридинового рибозида **39** следует обратить внимание на две возможные позиции в активном центре (Рис. 25). Присутствие кармана в области Phe159, Val 178 и Asp204 аминокислотных остатков позволяет расположить рибозу в этой области и дать гетероцическому основанию возможность занять позицию для последующего гликозилирования, которое может повторно протекать по пиразольному циклу. Возможно, именно такое расположение способствует вторичному гликозилированию и образованию побочного продукта бис-рибозида **40**. Это предположение подтверждается ранее полученными данными из экспериментов с рН, где изначально в реакционной смеси преобладает образование пиридинового рибозида, а затем медленно накапливается бисгликозид, в то время как количество пиридинового рибозида уменьшается до нуля.

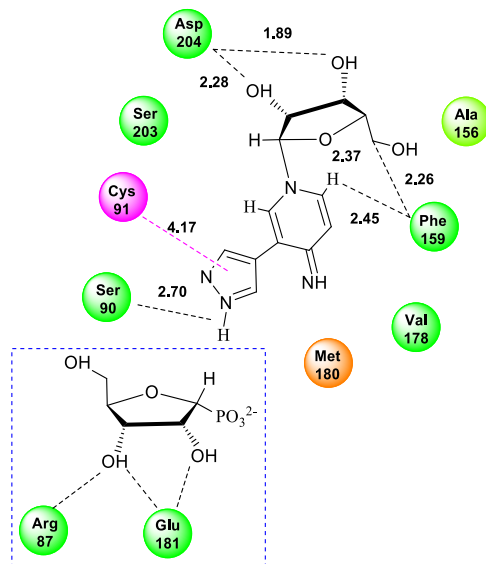
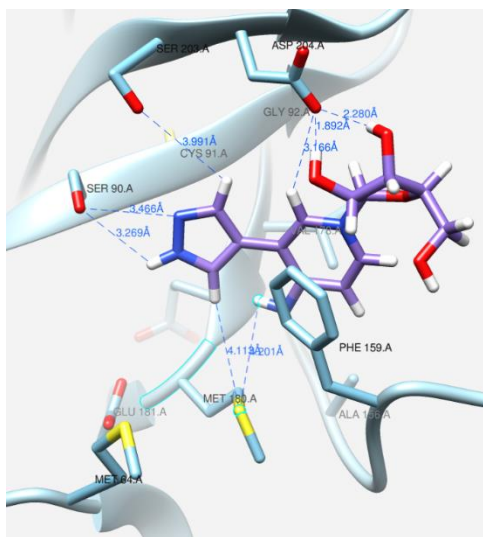


Рисунок 25 — Взаимодействия флексимерного рибозида **39** «альтернативная позиция» в активном центре PNP

14. Антивирусная активность флексимерных соединений

Для исследования противовирусной активности полученные флексимерные аналоги 8-аза-7-дезаза-аденозина были переданы в Институт медицинских исследований Rega (Левен, Бельгия).

Антивирусная активность флексимерных аналогов 8-аза-7-дезаза-аденозина была изучена на широкой панели ДНК- и РНК-содержащих вирусов: на респираторно-синцитиальном вирусе (RSV, штамм A Long), вирусах гриппа А (субтипы H1N1, H3N2) и гриппа В, вирусе желтой лихорадки (YFV, штамм 17 D), норовирусе (NoV, штамм GI), коронавирусах (HCoV OC43, HCoV 229E, NL63, SARS-CoV-2 UC-1074), вирусе простого герпеса 1 типа (HSV-1, штамм KOS), вирусе ветряной оспы (VZV, штаммы TK⁺ и TK), цитомегаловирусе человека (HCMV, штаммы AD-169 и Davis), папилломавирусе человека (штамм HEb_{11260.1}) и в Институте полиомиелита им. М.П. Чумакова на вирусе иммунодефицита человека (HIV-1), вирусе чикунгунья, вирусе Эбола, коронавирусе (SARS-CoV-2 штамм GISAID ID EPI_ISL_428851) и вирусе клещевого энцефалита (TBEV).

Цитотоксичность соединений была оценена на нескольких клеточных линиях (почки собаки Майдин-Дэрби (MDCK), легкого эмбриона человека (HEL299), эпителия почки африканской зеленой мартышки (Vero), печени человека (гепатокарцинома, Huh7). Исследуемые соединения были нетоксичны в концентрации ≥ 100 мкМ.

