

**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*

**Елецкая Барбара Златковна**

**Биосинтез модифицированных нуклеозидов с нетипичными  
гетероциклическими основаниями**

Специальность 1.4.9 - Биоорганическая химия

Диссертация на соискание  
ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.х.н., в.н.с. Константинова И.Д.

Москва 2023 г.

## Оглавление

Оглавление .....	2
Список сокращений .....	5
Введение .....	7
Цели и задачи исследования .....	8
Научная новизна и научно-практическая значимость .....	8
Апробация работы.....	10
Доклады на конференциях .....	11
1. Обзор литературы.....	12
1.1 Модифицированные нуклеозиды.....	12
1.2 Основные области применения нуклеозидных аналогов .....	14
1.2.1 Класс противовирусных препаратов. ....	14
1.2.2 Класс цитотоксических препаратов.....	16
1.2.3 Класс антибактериальных и противогрибковых нуклеозидных антибиотиков. ....	18
1.2.4 Класс модифицированных нуклеозидов агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов.....	19
1.3 Основные структурные и химические модификации нуклеотидных/нуклеозидных аналогов.....	21
1.4 Химический синтез нуклеозидов .....	22
1.5 Новые перспективные методы получения модифицированных нуклеозидов .....	28
1.6 Сравнение эффективности химического и химико-ферментативного синтезов на примере неларабина.....	30
1.7 Примеры нерегиоселективности ферментативного катализа .....	36
1.8 Пуриннуклеозидфосфорилаза <i>E. coli</i> в качестве ключевого фермента реакции трансгликозилирования .....	38
1.9 Субстратная специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы <i>E. coli</i> .....	40
2 Обсуждение результатов .....	43
2.1 Синтез модифицированных нуклеозидов .....	43
2.1.1 Синтез гетеродимерных нуклеозидов 2-аминопурина с 2,3-дигидро-7,8-дифторбензоксазиновыми заместителями (Серия I) .....	45
2.1.2 Изучение субстратной специфичности аденозиндезаминазы ADA <i>E. coli</i> и из кишечника теленка (ADA CI).....	51

2.1.3	Исследование противовирусной активности бензоксазиновых нуклеозидов Серии I <i>in vitro</i> .....	52
2.1.4	Выводы по разделу 2.1 .....	55
2.2	Синтез модифицированных по 6-му положению аналогов 2-хлорпурина (Серия II) .....	56
2.2.2	Арсенолиз в синтезе модифицированных пуриновых арабинонуклеозидов Серии II. ....	59
2.2.3	Изучение субстратной специфичности аденозиндезаминазы ADA <i>E. coli</i> .....	62
2.2.4	Исследование цитотоксической активности 2,6-замещенных пуриновых арабинозидов на опухолевых клетках человека <i>in vitro</i> .....	66
2.2.5	Выводы по разделу 2.2 .....	68
2.3	Флексимерные аналоги 8-аза-7-дезаза-аденозина (Серия III) .....	69
2.3.1	Побочные продукты реакции трансгликозилирования (4-аминопиридин-3-ил)-1 <i>H</i> -пиразола.....	72
2.3.2	Зависимость образования минорных нуклеозидов от рН.....	74
2.3.3	Квантово-химический анализ <i>ab initio</i> .....	75
2.3.4	Сравнение ЯМР-спектров нового соединения с известными соединениями: анализ структурных характеристик .....	76
2.3.5	Моделирование взаимодействия флексимеров в активном сайте PNP <i>E. coli</i> .....	78
2.3.6	Антивирусная активность.....	83
2.3.7	Антибактериальная активность .....	84
2.3.8	Выводы по разделу 2.4 .....	85
3	Экспериментальная часть .....	86
3.1	Материалы и оборудование.....	86
3.2	Методы .....	87
3.2.1	Изучение субстратно - специфических свойств ферментов нуклеозидфосфорилаз .....	87
3.2.2	Общая методика синтеза нуклеозидов 2-аминопурина с 2,3-дигидро-7,8-дифтор-бензоксазиновыми заместителями (Серия I). ....	87
3.2.3	Общая методика синтеза дизамещенных аналогов аденозина (Серия II).....	88
3.2.4	Общая методика синтеза флексимерных аналогов 8-аза-7-дезаза-аденозина (Серия III) .....	89
3.2.5	Изучение субстратной специфичности аденозиндезаминазы ADA <i>E. coli</i> и из кишечника теленка (ADA CI).....	89
3.2.6	Ингибирование рекомбинантной ADA <i>E. coli</i> .....	89
3.3	Данные спектров ЯМР .....	96
3.3.1	Аналоги 2-аминопурина (Серия I).....	96

3.3.2	Аналоги 2-хлорпурина (Серия II) .....	101
3.3.3	Флексимерные аналоги 8-аза-7-дезаза-аденозина (Серия III) .....	105
3.4	Молекулярное моделирование .....	108
4	Выводы .....	109
	Список литературы .....	111

### Список сокращений

1-Ara-P –  $\alpha$ -D-арабинофуранозо-1-фосфат

2'-dAdo – 2'-дезоксиаденозин

2'-dIno – 2'-дезоксиаденозин

2'-dUrd – 2'-дезоксиуридин

ADA – аденозиндезаминаза

Ado – аденозин

AraA – 9- $\beta$ -D-арабинофуранозиладенин

AraG – 9- $\beta$ -D-арабинофуранозилгуанин

AraU – 1- $\beta$ -D-арабинофуранозилурацил

Cl-Ado – 2-хлораденозин

Cl-AraA – 2-хлор-9- $\beta$ -D-арабинофуранозиладенин

Cl-Nelar – 2-хлор-6-*O*-метил-(9- $\beta$ -D-арабинофуранозил)гуанин

CMV – цитомегаловирус

COVID – короновирусная инфекция

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств

HCMV – цитомегаловирус человека

HCV – вирус гепатита С

HEL299 – линия клеток легкого эмбриона человека

HIV – вирус иммунодефицита человека

HSV – вирус простого герпеса

Huh 7 – линия клеток ленок печени человека (гепатокарцинома)

Ino – инозин

IC<sub>50</sub> – концентрация препарата, ингибирующая жизнеспособность культуры клеток на 50%

*in silico* – термин, обозначающий компьютерное моделирование (симуляцию) эксперимента

*in situ* – термин для обозначения оригинального (первичного, без перемещения) места проведения опытов, наблюдений и экспериментов.

*in vitro* – термин и методика выполнения экспериментов, когда эксперименты проводятся «в пробирке»

*in vacuo* – в вакууме

MDCK – линия клеток почки собаки Майдин-Дэрби

NDT – N-дезоксирибозилтрансферазы

NoV – норовирус

NP – нуклеозидфосфорилазы

PerT1 – олигопептидный транспортер

PNP – пуриннуклеозидфосфорилаза  
 PyNP – пиримидиннуклеозидфосфорилазы  
 RMSD – среднее квадратичное отклонение  
 RSV – респираторно-синцитиальный вирус  
 SARS-CoV-2 – коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом  
 TBEV – вирус клещевого энцефалита  
 TMSOTf – триметилсилилтрифлат  
 TP – тимидиннуклеозидфосфорилаза  
 U937 – линия клеток лейкомиической моноцитарной лимфомы человека  
 UP – уридиннуклеозидфосфорилаза  
 UP – уридинфосфорилаза  
 Urd - уридин  
 Vero (E6) - линия клеток из эпителия почки африканской зеленой мартышки  
 VZV – вирус ветряной оспы  
 YFV – вирус желтой лихорадки  
 АК – аминокислота  
 БОЕ – бляшкообразующая единица  
 ВПГ-1 – вирус простого герпеса 1 типа  
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
 ГЦО – гетероциклическое основание  
 ИД<sub>50</sub> – эффективная концентрация соединения, обеспечивающая 50% защиту клеток от цитопатического действия вируса  
 ИД<sub>95</sub> – эффективная концентрация соединения, обеспечивающая 95% защиту клеток от цитопатического действия вируса  
 МПК – максимально переносимая концентрация – наибольшая концентрация соединения, не вызывающая деструктивных изменений клеточного монослоя, видимых в световой микроскоп  
 РНК – рибонуклеиновая кислота  
 ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток  
 ТКМ – трансплантация костного мозга  
 Т-НХЛ – неходжкинская лимфома  
 Т-ОЛЛ – Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз  
 ТФУ – трифторуксусная кислота  
 ЦД<sub>50</sub> – цитотоксическая концентрация соединения, необходимая для снижения жизнеспособности клеток на 50%  
 ХТИ – индекс селективности  
 ЯМР – ядерный магнитный резонанс

## Введение

Аналоги пуриновых нуклеозидов, обладающие схожими с природными нуклеозидами механизмами транспорта, накопления и встраивания в ДНК и характером метаболизма, применяются в медицинской практике благодаря своему широкому спектру активности [1, 2].

На сегодняшний день по данным Web of Science опубликовано более тысячи работ, посвященных данной тематике. Синтезированы тысячи модифицированных нуклеозидов, и большое количество соединений находится в стадиях разработки и оценки их биологической активности. Предклинические исследования прошли несколько десятков аналогов, и они были одобрены U.S. Food and Drug Administration (FDA) для использования в клинической практике.

Необходимо выделить среди большого многообразия полученных аналогов ряд препаратов огромной биологической и медицинской важности, которые сейчас используются в лечении вирусных инфекций (ацикловир, валацикловир, рибавирин, марибавир, цидофовир, ремдесивир, валганцикловир, энтекавир), злокачественных новообразований (цитарабин, гемцитабин, меркаптопурин, азацитидин, кладрибин, децитабин, фторурацил, флоксуридин, флударабин, неларабин), ревматологических заболеваний (азатиоприн, аллопуринол), паразитарных и бактериальных (синефунгин, триметоприм, туберцидин, формицин В) и грибковых инфекций (флуцитосин).

Основные ограничивающие факторы для использования препаратов данного класса - системная токсичность, развитие резистентности, что снижает эффективность проводимой терапии, а также высокая стоимость получения субстанций. Поэтому поиск новых аналогов пуриновых нуклеозидов с более низкой токсичностью, обладающих высокой антиметаболической/противовирусной активностью, является актуальной задачей биоорганической химии и биотехнологии.

Использование рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз (NP) в производстве ряда модифицированных нуклеозидов (рибавирина, кладрибина, флударабина) упростило и удешевило технологии их получения. Такие биокатализаторы позволяют создать гликозидную связь без введения защит в углеводную и гетероциклическую части молекулы, очистки и выделения промежуточных продуктов синтеза. Стоит отметить еще одно преимущество биокаталитического подхода: не используются агрессивные реагенты и органические растворители, реакции протекают в технологически безопасных водных буферах, что отвечает требованиям современной биоиндустрии [3]. Развитие и оптимизация биотехнологического метода позволит получать библиотеки новых модифицированных пуриновых нуклеозидов для изучения их биологической активности.

### Цели и задачи исследования

Разработка биокаталитического способа синтеза серии новых модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями с помощью нуклеозидфосфорилаз:

- *Серия I* - аналоги 2-аминопурина из химерных по составу гетероциклических оснований, объединяющих молекулы двух классов в одной структуре: пуриновые гетероциклические основания, имеющие большие заместители - замещенные бензоксазиновые группы, присоединенные непосредственно к пуриновому основанию или через гексаноильный спейсер, с тремя типами углеводного остатка: рибозой, 2-дезоксирибозой и арабинозой;
- *Серия II* - дизамещенные аналоги аденозина - арабинозиды, несущие остаток оптически активной аминокислоты в C6 положении и атом хлора в C2 положении;
- *Серия III* - флексимерные аналоги 8-аза-7-дезаза-аденозина, представляющие собой проксимальные флексимерные аналоги аденозина (4'-5, C-C связь), где первый компонент цикла флексимерного основания - пиразол вместо имидазола, а второй компонент - аминопиримидин или аминопиримидин, с двумя типами углеводного остатка: рибозой и 2-дезоксирибозой.

Изучение противовирусных и антиметаболических свойств синтезированных соединений на биологических моделях *in vitro*.

### Научная новизна и научно-практическая значимость

Получены три серии новых нуклеозидов: а) одиннадцать нуклеозидов, модифицированных по C6 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 C6 положении и атомом хлора в C2 положении пурина, в) девять флексимерных аналогов пуриновых нуклеозидов двух типов – рибо- и 2-дезоксириборядов.

Впервые показано, что пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli* способны осуществлять реакцию гликозилирования пуриновых оснований, имеющих объемные заместители в C6 положении гетероциклического основания.

Проведена оптимизация ферментативных реакций синтеза и способов выделения новых замещенных модифицированных пуриновых нуклеозидов трех серий. Методы легко воспроизводятся и масштабируются.

Для достижения более полного понимания механизма функционирования активного центра PNP *E. coli* проведен предварительный анализ активного центра на основе данных из предыдущих публикаций. Затем с помощью методов компьютерного моделирования



предсказаны оптимальные структуры комплексов новых субстратов и аминокислотных остатков, образующих активный центр фермента. Это позволило предсказать ключевые взаимодействия между ферментом и субстратами, такие как водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса и другие взаимодействия. 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 теленка (CI) в отношении модифицированных нуклеозидов. Показано, что полученные С6 замещенные нуклеозиды не являются субстратами фермента. Арабинозиды, замещенные хиральными аминокислотами, проявили слабые ингибиторные свойства.

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

*Серия I:* Рибозиды-аналоги 2-аминопурина, где бензоксазиновый заместитель присоединен непосредственно к пуриновому основанию по С6 положению, проявляли значительную селективную активность в отношении вируса простого герпеса человека I типа *in vitro*, включая устойчивый к Ацикловиру штамм вируса. Рибозиды, замещенные бензоксазиновыми группами через гексаноильный спейсер, проявляли невысокую, но достоверную противовирусную активность на аналогичных моделях. Все синтезированные нуклеозиды показали низкую токсичность для культуры клеток Vero Е6.

*Серия II:* Для одного соединения из серии (С6 заместитель – L-сериламид) показана активность в отношении лейкемической моноцитарной лимфомы человека (линия U937). Его цитотоксическая активность сопоставима с активностью стандарта сравнения - цитостатического препарата Неларабина.

*Серия III:* Антивирусная активность флексимерных нуклеозидов была изучена на широкой линейке ДНК- и РНК-содержащих вирусов. 1-β-D-Рибофуранозил-4-(4-аминопиримидин-5-ил)пиразол способен ослаблять цитопатический эффект на клетки, вызванный коронавирусом 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*.

### Апробация работы

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

### Публикации

- B. Z. Eletsкая, 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)
- B. Z. Eletsкая, 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)
- A. Khandazhinskaya, B. Eletsкая, 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)
- Eletsкая 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. (IF 6.208, Q1). <https://doi.org/10.3390/24076223>

### 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 С1 от 20.09.2015. Бюл. №26.

### Доклады на конференциях

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-PABMB Congress, 2022 Лиссабон; Всероссийская конференция. "Синтетическая биология и биофармацевтика", 2022, Новосибирск; International scientific conference "Actual Problems of Chemistry of Natural Compounds", 2023, Ташкент.

## 1. Обзор литературы

### 1.1 Модифицированные нуклеозиды.

Природные нуклеозиды представляют собой уникальную основу для создания лекарственных препаратов благодаря своей вовлеченности в огромное количество биологических процессов [4]. Функции нуклеозидов включают в себя использование их в качестве основных строительных блоков для синтеза как ДНК, так и РНК [5]. Кроме того, они выполняют важную роль в качестве сигнальных молекул. Например, аденозин и аденин играют решающую роль в пуринергическом сигнальном пути, регулируя различные физиологические процессы и обеспечивая межклеточную коммуникацию во многих тканях и органах [6].

Некоторые нуклеиновые кислоты содержат модифицированные нуклеозиды, которые имеют огромное значение для регуляции и точности транскрипции и трансляции. Наиболее распространенная модификация - метилирование [7], но в тРНК обнаружены более сложные модификации, например, N6-модифицированные аденозины, содержащие аминокислотные остатки (Рис. 1) [8].

Обнаруженные в растительных системах цитокинины представляют собой N6-замещенные аденины (группа фитогормонов) с разнообразными биохимическими функциями, стимулирующими деление клеток и рост растений [8].

В биосинтетических путях такие конъюгаты нуклеозидов и фосфолипидов, как цитидиндифосфатдиглицерид и дезоксицитидиндифосфатдиглицерид, являются центральными липидными промежуточными продуктами для нескольких метаболических путей как у прокариот, так и у эукариот [9].

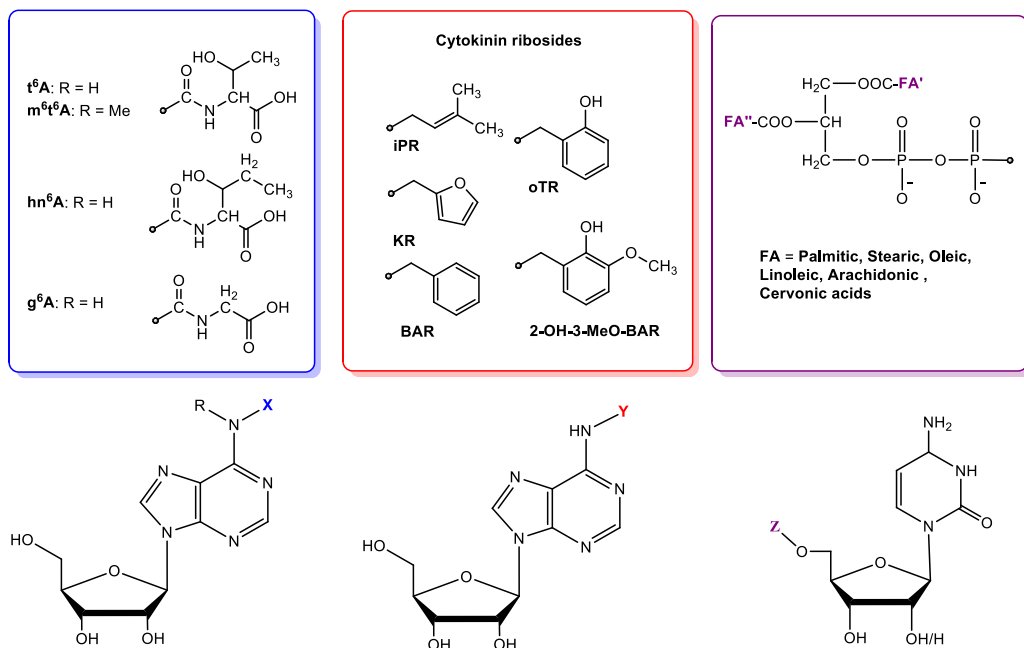


Рисунок 1 — Природные модифицированные нуклеозиды

Изучение механизмов воздействия нуклеозидов, включая их метаболические превращения, взаимодействия с ферментами, связанными с обменом нуклеиновых кислот, и рецепторами, а также процессы метаболической активации и деактивации, предоставило важные данные, которые способствовали разработке этой области и созданию серий синтетических модифицированных аналогов.

Имитация структуры природных нуклеозидов позволяет распознавать клеточными или вирусными белками такие аналоги, однако введенная модификация приводит к нарушению/прекращению репликации и последующего клеточного деления или другого биологического процесса (Рис. 2) [1, 10].



Рисунок 2 — Механизм действия аналогов нуклеозидов

Антиметаболиты на основе модифицированных нуклеозидов ингибируют ферменты включенные в нуклеиновый обмен: человеческую и/или вирусную полимеразы (ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, РНК-зависимую ДНК-полимеразу или РНК-зависимую РНК-полимеразу), киназы, дезаминазы, рибонуклеотидредуктазы, ДНК-метилтрансферазы, пурин- и пиримидиннуклеозидфосфорилазы. Эти воздействия имеют потенциальные преимущества – например, ингибирование роста клеток или ингибирование вирусной репликации, иммунодепрессорное действие

Направление разработки структуры и синтеза новых модифицированных нуклеозидов имеет большой потенциал и в настоящее время. Развитие смежных направлений предоставляет с каждым годом все больше информации для химиков-синтетиков о строениях каталитических

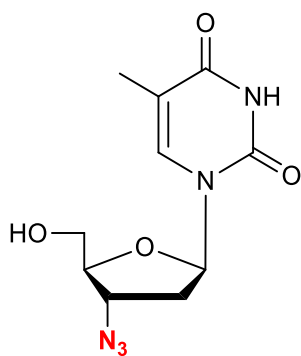
центров ферментов, рецепторов и их сайтов связывания с сигнальными молекулами [11, 12]. Поскольку такое «узнавание» зависит от ряда факторов: форма молекулы, электронное и водородное окружение, структура новых соединений может быть «спроектирована» или усовершенствована, основываясь на информации о сайтах связывания конкретной биологической мишени. Компьютерное моделирование взаимодействия активной молекулы и биологической мишени позволяет оптимизировать процесс создания новых соединений. Это делает возможным выбор подхода к созданию новых соединений, которые с наибольшей вероятностью вызовут необходимый биологический ответ. Такой подход позволил увеличить активность первоначально обнаруженных соединений-лидеров путем защиты их от катаболических превращений или улучшения их доставки к биомишеням [13]. Как показала практика, способность прогнозировать реакцию пациента на лекарственный препарат в основном основана на полученных знаниях о метаболизме лекарств того же класса и нацеливании на клеточные мишени, а также обходе механизмов резистентности [14-18].

## 1.2 Основные области применения нуклеозидных аналогов

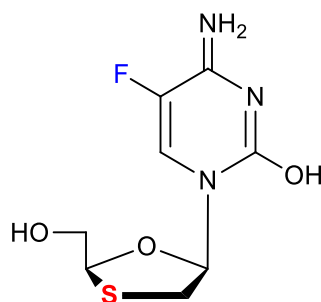
На основе выявленной биологической активности, аналоги нуклеозидов могут быть разделены на четыре основных класса.

### 1.2.1 Класс противовирусных препаратов.

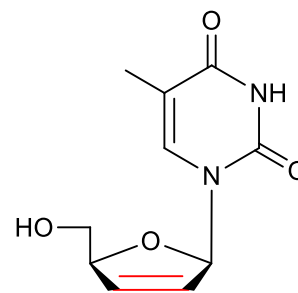
В настоящее время аналоги нуклеозидов широко используются в терапии инфекций, вызванной вирусом иммунодефицита человека (HIV) – зидовудин (1), эмтрицитабин (2), ставудин (3), ламивудин (4), абакавир (5); вирусом гепатита В (HBV) – ламивудин (4), адефовир (6), энтекавир (7), - вирусом гепатита С (HCV) – рибавирин (8), софосбувир (9); цитомегаловирусом (CMV) – марибавир (10), ганцикловир (11), вирусом простого герпеса (HSV) – ацикловир (12), валацикловир (13), фамцикловир (14), видарабин (15); вирусом ветряной оспы (VZV) – бривудин (16), видарабин (15) и коронавируса (COVID) – ремдесивир (17), молнупиравир (18), фавипиравир (19) [19-23].



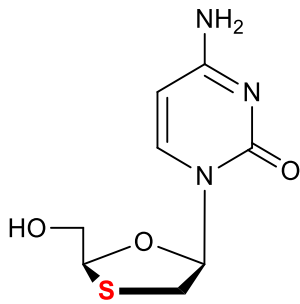
Зидовудин, 1



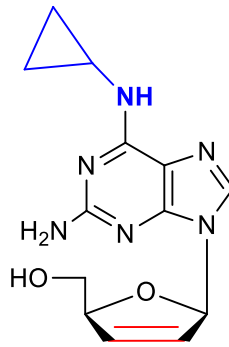
Эмтрицитабин, 2



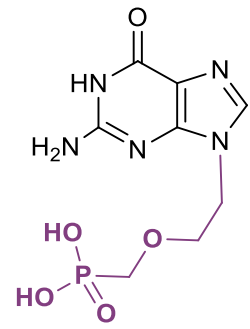
Ставудин, 3



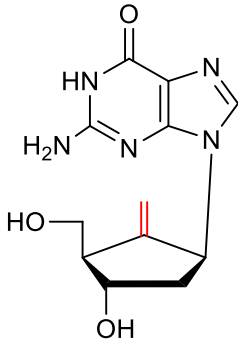
Ламивудин, 4



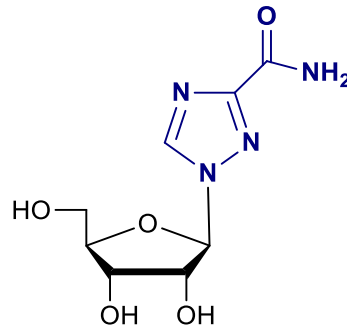
Абакавир, 5



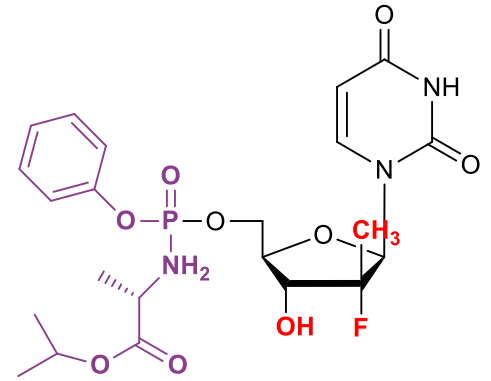
Адефовир, 6



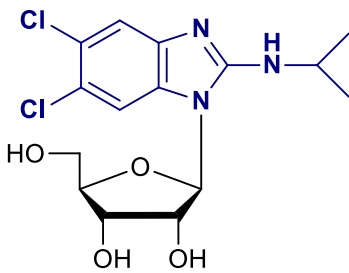
Энтекавир, 7



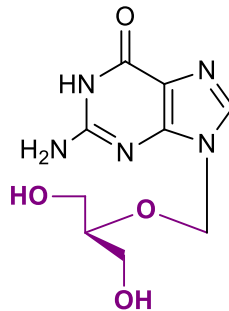
Рибавирин, 8



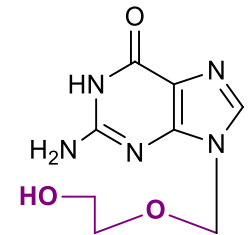
Софосбувир, 9



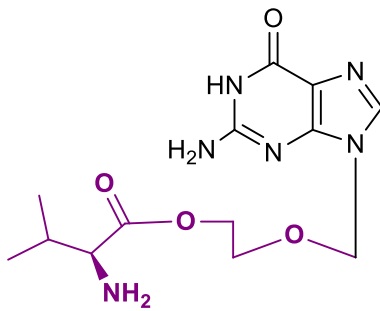
Марибавир, 10



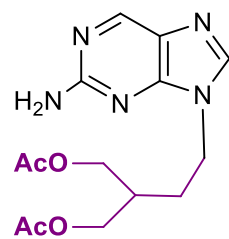
Ганцикловир, 11



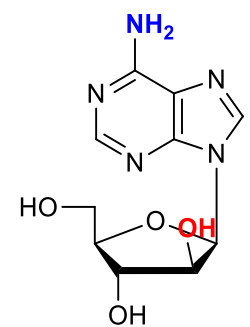
Ацикловир, 12



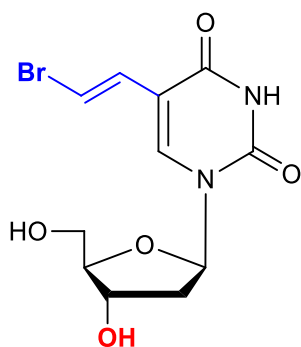
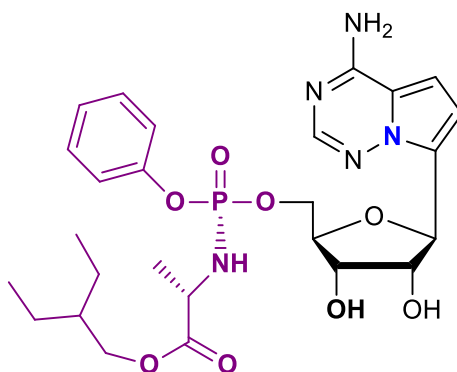
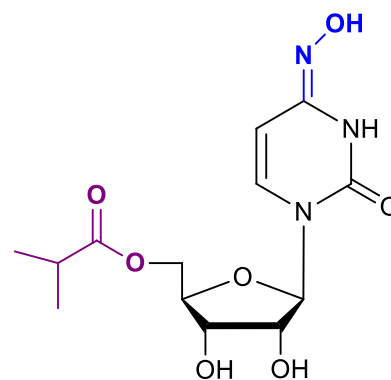
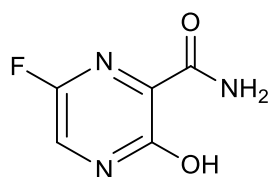
Валацикловир, 13



Фамцикловир, 14



Видарабин, 15

Бривудин, **16**Ремдесивир, **17**Молнупиравир, **18**Фавипиравир, **19**

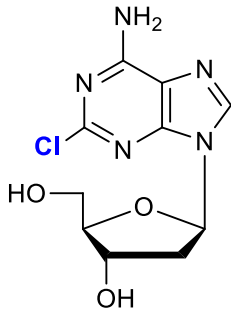
Нуклеозидные противовирусные аналоги подавляют репликацию вируса с помощью нескольких механизмов: либо путем конкурентного ингибирования вирусных ДНК-зависимых и/или РНК-зависимых ДНК-полимераз, либо путем блокирования 3'-гидроксильной группы дезоксирибонуклеиновой кислоты, что приводит к обрыву растущей молекулы ДНК.