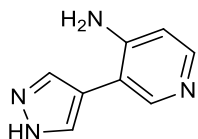
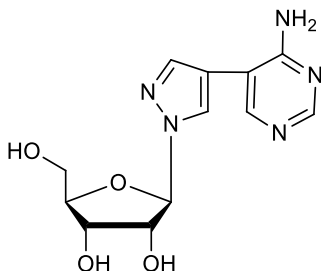


Рисунок 26 — Соединения, показавшие умеренную антивирусную активность

4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразол **27** подавлял вирус желтой лихорадки с EC₉₀ 11.3 мкМ и норовирус с EC₅₀ 4.2 мкМ.



1-β-D-Рибофуранозил-4-(4-аминопиримидин-5-ил)пиразол **32** в концентрации 80 мкМ способен ослаблять цитопатический эффект на клетки, вызванный SARS-CoV-2

15. Антибактериальная активность флексимерных соединений

Для исследования антибактериального действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии, полученные флексимерные аналоги 8-аза-7-дезаза-аденозина были переданы в Научно-исследовательский Институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе.

Антимикробную активность изучали на 10 коллекционных тест-культурах – 6 грамположительных бактериях (*Staphylococcus aureus* FDA 209P (MSSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Bacillus subtilis* ATCC 6633; стрептококкоподобные бактерии *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus luteus* штамм NCTC 8340, *Mycobacterium smegmatis* MC² 155), 2 грамотрицательных бактериях (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) и двух грибах (*Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259).

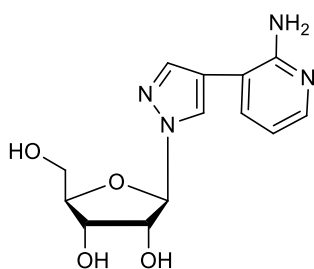


Рисунок 27 — Соединение, показавшее умеренную антибактериальную активность

1-(β-*D*-рибофуранозил)-4-(2-аминопиридин-3-ил)-1*H*-пиразол **31** проявил избирательное воздействие на *Mycobacterium smegmatis* в концентрации 10 мкг/мл.

Выводы

В результате выполнения экспериментальных работ получены следующие основные результаты:

- Показано, что объемные гетеродимерные модифицированные гетероциклические основания, содержащие 2,3-дигидро-7,8-дифтор-бензоксазин, присоединенный непосредственно к С6 положению пурина или через остаток аминокaproновой кислоты, являются субстратами бактериальной PNP в реакциях 2'-дезоксид-, рибо-, арабинозилирования. Оптимизированы методы ферментативного синтеза производных первой серии и получена серия из одиннадцати новых модифицированных нуклеозидов и углеводными остатками трех типов (рибоза, 2-дезоксидрибоза и арабиноза) (**Серия I**). Проведено изучение противовирусной активности шести синтезированных нуклеозидов на моделях вируса простого герпеса 1-го типа (эталонный штамм ВПГ-1/L₂), а также штамма ВПГ-1/L₂/R, резистентного к ацикловиру: рибозиды (*S*)-**5** и (*R*)-**5** проявляют значительную селективную активность в отношении ВПГ-1 *in vitro*, включая устойчивый к ацикловиру штамм вируса с ХТИ >32 и 23, соответственно (ИД₅₀ = 37.11 мкМ).
- Впервые было показано, что модифицированные пуриновые рибозиды с атомом хлора по С2 и с хиральными аминокислотами по С6 положениям являются хорошими субстратами пуриннуклеозидфосфорилазы. Оптимизированы условия проведения ферментативного синтеза и синтезировано двенадцать модифицированных арабинозидов, содержащих остатки хиральных аминокислот в С6 положении (**Серия II**). Впервые в синтезе модифицированных арабинозидов использован параллельный процесс арсенлиза исходного рибозида с целью упрощения состава реакционных смесей и выделения целевых нуклеозидов. Исследована противоопухолевая активность (в отношении лейкомической моноцитарной лимфомы человека линия U937) двенадцати синтезированных нуклеозидов Серии II. Для сериламидного аналога **12b** показано наличие антипролиферативной активности с IC₅₀ = 16 μМ, что сопоставимо с активностью препарата сравнения неларабина (IC₅₀ = 3.3 μМ).
- Синтезирована серия новых флексимерных модифицированных нуклеозидов аналогов 8-аза-7-дезаза-аденозина (4'-5, С-С связь между гетероциклическими основаниями, **Серия III**): шесть новых модифицированных нуклеозидов с углеводными остатками двух типов (рибоза, 2-дезоксидрибоза). Впервые наработаны и охарактеризованы минорные соединения, являющиеся региоизомерами реакции трансгликозилирования и продуктами бисгликозилирования гетероциклического основания 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1*H*-пиразола (три соединения). Проведен анализ активного центра с помощью методов компьютерного моделирования *in silico*, предсказаны возможные структуры комплексов региоизомеров и продуктов бисгликозилирования в активном центре PNP *E. coli*. Изучена антивирусная