### 1.2.2 Класс цитотоксических препаратов.

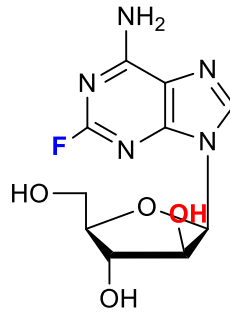
Множество производных пуриновых (кладрибин (**20**), флударабин (**21**), неларабин (**22**), клофарабин (**23**), флорезин (**24**) [24, 25], пиримидиновых (цитарабин (**25**), азацитидин (**26**), гемцитабин (**27**), флоксуридин (**28**)) [26] и нуклеозидов с нетипичными основаниями (пентостатин (**30**), трицирибин (**31**) [27], проявляют активность как в отношении злокачественных заболеваниях крови, так и солидных опухолей. Некоторые из аналогов пуриновых оснований (меркаптопурин (**32**), азатиоприн (**33**)) [28], обладающие иммуносупрессивным действием, используются при лечении неопластических и некоторых аутоиммунных заболеваний [24, 29-32].

Близкие по химической структуре к эндогенным продуктам метаболизма, модифицированные аналоги в результате конкурентных взаимодействий ингибируют различные функции клеток и тормозят клеточный цикл.

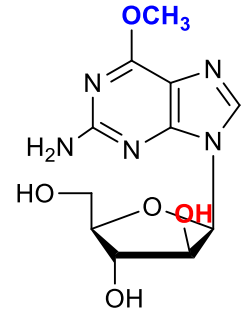




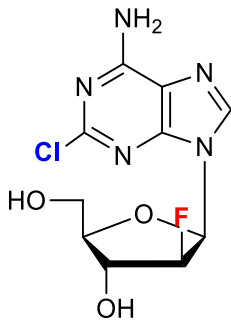
Кладрибин, 20



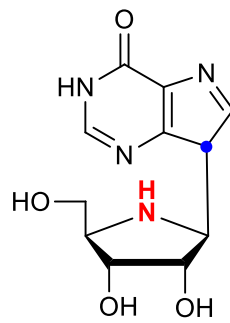
Флударабин, 21



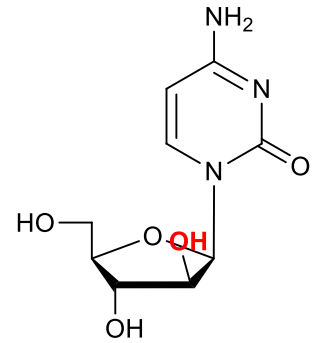
Неларабин, 22



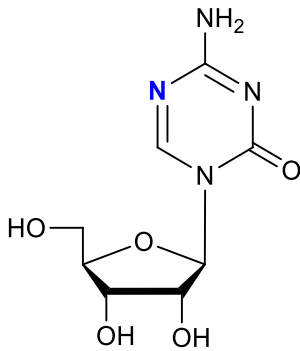
Клофарибин, 23



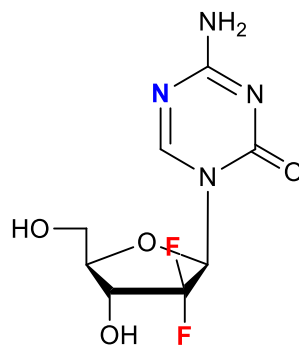
Фородезин, 24



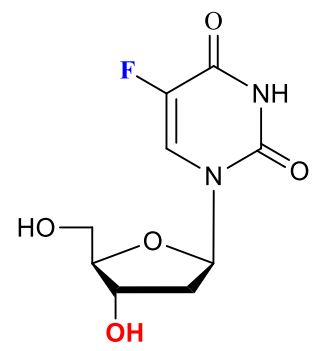
Цитарабин, 25



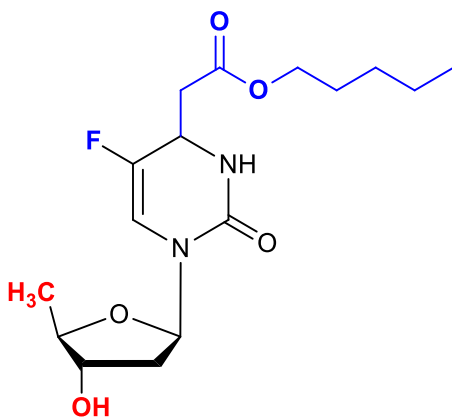
Азацитидин, 26



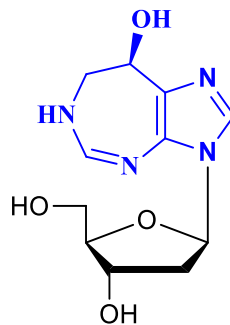
Гемцитабин, 27



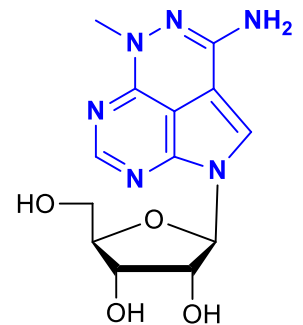
Флоксурин, 28



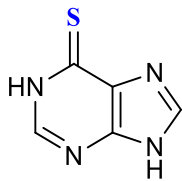
Капецитабин, 29



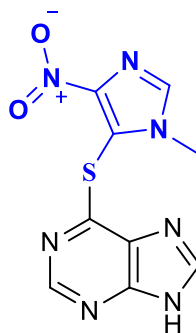
Пентостатин, 30



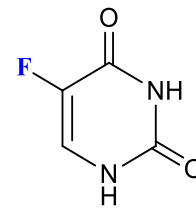
Трицирибин, 31



Меркаптопурин, 32



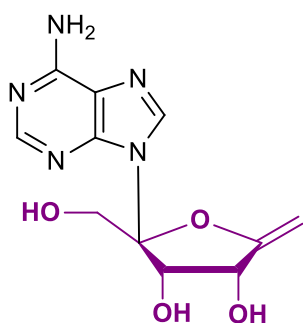
Азатиоприн, 33



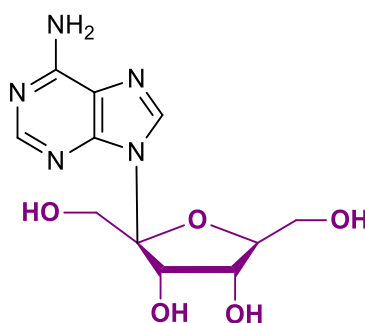
Фторурацил, 34

### 1.2.3 Класс антибактериальных и противогрибковых нуклеозидных антибиотиков.

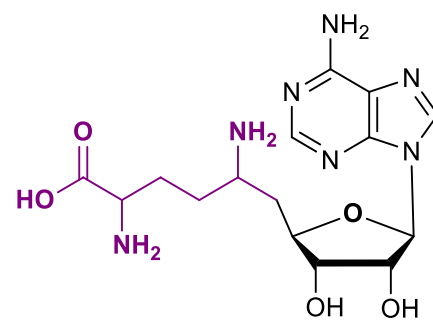
Антибактериальные и противогрибковые нуклеозидные антибиотики представляют собой класс соединений, которые обладают уникальными механизмами действия и активностью против бактерий и грибов. Они могут оказывать воздействие на различные биохимические процессы в клетках микроорганизмов, что делает их важными инструментами в лечении инфекций.



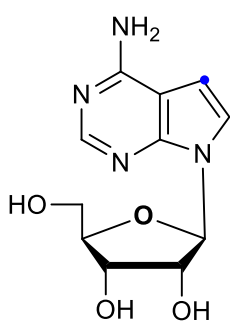
Декойинин, 35



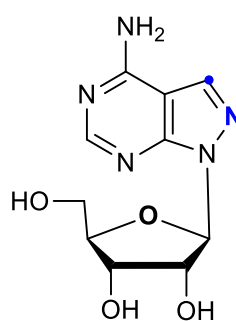
Псикофураин, 36



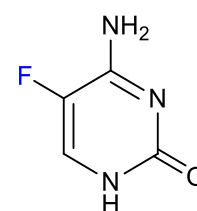
Синефунгин, 37



Турбещидин, 38



Формицин В, 39



Флуцитосин, 40

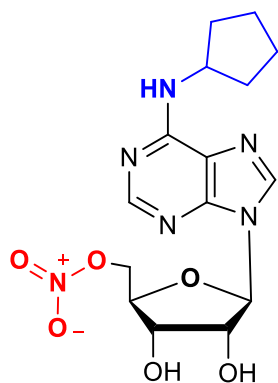
Декойинин (35) является селективным ингибитором гуанозинмонофосфатсинтетазы - ключевого фермента, участвующего в процессе синтеза нуклеотидов. Путем блокирования этого фермента 35 подавляет процессы синтеза нуклеиновых кислот.

Псикофуранин (36) действует, ингибируя как ксантозин-5'-фосфатаминазу, так и гуанозинмонофосфатсинтетазу. Синефунгин (37) - ингибитор метилтрансфераз, играющих роль в метилировании нуклеиновых кислот. Его действие направлено на нарушение биохимических процессов в клетках микроорганизмов, что приводит к их гибели. Турбецидин (38) ингибирует активность полимераз и тем самым препятствует процессам репликации ДНК и РНК, а также синтезу белка. Кроме того, он слабо ингибирует аденозинфосфорилазу, что приводит к нарушению фосфорилирования аденозина и аденозинмонофосфата. Формицин В (39) ингибирует активность аденилосукцинатсинтетазы и тимидинмонооксидфосфорилазы, что снижает возможность микроорганизмов синтезировать необходимые нуклеотиды. Флуцитозин (40) ингибирует синтез как ДНК, так и РНК, что делает его эффективным в лечении инфекций вызванных грибами [33-37].

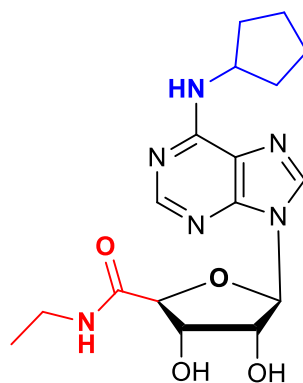
#### **1.2.4 Класс модифицированных нуклеозидов агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов.**

Огромный пул N6-замещенных производных аденозина работает как сигнальный лиганд аденозиновых рецепторов (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> и A<sub>3</sub>). Эти рецепторы широко экспрессируются и участвуют в ряде биологических функций, как физиологических, так и патологических. Благодаря этому, новые аналоги аденозина, обладающие агонистическими свойствами, привлекают повышенное внимание исследователей, так как они обладают потенциалом для лечения различных заболеваний.

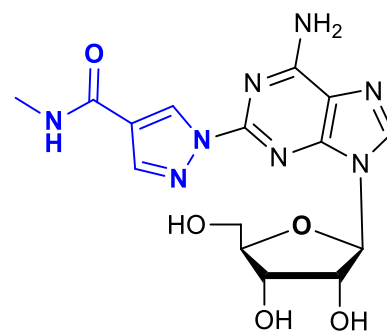
Примером могут служить два препарата, которые являются агонистами аденозинового рецептора A<sub>1</sub>, но используются для лечения совершенно разных патологий. Трабоденозон (41) – это агонист аденозинового рецептора A<sub>1</sub>, который проходил клинические исследования для лечения острого повышения внутриглазного давления и первичной открытоугольной глаукомы. Этот препарат проходит многоступенчатое исследование и находится в третьей фазе клинических испытаний. Селоденозон (41), также являющийся агонистом рецептора A<sub>1</sub>-аденозина, находится в стадии исследования, которая направлена на оценку его безопасности и эффективности в замедлении сердечного ритма при мерцательной аритмии.



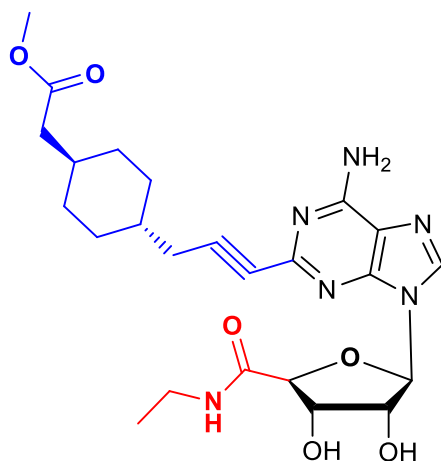
Трабоденозон, 41



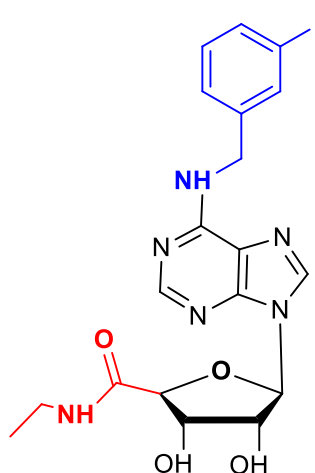
Селоденозон, 42



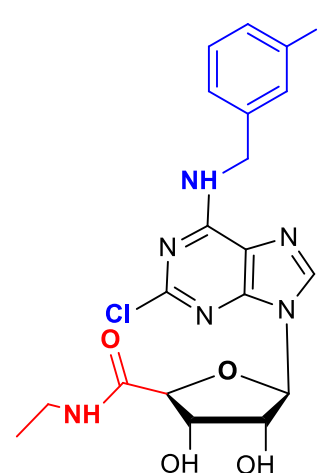
Регаденозон, 43



Ападеносон, 44



Пиклиденосон, 45



Намоденозон, 46

Агонисты рецепторов  $A_{2A}$  аденозина используются для изображения миокарда и исследования перфузии сердца, что может помочь в диагностике и лечении сердечных заболеваний. Регаденозон (43), вызывающий вазодилатацию коронарных сосудов, успешно применяется в клинике и был одобрен FDA. Ападенозон (44) находится на стадии клинических исследований фазы II и разрабатывается для использования в качестве фармакологического стресс-агента в исследованиях по перфузии сердца.