активность флексимерных нуклеозидов на широкой линейке ДНК- и РНК-содержащих вирусов. 1- β -D-Рибофуранозил-4-(4-аминопиримидин-5-ил)пиразол в концентрации 80 мкМ способен ослаблять цитопатический эффект на клетки, вызванный SARS-CoV-2. Антимикробную активность изучали на 10 коллекционных тест-культурах: грамположительные, грамотрицательные бактерии, грибы. Нуклеозид 1-(β -D-рибофуранозил)-4-(2-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразол проявил избирательное воздействие на *Mycobacterium smegmatis* в концентрации 10 мкг/мл.

Реакции трансгликозилирования, осуществляемые рекомбинантной пурииннуклеозидфосфорилазой *E. coli*, остаются эффективным и удобным способом синтеза новых модифицированных нуклеозидов с нетипичными основаниями. Полученные данные о субстратной специфичности фермента свидетельствуют о его способности эффективно катализировать реакции с разнообразными субстратами. Проведенное исследование позволило создать библиотеки новых модифицированных нуклеозидов для изучения их биологической активности и выявить среди них активные соединения.

Список опубликованных научных работ

Статьи: 1. B.Z. Eletskaaya, I.D. Konstantinova, A.S. Paramonov, R.S. Esipov, D.A. Gruzdev, A.Yu. Vigorov, G.L. Levit, A.I. Miroshnikov, V.P. Krasnov and V.N. Charushin. Chemoenzymatic arabinosylation of 2-aminopurines bearing the chiral fragment of 7,8-difluoro-3-methyl-3,4-dihydro-2H-[1,4]benzoxazines // *Mendeleev Commun.*, 2016, 26, p. 6–8. DOI: 10.1016/j.mencom.2016.01.003 (IF 1.741, Q3)

2. B. Z. Eletskaaya, D. A. Gruzdev, V. P. Krasnov, G. L. Levit, M. A. Kostromina, A. S. Paramonov, A.L. Kayushin, I.S. Muzyka, R. S. Esipov, V.L. Andronova, G.A. Galegov, V.N. Charushin, A.I. Miroshnikov and I. D. Konstantinova. Enzymatic Synthesis of Novel Purine Nucleosides Bearing a Chiral Benzoxazine Fragment // *Chemical Biology & Drug Design (Chem Biol Drug Des)*, 2019, V. 93, p.605-616, DOI: 10.1111/cbdd.13458 (IF 2.328, Q3)

3. A. Khandazhinskaya, B. Eletskaaya, I. Fateev, M. Kharitonova, I. Konstantinova, V. Baray, A. Azhayev, M. Hyvonen, T. Keinanen, S. Kochetkov, K. Seley-Radtke, A. Khomutov and E. Matyugina. Novel fleximer pyrazole-containing adenosine analogues: chemical, enzymatic and highly-efficient biotechnological synthesis // *Org. Biomol. Chem.*, 2021, 19 (34), 7379, DOI: 10.1039/D1OB01069G (IF 3.876, Q1)

4. Eletskaaya B.Z., Berzina M.Ya., Fateev I.V., Kayushin A.L., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Zorina E.A., Antonov K.V., Paramonov A.S., Muzyka I.S., Zhukova O.S., Kiselevskiy M.V., Miroshnikov A.I., Esipov R.S., Konstantinova I.D. Enzymatic synthesis of 2- chloropurine arabinonucleosides with chiral amino acid amides at the C6 position and an evaluation of antiproliferative activity *in vitro*. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(7), 6223. DOI: 10.3390/24076223 (IF 6.208, Q1)

Патент: 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 -L-сериламидо)-2-хлорпурина. // Патент РФ № RU 2563257 C1 от 20.09.2015. Бюл. №26.