Агонисты  $A_3$  рецепторов обладают противовоспалительными или иммуномодулирующими свойствами, что делает их перспективными кандидатами для лечения воспалительных и иммунных заболеваний. Пиклиденозон (45), противовоспалительное средство, предназначено для пациентов с ревматоидным артритом, и также рассматривается для лечения других аутоиммунно-воспалительных заболеваний, таких как болезнь Крона, псориаз и синдром сухого глаза. Намоденозон (46), который активирует рецептор  $A_3$  аденозина, вызывает мощный противовоспалительный эффект в печени, что может быть полезным при лечении неалкогольной жировой болезни печени. Этот препарат также находится на стадии клинических исследований. Рецепторы  $A_3$  типа представляют собой мишень для лечения рака, поскольку высокий уровень экспрессии этих рецепторов характерен для некоторых линий опухолевых клеток и тканей рака [8, 38-40].

Основные структурные и химические модификации нуклеотидных/нуклеозидных аналогов.

Возможные следующие потенциальные направления модификации структуры нуклеозидов (нуклеотидов) (Рис. 3):

- гетероциклические пуриновое/пиримидиновое основания (введением атомов галогенов и различных объемных заместителей) [1, 41];
- изменение структуры углеводного остатка (гидроксилирование/дегидроксилирование, ациклические производные и проч.) [1, 41];
- N-гликозидная связь (смещение положения связи на другой атом, инверсия связи) [42, 43];
- изменение конфигурации (L-энантиомеры) [44];
- фосфатная группа нуклеотида (замещение P-O связи на P-N связь в фосфатной группе и др.) [45, 46].

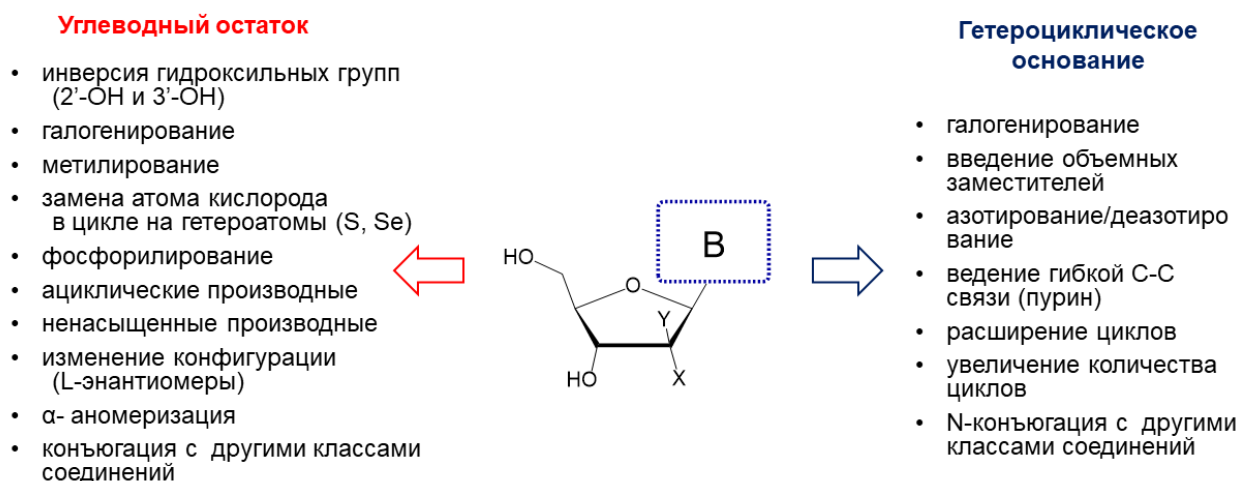


Рисунок 3 — Возможные модификации структуры природного нуклеозида

Синтетические модификации могут быть выполнены путем введения разнообразных заместителей в гетероциклическое основание или в углеводный остаток, возможна замена атома в любой группе или «перемещение» атома в другое положение [47]. Внесение изменений в структуру соединения может быть выполнено в комбинации, что обеспечивает еще большее разнообразие новых структур и функций нуклеозидных аналогов.

Сводная информация о различных модификациях, ведущих к проявлению антиметаболической активности или, наоборот, снижению растворимости и биодоступности аналогов нуклеозидов, способствовала усовершенствованию методов проектирования лекарственных препаратов на основе модифицированных нуклеозидов.

Анализ первичных экспериментальных данных в отношении структура нуклеозида – биологическая активность направило силы исследователей на конъюгирование полученных ранее метаболитов со специальными фрагментами, благодаря которым соединения способны обходить некоторые из потенциальных механизмов устойчивости. Введенные в структуру нуклеозида различные эфирные, карбаматные и амидные группы могут быть далее в клетке гидролизованы карбоксиэстеразами и деаминазами с широкой субстратной специфичностью, которые распространены в организме человека [11, 21, 22, 48, 49].

Рациональные подходы к дизайну модифицированных нуклеозидов:

- увеличение липофильности для улучшения пассивного поглощения клеточной мембраной [50];
- введение специфических заместителей для распознавания олигопептидными транспортерами PerT1 и/или PerT2 [51];
- этерификация соединений, содержащих карбоксильные или гидроксильные группы [21, 22];
- получение амидов и карбаматов для соединений, содержащих аминогруппы [21, 22];
- получение фосфатных и фосфонатных пронуклеотидов [52];
- получение самособирающихся систем (конъюгаты нуклеозидов, способные собираться в растворе в мицеллярные системы) [53].

### 1.3 Химический синтез нуклеозидов

Создание N-гликозидной связи между азотистым основанием и остатком углевода представляет собой ключевую стадию в синтезе нуклеозидов. Однако этот этап сопровождается проблемами регио- и стереоселективности, вызванными несколькими факторами. Атомы азота в гетероциклических основаниях обладают одинаковой нуклеофильностью, что может привести к гликозилированию в различных положениях. Например, у пуриновых оснований может происходить гликозилирование в N9 и N7 положениях, а у пиримидиновых оснований - в N1 и N3 положениях. Также желаемое гликозилирование с образованием  $\beta$ -нуклеозида часто конкурирует с несколькими побочными реакциями, включая неселективную нуклеофильную атаку (с образованием  $\alpha$ -нуклеозида) и атаку других нуклеофильных функциональных групп что приводит к сложным смесям продуктов [54]. Кроме того, из-за необходимости введения специфических защитных групп в углеводный остаток, процесс становится более технически сложным. В связи с этим, синтез нуклеозидов - достаточно трудоемкий процесс, требующий тщательной оптимизации условий реакции и множества шагов для достижения высокой селективности и выхода желаемого продукта.

N-Гетероциклические нуклеос основания, такие как пиримидины и пурины с различными заместителями (обозначены синими кружками, Рис. 4), могут быть получены прямым способом из доступных исходных соединений. В то же время, синтоны углеводной части требуют многоэтапного синтеза из незащищенных сахаров [55].

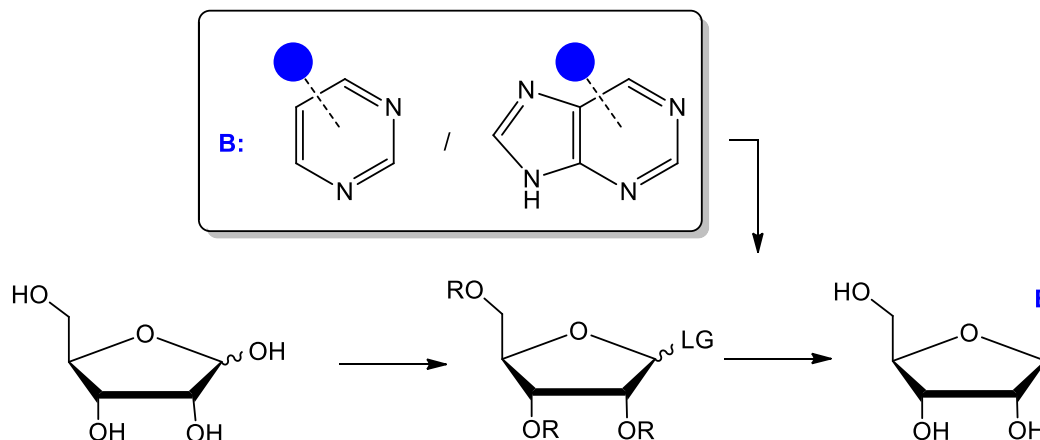


Рисунок 4 — Общая схема создания N- гликозидной связи между углеводной и гетероциклической частями молекулы. LG = уходящая группа, R = защитная группа, B = гетероциклическое основание

В химическом синтезе нуклеозидов преобладают три основных метода гликозилирования:

*Метод сплавления* является одним из подходов к получению нуклеозидов в лабораторных условиях. Он основан на нагревании ацилированного углевода с азотистым основанием. Этот метод предполагает смешивание азотистого основания с соответствующим образом защищенным производным сахара и последующее "сплавление" при повышенных температурах без использования растворителя и в присутствии кислотного катализатора. Результатом такой конденсации является образование смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров, либо преобладание одного из них, в зависимости от основания, конфигурации сахара и типа используемого катализатора (Рис. 5) [56, 57].

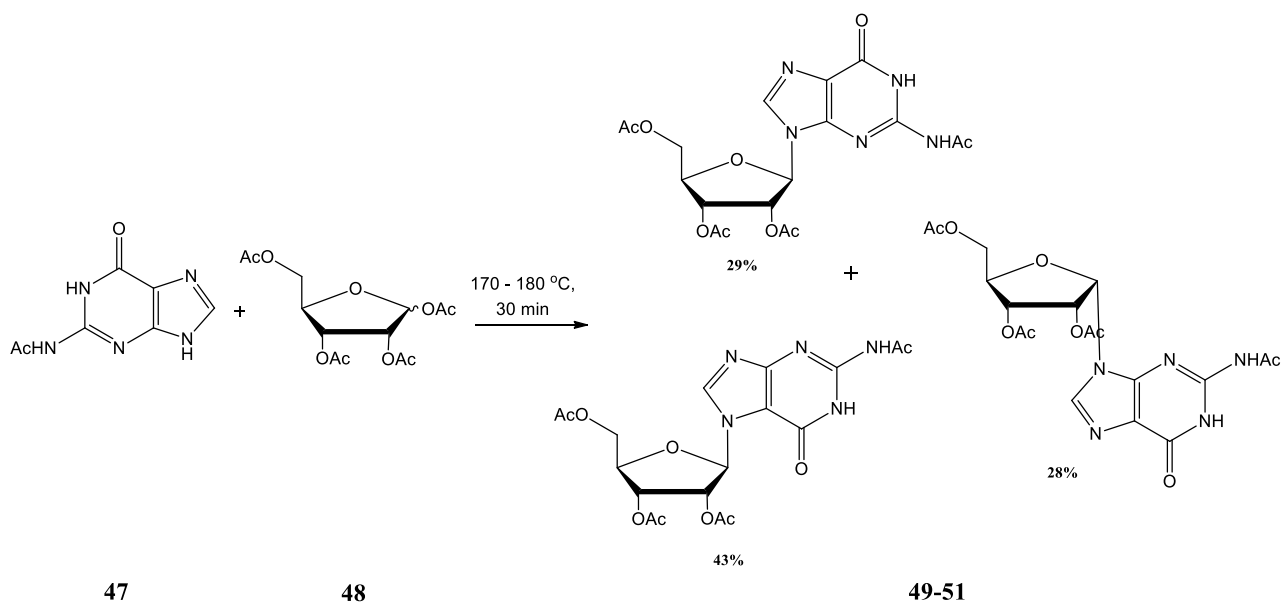


Рисунок 5 — Реакция сплавления 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил-*D*-рибофуранозы **48** с 2-ацетилгуанином **47** с образованием трех продуктов **49-51** [56]

К сожалению, метод сплавления неприменим для синтеза арабинозидов, поскольку положение гидроксила или заместителя при С2 *D*-арабинозы способствует образованию в результате конденсации, в основном,  $\alpha$ -нуклеозидов (Рис. 6) [54].

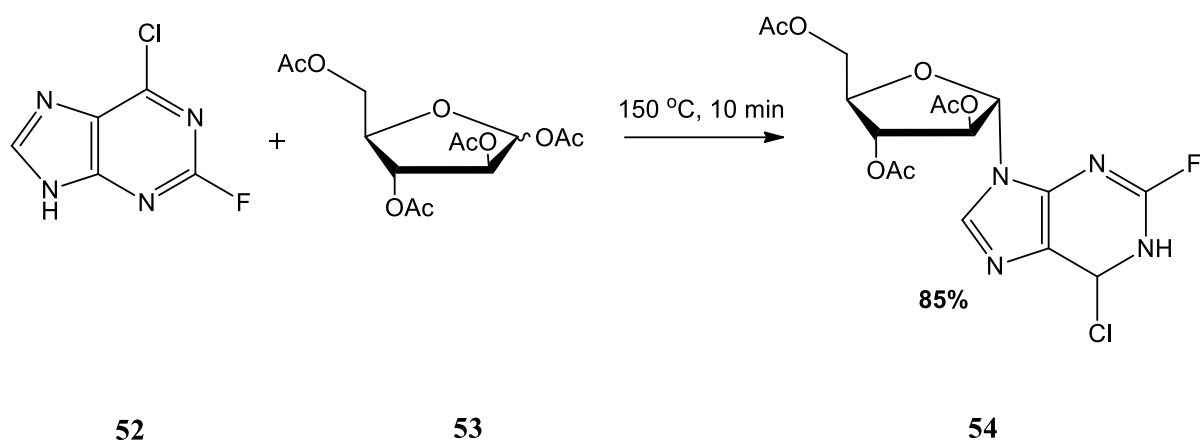


Рисунок 6 — Реакция сплавления 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил-*D*-арабинофуранозы **53** с 2-фтор-6-хлорпурином **52** с преимущественным образованием (85%)  $\alpha$ -нуклеозида **54**

Для нетипичных оснований, таких как 1,2,3- [58] и 1,2,4-триазол [59], исследования показали, что при использовании метода сплавления идет побочная реакция гликозилирования по другим атомам азота в цикле (Рис. 7). Например, при сплавлении метил-1,2,4-триазол-3-карбоксилата **55** и 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил- $\beta$ -*D*-рибофуранозы **48** (или 1-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоил- $\beta$ -*D*-рибофуранозы) в присутствии бис(пара-нитрофенил) фосфата, образуется смесь  $\beta$ -нуклеозидов  $N^1:N^2$  в соотношении 10:1 (**56:57**) [59].



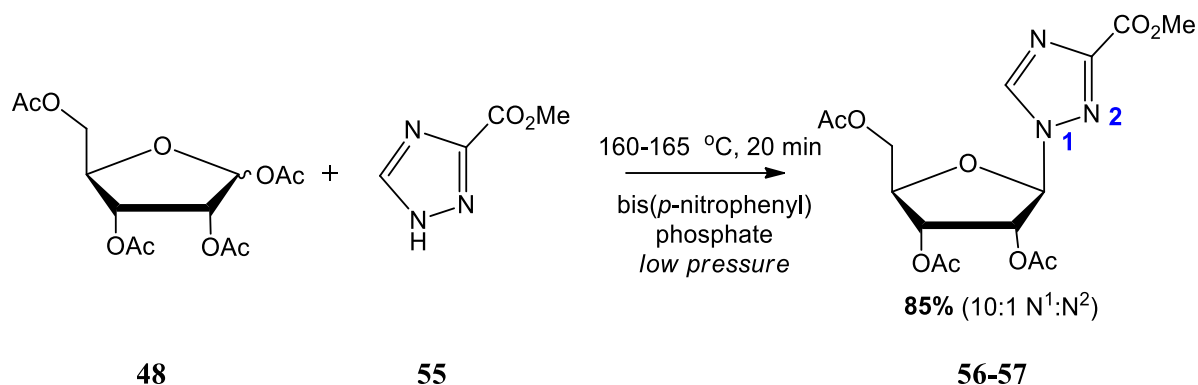


Рисунок 7 — Реакция сплавления метил-1,2,4-триазол-3-карбоксилата **55** и 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил-*D*-рибофуранозы **48**

*Метод Фишера-Хельфериха* представляет собой процесс нуклеофильного замещения защищенной  $\alpha$ -галогенозы металлической солью гетероцикла (Рис. 8). Изначально в синтезе использовались соли серебра - так впервые был получен гликозиладенин реакцией между 2,8-дихлораденином и тетра-*O*-ацетил-*D*-глюкопиранозилбромидом при кипячении в ксилоле [60]. Улучшенным вариантом метода стало использование хлорртутных производных из-за их лучшей растворимости [61]; в более поздних вариантах метода использовали соли натрия [62].

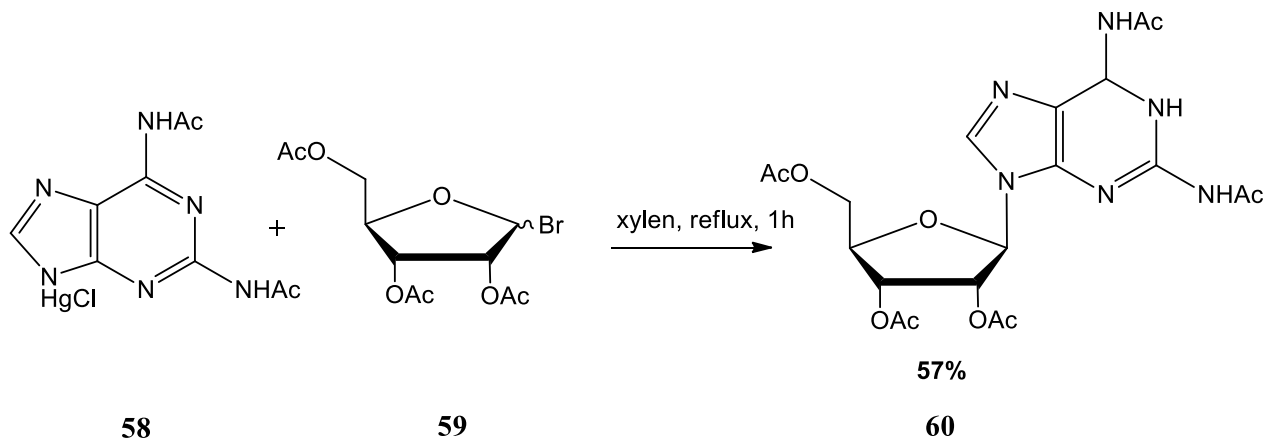


Рисунок 8 — Реакция меркурата 2,6-диацетамидопурина **58** с 2,3,5-три-*O*-ацетил-*D*-рибофуранозил бромидом **59**

При взаимодействии натриевой соли 6-хлорпурина **61** с 3,5-ди-*O*-*para*-толуоил-2-дезоксид-*D*-рибофуранозилхлоридом **62** протекает с образованием двух нуклеозидов N9:N7 **63-64** (Рис. 9).

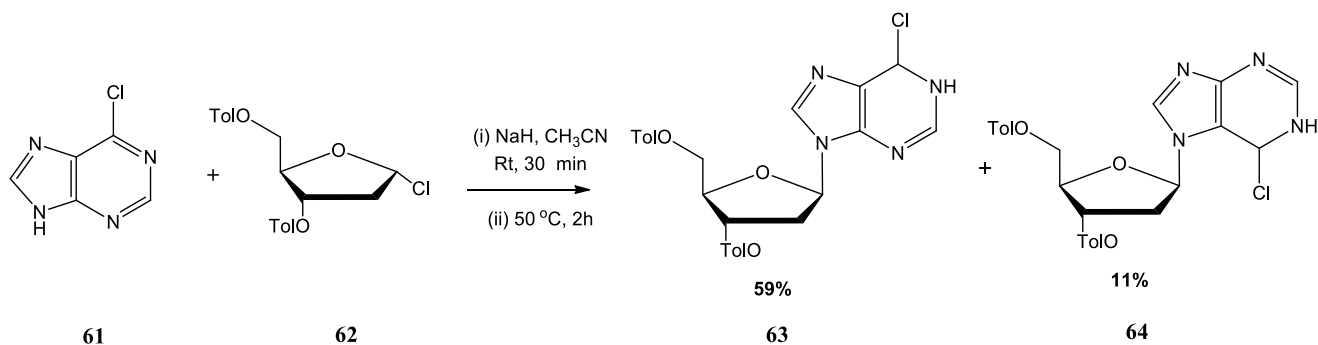


Рисунок 9 — Реакция натриевой соли 6-хлорпурина **61** с с 3,5-ди-*O*-*para*-толуоил-2-дезоксид-*D*-рибофуранозил хлоридом **62**

Наиболее популярным подходом к синтезу нуклеозидов является метод Форбрюггена: он применим как к природным, так и к модифицированным нуклеозидам, что делает его универсальным и позволяет синтезировать широкий спектр нуклеозидов с различными азотистыми основаниями и фрагментами сахаров [63-66]. Метод основан на реакции между силилированным гетероциклом и защищенным сахаром (например, 1-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоил- $\beta$ -*D*-рибофураноза) в присутствии кислоты Льюиса (обычно  $\text{SnCl}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  и  $\text{TMSOTf}$ ).

В реакции с силилированным 6-метилурацилом наблюдается образование трех продуктов гликозилирования: N1, N3 и бис-N1,N3-рибозидов **65-67** (Рис. 10) [67].

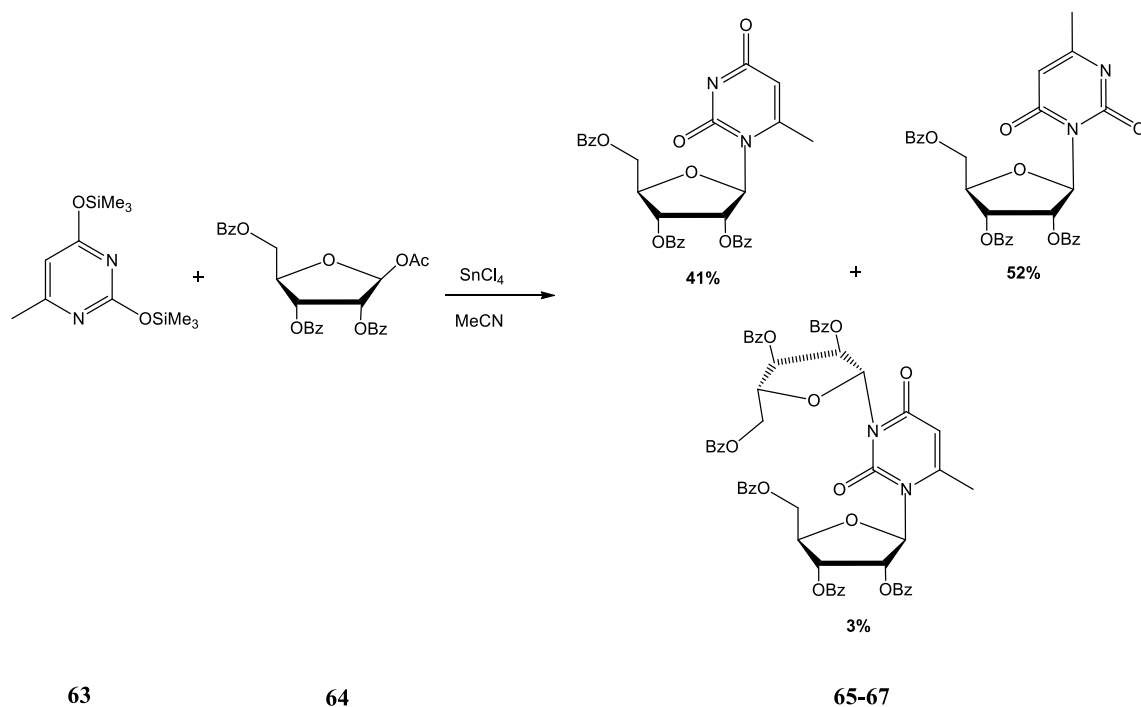


Рисунок 10 — Реакция силилированного 6-метилурацила с 1-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоил- $\beta$ -*D*-рибофуранозой

Например, силилирование 2,5(6)-дихлорбензимидазола **68** с последующим сочетанием с 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил- $\beta$ -D-рибофуранозой **48** в присутствии триметилсилилтрифлата (TMSOTf) приводило к образованию смеси изомеров положения 2,5-дихлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил- $\beta$ -D-рибофуранозил)бензимидазола **69** и 2,6-дихлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил- $\beta$ -D-рибофуранозил)бензимидазола **70** с выходом 82% (Рис. 11) [68].

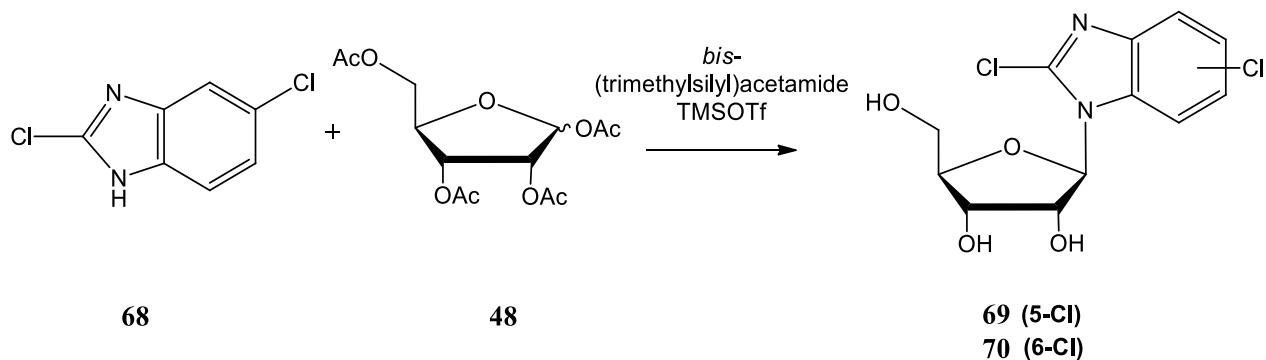


Рисунок 11 — Реакция 2,5(6)-дихлорбензимидазола **68** с 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил- $\beta$ -D-рибофуранозой **48** в присутствии кислоты Льюиса

В рассмотренных методах химического синтеза нуклеозидов можно выделить следующие общие недостатки:

- использование дорогостоящих и опасных катализаторов;
- многостадийность: методы включают в себя несколько стадий синтеза, включая введение и снятие защит функциональных групп, гликозилирование и очистку целевого продукта;
- сложная очистка целевого продукта: синтез нуклеозидов часто требует стадий очистки, таких как колоночная хроматография или перекристаллизация, процесс может быть затруднен из-за присутствия нескольких стереоизомеров и близкородственных примесей;
- чувствительность к условиям реакции, таким как температура, растворитель и катализатор. Неоптимальные условия могут привести к побочным реакциям, снижению выхода или к образованию нежелательных побочных продуктов;
- ограниченная региоселективность на стадии гликозилирования, что приводит к образованию нескольких региоизомеров.

#### 1.4 Новые перспективные методы получения модифицированных нуклеозидов

Большинство модифицированных нуклеозидов синтезируются с использованием химических методов [69]. Однако из-за сложной структуры этих молекул синтез требует большого количества стадий для контроля аномерной конфигурации, что влечет за собой высокую стоимость производства данных соединений. В последние десятилетия были разработаны новые стратегии синтеза нуклеозидов, использование генно-инженерных ферментов в крупномасштабном синтезе модифицированных нуклеозидов стало экономически целесообразным. Химико-ферментативные подходы позволяют повысить регио- и/или стереоселективность реакций и улучшить соотношение между ценой и качеством при производстве лекарственных препаратов [3, 70-73].