Тезисы: 1. В.П. Краснов, Д.А. Груздев, А.Ю. Вигоров, Г.Л. Левит, И.Д. Константинова, Б.З. Елецкая, И.В. Фатеев, В.Н. Чарушин. Синтез новых нуклеозидов с противоопухолевой активностью на основе конъюгатов 2-аминопурина с аминокислотами и хиральными аминами. // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» Москва 2014. Российский биотерапевтический журнал. 2014. – Т. 13., № 1. – С. 101.*

2. О.С. Жукова, М.В. Киселевский, Л.В. Фетисова, Б.З. Елецкая, А.О. Денисова, М.Я. Берзина, А. Л. Каюшин, И. Д. Константинова. Цитотоксическая активность пуриновых нуклеозидов, модифицированных хиральными аминокислотами. // *Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты».* Москва 2015. *Российский биотерапевтический журнал. 2015. – Т. 14., № 1. – С. 82.*

3. Груздев Д.А., Елецкая Б.З., Вигоров А.Ю., Константинова И.Д., Левит Г.Л., Краснов В.П., Чарушин В.Н., Мирошников А.И. Биотехнологический синтез новых нуклеозидов на основе 2-аминопурин-6-ил производных 2,3-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]бензоксазина // VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Март 17-20, 2015. Сборник тезисов ч. 2, с. 461-463.

4. B.Z. Eletskaaya, D.A. Gruzdev, A.Y. Vigorov, I. D. Konstantinova, G.L. Levit, V.P. Krasnov, V.N. Charushin, A.I. Miroshnikov. Biotechnological synthesis of new nucleosides based on 2-aminopurine with a bulky 7,8-difluoro-3,4-dihydro-3-methyl-2h-[1,4] benzoxazine residue at C6 position.//40th FEBS Congress, Berlin. – 2015. – *FEBS Journal.*: 40th FEBS Congress, Vol. 282 (Suppl. 1), p. 161.

5. D.A. Gruzdev, A. Y. Vigorov, B.Z. Eletsкая, I.D. Konstantinova, G.L. Levit, V.P. Krasnov, V.N. Charushin, A.I. Miroshnikov. Biotechnological synthesis of new nucleosides based on 2-aminopurine with an amino acid fragment at C6 position. // 41st FEBS Congress, 2016 - The FEBS Journal, Vol. 283 (Suppl. 1), p. 154.
6. М.Я. Берзина, Б.З. Елецкая. Синтез и свойства новых нуклеозидов, модифицированных по 2 и 6 положениям пуринового основания. // Сборник тезисов XXIX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2017, С.75.
7. D.A. Gruzdev, B.Z. Eletsкая, G.L. Levit, V.L. Andronova, G.A. Galegov, I.D. Konstantinova, V.N. Charushin, V.P. Krasnov. Chemo-enzymatic synthesis and antiherpesvirus activity of novel 6-substituted purine-based nucleosides. // 42st FEBS Congress, 2017 - The FEBS Journal, Vol. 284 (Suppl. 1), p. 332-333.
8. Chemo-enzymatic transglycosylation of 2-aminopurine derivatives bearing bulky functional groups. Gruzdev, D.A.; Eletsкая, B.Z.; Vigorov, A.Y.; Chulakov, E.N.; Levit, G.L. ; Konstantinova, I.D.; Charushin, V.N.; Krasnov, V.P. FEBS OPEN BIO, V. 8 (Suppl. 1), p. 116. July 2018.
9. *nido*-Carborane-containing purine derivatives as precursors of boronated nucleosides. Angelina A. Telegina, Dmitry A. Gruzdev, Barbara Z. Eletsкая, Galina L. Levit, Irina D. Konstantinova, Victor P. Krasnov. // IUBMB-FEBS-PABMB Congress 2022.
10. Новые флексимерные аналоги пуриновых нуклеозидов: дизайн, синтез и возможности биологического применения. Матюгина Е.С., Елецкая Б.З., Фатеев И.В., Константинова И.Д., Хандажинская А.Л., Кочетков С.Н. Всероссийская конференция. Синтетическая биология и биофармацевтика. 24–28 июля 2022 г., Новосибирск, Россия.
11. Получение нуклеозид-пептидных конъюгатов методом ферментативной транспептидации для направленной химиотерапии. Елецкая Б.З., Берзина М.Я., Миронов А.Ф., Жаворонкова О.Н., Гаврилов Л.А., Константинова И.Д., Мелихова Т.Д. Всероссийская конференция. Синтетическая биология и биофармацевтика. 24–28 июля 2022 г., Новосибирск, Россия.
12. B.Z. Eletsкая, A.F. Mironov, E.S. Matyugina, A.L. Khandazhinskaya, R.S. Esipov, S.N. Kochetkov and I.D. Konstantinova. Biosynthesis of fleximer analogues of purine nucleosides, by-product of transglycosylation. International scientific conference “Actual Problems of Chemistry of Natural Compounds”, p.22, March 2023, Tashkent.