Промышленная биотехнология гликозилирования включает в себя синтез нуклеозидов с использованием реакций трансгликозилирования и двух типов ферментов: нуклеозидфосфорилаз (NP) и N-дезоксирибозилтрансфераз (NDT). Источниками NP и NDT могут быть микроорганизмы или генно-инженерные штаммы-продуценты рекомбинантных ферментов.

N-Дезоксирибозилтрансферазы катализируют обмен между 2'-дезоксирибонуклеозидами и свободными пуриновыми или пиримидиновыми основаниями (Рис. 12). NDT разделяются на два класса в зависимости от их субстратной специфичности: NDT типа I катализируют исключительно пурин-пуриновый перенос, тогда как NDT типа II катализируют перенос между пиримидинами и/или пуринами, а также принимают производные цитозина в качестве субстратов [74].

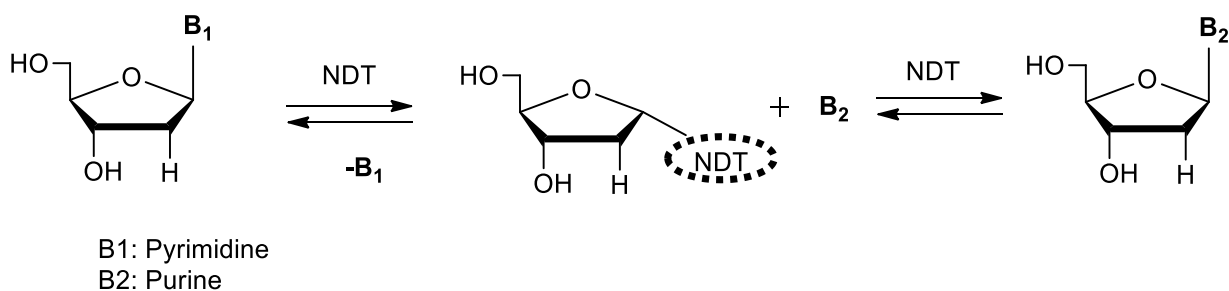


Рисунок 12 — Ферментативный синтез нуклеозидов с использованием нуклеозиддезоксирибозилтрансферазы

В ряде исследований NDT использовалась в качестве биокатализатора для синтеза аналогов нуклеозидов, обладающих потенциальной терапевтической ценностью. Эти аналоги включают 2'-галоген-2'-дезоксинуклеозиды, 2',3'-дидезоксинуклеозиды, 3'-азидо-2',3'-дидезоксирибозилнуклеозиды, 2'-дезоксидеокси-4'-тиорибозилнуклеозиды и 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-

рибозилнуклеозиды [75, 76]. Однако сама NDT не способна синтезировать арабинозиды, так как они являются ее ингибиторами. С помощью точечного мутагенеза была создана мутантная форма фермента, позволяющая синтезировать арабинозиды, например, неларабин [77].

Нуклеозидфосфорилазы осуществляют обратимый процесс фосфорилиза нуклеозидов, что приводит к образованию свободного гетероциклического основания и  $\alpha$ -D-фуранозо-1-фосфата. Одновременно с этим процессом они способны катализировать обмен пентозой между нуклеозидами и свободными основаниями (Рис. 13). Существует несколько типов нуклеозидфосфорилаз, которые различаются по своей специфичности к субстратам. К ним относятся пиримидиновые нуклеозидфосфорилазы (PyNP), которые специфичны к нуклеозидам с пиримидиновыми основаниями, такими как цитозин, урацил и тимин, а также пуриновые нуклеозидфосфорилазы (PNP), которые специфичны к нуклеозидам с пуриновыми основаниями, такими как аденин, гуанин и инозин.

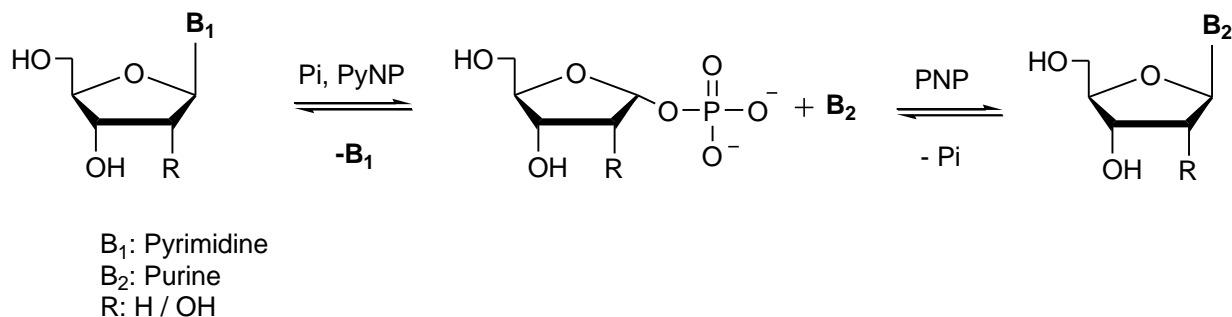


Рисунок 13 — Ферментативный синтез нуклеозидов с использованием нуклеозидфосфорилаз

Обладающие широкой субстратной специфичностью нуклеозидфосфорилазы (NP) оказались наиболее подходящими биокатализаторами реакции трансгликозилирования – ферментативного подхода в создании гликозидной связи модифицированных нуклеозидов. В дополнение, использование нескольких нуклеозидфосфорилаз позволяет разработать более сложные схемы синтеза. Одним из наиболее распространенных примеров синтеза нуклеозидов с использованием мультиферментных подходов является комбинация PNP с UP или TP. Возможно синтезировать простым мультиферментативным процессом (однореакторный, двухстадийный) пуриновые нуклеозиды из пиримидиновых и наоборот. Это позволяет проводить биотрансформации в одном сосуде последовательно или одновременно, с минимальным образованием побочных продуктов, опасных отходов и исключаются последующих сложные многоэтапные стадии разделения компонентов реакционных смесей [3, 69].

## 1.5 Сравнение эффективности химического и химико-ферментативного синтезов на примере неларабина

Для сравнения двух подходов к синтезу нуклеозидов, ретро-синтеза и комбинированного химико-ферментативного подхода, рассмотрим пример получения противолейкозного средства неларабин **22** [6].

В патенте CN101092441A "Method for synthesizing nelarabine" [78] описан многоэтапный процесс синтеза данного препарата. Представленный синтез включает в себя такие стадии, как реакции замещения, введение и удаление защитных групп, и позволяет получить целевой продукт с удовлетворительным выходом и достаточно высокой степени чистоты. Схема синтеза представлена на Рис. 14.

Первая стадия синтеза заключается в обработке 6-дезоксигуанозина **71** метилатом натрия в метаноле, что приводит к замещению атома хлора в положении 6 пуринового гетероцикла метоксигруппой с выходом 65%. После этого полученный 6-метоксигуанозин **72** обрабатывается уксусным ангидридом с образованием триацетата. Затем проводят избирательное удаление ацетатной защитной группы в положении 2' рибозы путем обработки **73** гидроксиламином  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Далее с целью обращения конфигурации гидроксильной группы в 2'-положение рибозы вводится трифлатная группа (которая является хорошей уходящей группой в реакции нуклеофильного замещения по механизму  $\text{S}_{\text{N}}2$ ) с использованием трифторметансульфонового ангидрида  $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$  в присутствии 4-диметиламинопиридина (DMAP). Обработка полученного продукта **75** *N,N*-диизопропилэтиламино и уксусной кислотой в этилацетате приводит к желаемому нуклеофильному замещению с образованием триацетата арабинонуклеозида **76**. На завершающей стадии синтеза Неларабина **22** проводится удаление ацетатных защитных групп с использованием аммиака в этаноле.

Второй синтетический подход описан в статье Shen C. и др. (2020) [79]. Схема синтеза представлена на Рис. 15.

В качестве исходного соединения для синтеза используется коммерчески доступная 1,3,5-три-*O*-бензоил- $\beta$ -D-рибоза **77**, которую обрабатывают 2-иодобензоилхлоридом с получением соответствующего сложного эфира **78**. Посредством реакции Соногаширы [80] с 1-гексином,  $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Cl}_2$  и  $\text{CuI}$  в качестве катализатора, получают рибозу **79** с выходом 74%. Оптимизированное гликозилирование (метод Форбрюгена) основания **80** полученной ранее модифицированной рибозой (4 экв.  $\text{TMSOTf}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $80^\circ\text{C}$  в течение 4 ч) позволяет селективно получить продукт **81** с выходом 72%. Изомер N-7 обнаружен не был.

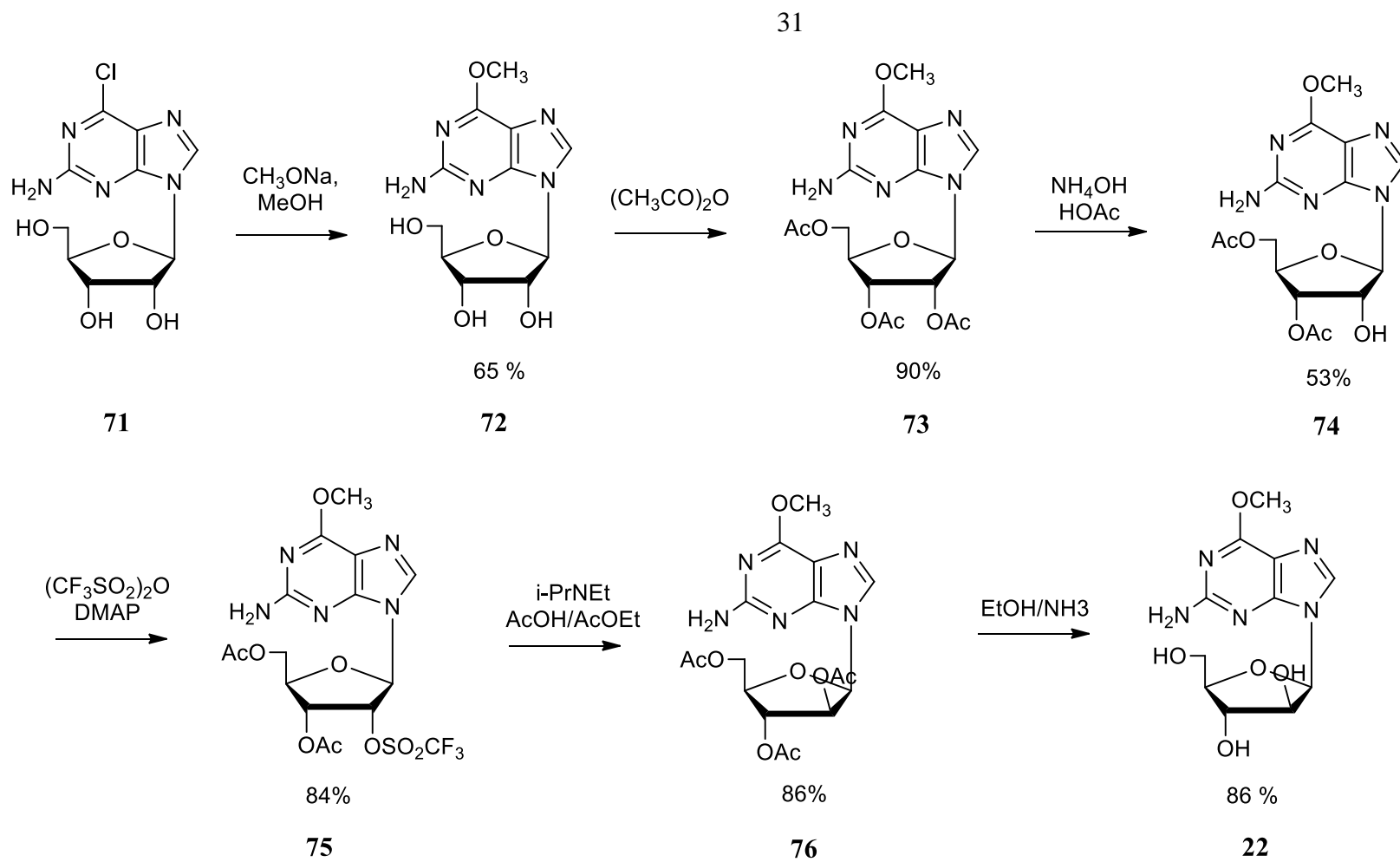


Рисунок 14 — Химический синтез Неларабина (методика 1)

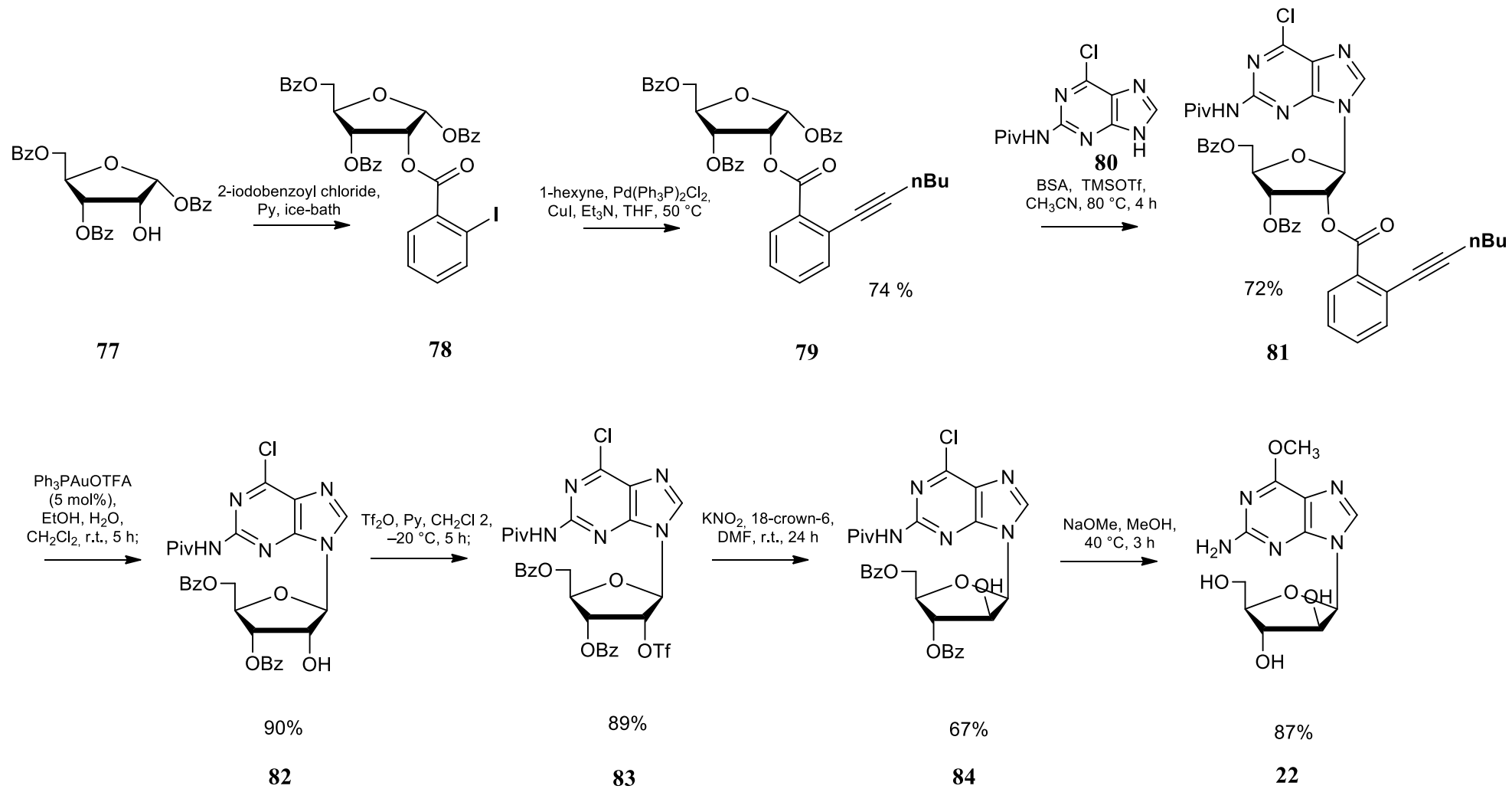


Рисунок 15 — Химический синтез Неларабина (методика 2)



Далее с 2'-ортоалкин-бензоилнуклеозида **81** снимают защиту 5 мол. %  $\text{Ph}_3\text{PAuOTFA}$  (1 экв.  $\text{H}_2\text{O}$  и 6 экв.  $\text{EtOH}$ ). Реакция протекает с образованием 2'-ОН-нуклеозида **82** с выходом более 90%. Далее, во 2'-положение рибозы вводили трифторметилсульфонатную группу и полученный продукт **83** использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. На следующей стадии с использованием  $\text{KNO}_2$  в качестве нуклеофильного реагента и 18-краун-6 в качестве катализатора происходит нуклеофильное замещение по 2'-положению углеводного остатка с обращением конфигурации и получением арабинозида **84** с выходом 67%. Одновременное замещение атома хлора на метоксильную группу и снятие пивалоильной защиты проводили с избытком метилата натрия в метаноле с получением Неларабина **22** с выходом 87%.

Химико-ферментативный подход к синтезу Неларабина **22** с использованием генно-инженерных нуклеозидфосфорилаз, описанный в европейском патенте EP0294114B1 [81], представлен на Рис. 16.

В этом подходе в качестве исходных реагентов используют 6-хлоргуанин **85** и уридин **87**. Замещенный 6-хлоргуанин **85** обрабатывают метилатом натрия в метаноле, что приводит к замещению хлора в положении 6 метоксигруппой. Урацил **87** превращают в 9-β-D-арабинофуранозилпиримидиновый нуклеозид **89** в две стадии через образование 2,2'-ангидронуклеозида **88** с последующим гидролизом.

Ключевой этап - реакция трансгликозилирования, заключающаяся в фосфат-зависимом переносе пентофуранозильного фрагмента пиримидинового нуклеозида (в нашем случае 1-β-D-арабинофуранозилурацила **89**) на пуриновое гетероциклическое основание - 2-амино-6-метокси-9H-пурин **86**. В качестве биокатализаторов трансарабинозилирования использовалась комбинация пуриннуклеозидфосфорилазы (PNP) и уридинфосфорилазы (UP) *E. coli*. Этот ферментативный процесс полностью регио- и стереоселективен, так как образование α-аномера или N-7 региоизомера в реакционной смеси не наблюдалось [9]. Целевой арабино-нуклеозид **22** получен с выходом 53%.

Модифицированный подход к получению Неларабина заключается в синтезе α-D-пентофуранозо-1-фосфата и его последующей биокаталитической конденсации с гетероциклическим основанием (Рис. 16) [82].

Получение гликозил-1-фосфатов проводят по методу МакДональда [83]. Тетраацетат D-арабинозы **90** (синтезированный по методике Кобаяши [84]), представляющий собой смесь α, β-аномеров фуранозной и пиранозной форм, использовался в качестве исходного соединения для синтеза α-D-пентофуранозо-1-фосфата **92**.

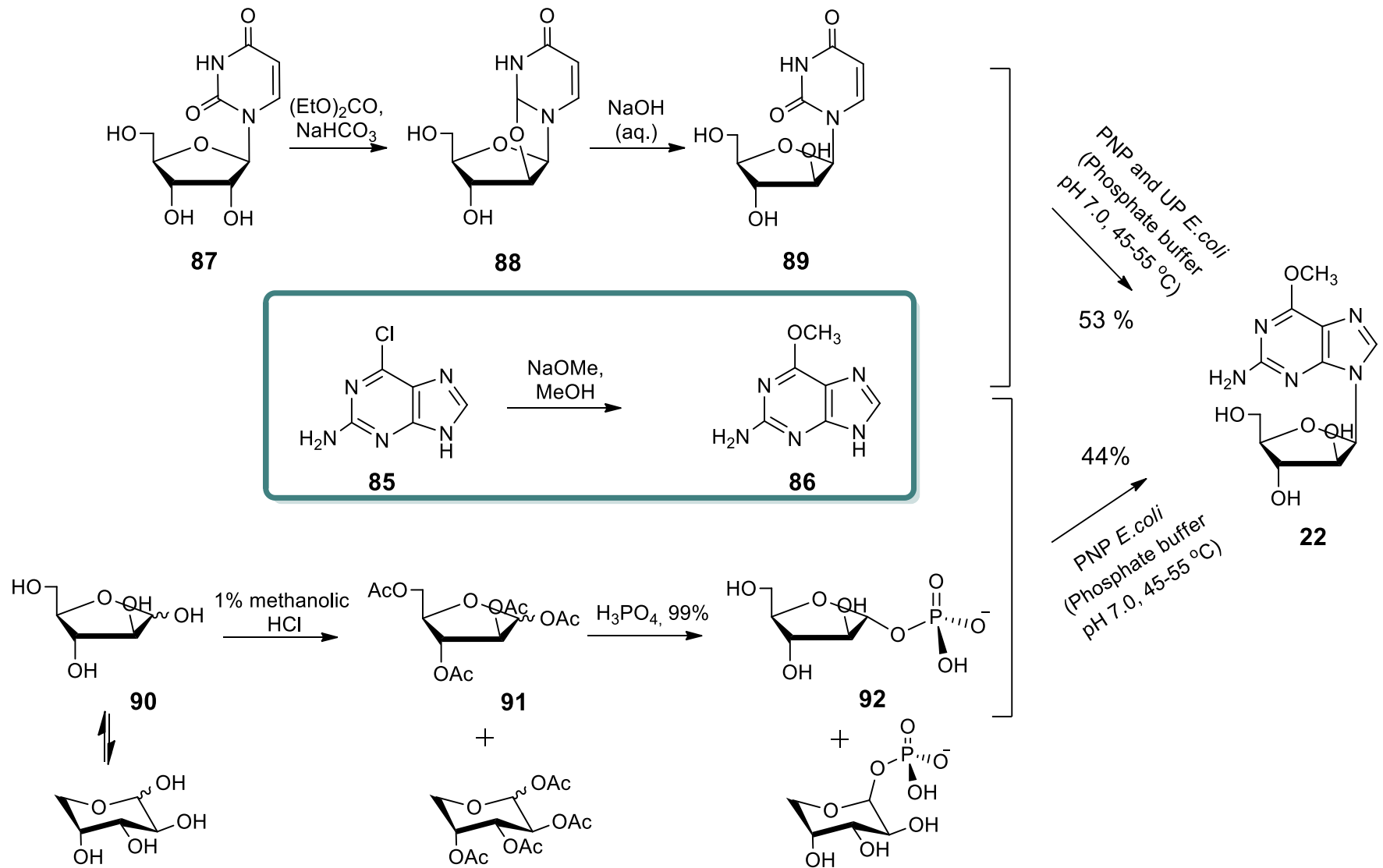


Рисунок 16 — Химико-ферментативный синтез неларабина **22** с использованием  $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфата (методика 4)

неларабина **22** трансрибозилированием (методика 3)

Обработка его безводной фосфорной кислотой приводит к образованию смеси из  $\alpha$ -D-арабинофуранозо-1-фосфата и  $\beta$ -D-арабинопиранозо-1-фосфата **91**.

На завершающей стадии синтеза проводится ферментативное гликозилирование 2-амино-6-метокси-9H-пурина **86**  $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфатом **92**, катализируемое рекомбинантной PNP *E. coli* в водном растворе (pH 7.0, 55 °C, 1 ч). Целевой нуклеозид **22** получен с выходом 44%.

Сравнение химического и ферментативного подхода к синтезу Неларабина позволяет выявить основные особенности каждого метода и их преимущества и недостатки.

Химический подход требует выполнения минимум 6-7 стадий синтеза. Важным этапом синтеза является инверсия гидроксильной группы в 2'-положении, что приводит к многостадийности и необходимости в дополнительных хроматографических очистках промежуточных продуктов, что делает процесс сложным и затратным.

Ферментативный способ синтеза представляет собой более эффективный и селективный подход. Этот подход обеспечивает высокую регио- и стереоселективность, что значительно упрощает процесс синтеза и позволяет получить желаемый продукт с минимальным количеством стадий.

В целом, выбор между химическим и ферментативным подходом зависит от конкретных задач. Ферментативный подход обычно предпочтителен в случаях, когда необходимо провести гликозилирование модифицированного основания с высокой регио- и стереоселективностью. Однако химический подход может быть ценным дополнением для получения более разнообразных продуктов или проведения дополнительных модификаций структуры.

## 1.6 Примеры нерегіоселективности ферментативного катализа

На сегодняшний день ферментативное гликозилирование модифицированных гетероциклических оснований активно используется в синтезе ряда новых нуклеозидов, благодаря стерео- и регио-специфичности метода. В большинстве случаев получают только природные 9- $\beta$ -D-нуклеозиды пуриновых оснований, однако этот принцип реализуется не всегда (Рис. 17) [69, 85, 86]. В ранних работах по изучению возможности использования бактериальной PNP *E. coli* при трансгликозилировании 3-дезапурина **93**, было обнаружено образование N9 и N7 изомеров [87].

Образование N7, N9-региоизомеров так же отмечалось при гликозилировании N2-ацетилгуанина **94** [88, 89]. В работе [90] было показано, что рекомбинантная PNP из селезенки теленка катализирует рибозилирование 2,6-диамино-8-азапурина **95** преимущественно с образованием N7 и N8 нуклеозидов, при этом PNP *E. coli* с тем же основанием давала смесь N8 и N9 рибозидов.

Образование изомеров положения N1, N3 (имидазольная нумерация) также отмечалось в нескольких работах Харитоновой и др. [91, 92] по ферментативному гликозилированию оснований 5-замещенных 4,6-дифторбензоимидазольных оснований **96**.

Уникальный случай ферментативного трансгликозилирования – по ароматической аминогруппе 2-амино-1,3-бензоксазола – был описан этими же авторами в работе [93]. В синтезе рибозида и 2-дезоксирибозида 2-амино-1,3-бензоксазола, катализируемом PNP *E. coli*, образовывались фуранозиды **97**, которые спонтанно перегруппировывались в соответствующие  $\beta$ -D-пиранозиды **98**.

Такое переориентирование субстрата в активном центре фермента отмечалось не только для PNP, но и для N-дезоксирибозидтрансфераз (NDT *Lactobacillus*). NDT *Lactobacillus* и PNP *E. coli* катализировали образование двух продуктов реакции - N1 и N7 нуклеозидов из оксоимидзопурина **99**, и N1 и N3 нуклеозидов из соединения **100** [94].

При ферментативном гликозилировании трициклического основания **101** NDT *Lactobacillus leichmannii* присоединение углеводного остатка наблюдалось в позициях – имидазольного кольца N1 или N3, продукт бис-гликозилирования по имидазолу N1 и пиримидину N1, в случае PNP *E. coli* присоединение – только по имидазолному кольцу N1 или N3 [95].

В случае с гликозилированием 4-замещенных имидазолов **102** NTD *L. Leichmanni* отсутствие регио-специфичности по отношению к N1 и N3 азотам в имидазольном кольце, позволяет получить дистальные и проксимальные флексимерные 2'-дезоксирибозиды [95, 96].

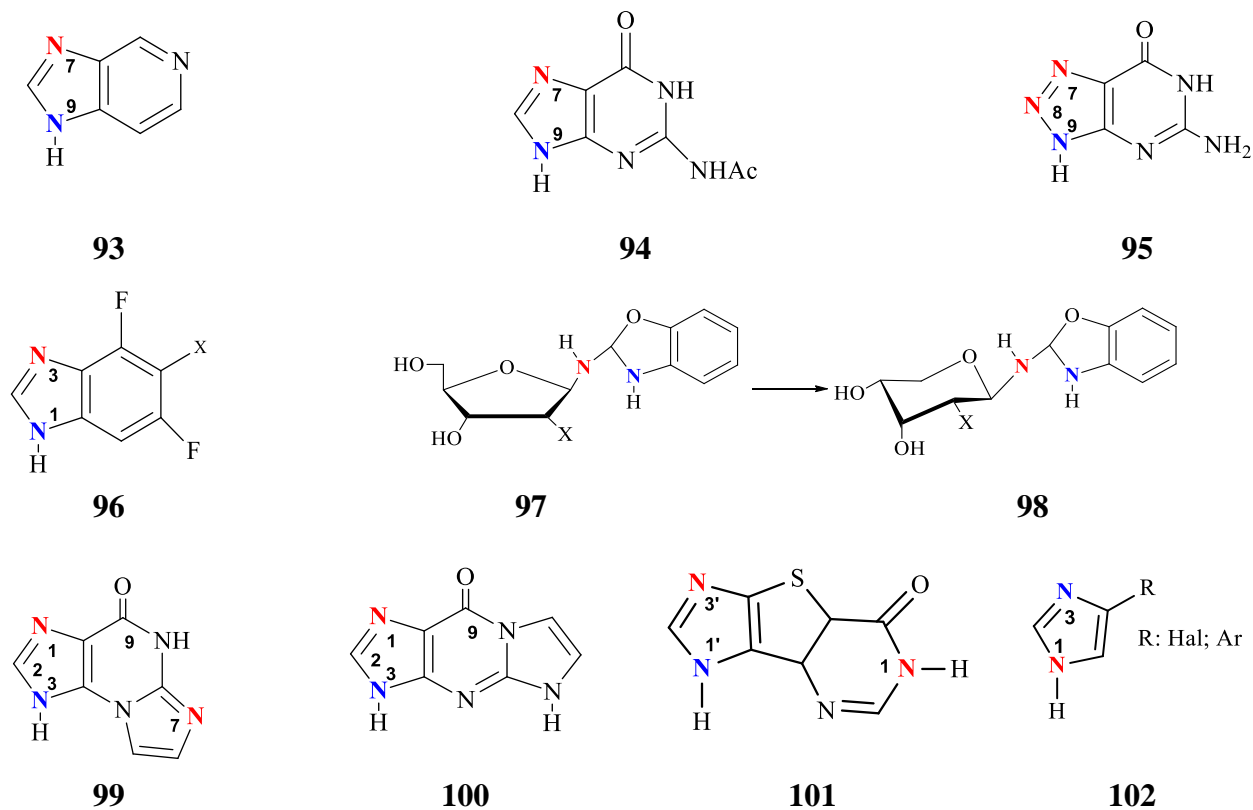


Рисунок 17 — Модифицированные гетероциклические основания - побочные продукты трансгликозилирования

### 1.7 Пуриинуклеозидфосфорилаза *E. coli* в качестве ключевого фермента реакции трансгликозилирования

Пуриинуклеозидфосфорилаза (PNP) (EC 2.4.2.1) - внутриклеточный фермент, ответственный за метаболизм пуриновых нуклеозидов - катализирует обратимый фосфоролит С-Н гликозидной связи пуриновых нуклеозидов и их аналогов. Из-за своего фундаментального значения и практической важности PNP привлекает значительное внимание в научных исследованиях [97].

Фермент был успешно выделен из различных источников, включая как эукариотические, так и прокариотические системы. Это позволило провести подробное исследование субстратной специфичности PNP, а также изучить ее структуру и принципы работы каталитического центра. В настоящее время имеется много информации о структуре PNP и ее функциональных особенностях, что открывает возможности для разработки стратегий регуляции активности PNP или ее использования в качестве важного инструментария в биотехнологических приложениях [86].

Выделяют два основных типа этого фермента. Первый тип, известный как "низкомолекулярный", представлен гомотримерными ферментами с молекулярной массой около 90 кДа. Этот тип PNP встречается в основном у млекопитающих и специфичен в отношении субстратов, принимая только 6-оксопуриновые нуклеозиды (катализирует фосфоролит гуанозина и инозина). Второй тип PNP, известный как "высокомолекулярный", представлен гомогексамерными структурами с молекулярной массой от 110 до 150 кДа и встречаются у различных микроорганизмов. Эти PNP обладают более широкой специфичностью в отношении субстратов, принимая как 6-оксопуриновые, так и 6-аминопуриновые нуклеозиды. Эти два класса PNP практически не проявляют гомологии в последовательностях и существенно отличаются по структуре активного центра. Различия в архитектуре активного центра могут определять различия в механизме катализа и субстратной специфичности между этими типами фермента [98].

Бактериальная PNP *Escherichia coli* представляет особый интерес в контексте биокаталитического синтеза благодаря выявленной обширной субстратной специфичности. Проведенные рентгеноструктурные исследования данного фермента позволили установить структуру его активного центра и идентифицировать аминокислотные остатки, которые играют ключевую роль в связывании субстрата и катализе (Рис. 18-19) [99-101].



Рисунок 18 — Трехмерная структура гексамера PNP *E. coli* PDB:4RJ2

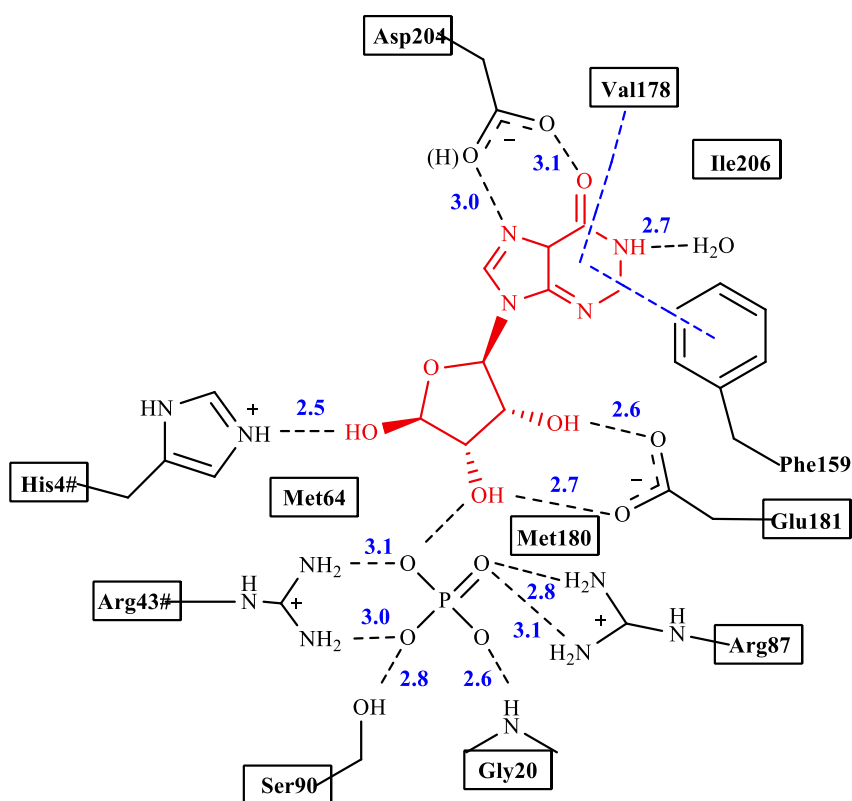


Рисунок 19 — Схематическая диаграмма, показывающая ключевые аминокислотные остатки активного центра и контакты, которые образуются с субстратами инозином (красный) и фосфатом. Черные штриховые линии обозначают водородные связи (или частичные двойные связи в карбоксилатных группах), синие линии – гидрофобные взаимодействия [102]

Сайт связывания пуриновых оснований состоит из остатков Ser90, Cys91, Gly92, Ala156, Phe159, Phe 167, Val178, Glu179, Met180, Asp204 и Ile206. Четыре остатка Ala156, Phe159, Val178, Met180 образуют гидрофобный карман вокруг пуринового основания. Asp204 взаимодействует с атомом N7 и/или заместителем при атоме C6 (NH<sub>2</sub>, NHR, карбонил, OR) пуринового основания, приводя к стабилизации основания в каталитическом центре и к усилению нуклеофильности атома N9, то есть активации субстрата. Остаток Phe159 расположен между пуриновым основанием и гидрофобной поверхностью сахара под углом 60° к плоскости пуринового кольца и отвечает за π-π взаимодействие между ароматическими системами, удерживая их вблизи друг от друга. Остаток Met180 также находится между пуриновым основанием и гидрофобной поверхностью рибозильной группы.

Сайт связывания рибозы состоит главным образом из взаимодействий с остатками Met64, Phe159, Val178, Glu179, Met180, Glu181 и His4# (остаток соседнего мономера). Боковая цепь Glu181 образует водородные связи с 2'- и 3'-гидроксильными группами рибозы, а His4# образует водородную связь от 5'-гидроксильной группы. Сайт связывания фосфата представлен Gly20, Arg24, Arg87, Ser90, Arg43# (остаток соседнего мономера) [102, 103]. Так же было установлено, что Ser90 играет важную роль в связывании α-D-пентофуранозы-1-фосфаты в каталитическом центре [93].

### 1.8 Субстратная специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*

Как говорилось ранее, пуриннуклеозидфосфорилаза *Escherichia coli* представляет особый интерес для биокаталитического синтеза благодаря обнаруженной широкой субстратной специфичности (Рис. 20).

Помимо природных пуриновых нуклеозидов, таких как аденозин, гуанозин и инозин, пуриновая нуклеозидфосфорилаза способна воспринимать нуклеотидные субстраты с замещениями в позициях 2 и 6 атомов пурина [88]. Замещения в позиции 2, в основном, ограничиваются галогенами, такими как хлор и фтор [69]. В то время как в позиции 6 вариативность шире и может включать в себя как небольшие заместители (например, галогены и метокси-группа), так и более крупные.

Коллектив исследователей под руководством Abdalla E.A. Hassan и др. провел серию экспериментов, направленных на получение новых аналогов среди замещенных в позиции 6 (алкил-, циклоалкил-) 9-(β-D-рибофуранозил)-пуринов, и оценил их взаимодействие с пуриннуклеозидфосфорилазой из *Escherichia coli* [104]. В другом исследовании, проведенном коллективом под руководством С. Н. Михайлова, была продемонстрирована возможность получения цитокининов (С6 замещенных пуринов) из соответствующих рибозидов с использованием фосфорилаза, катализируемого PNP *E. coli* [105]. Результаты обоих



исследований говорят о том, что активный центр PNP *E. coli* демонстрирует способность адаптироваться к разнообразным структурным изменениям в 6-положении гетероциклических оснований.

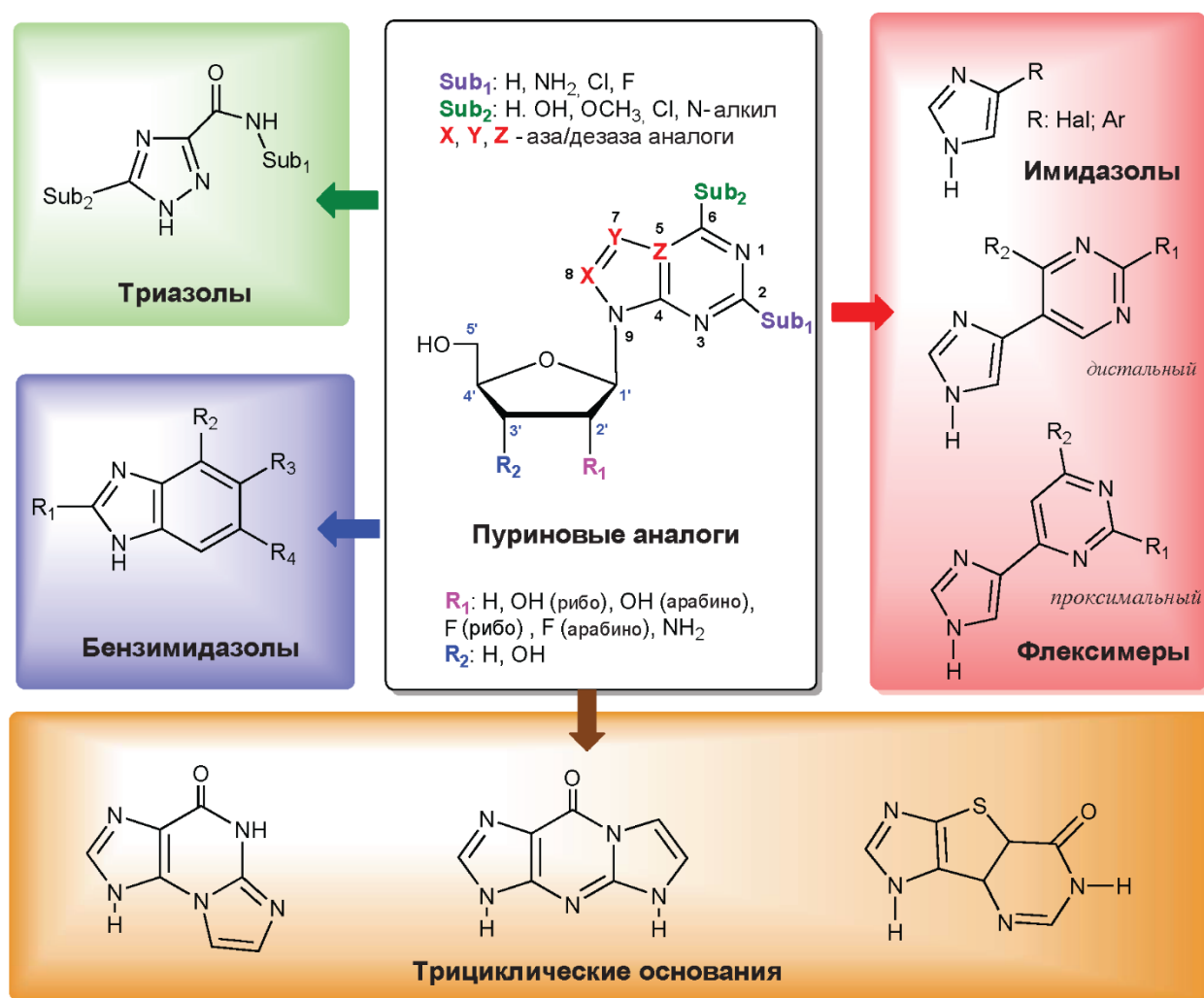


Рисунок 20 — Субстраты пуриинуклеозидфосфоорилазы *Escherichia coli*

Кроме того, фермент способен взаимодействовать с гибридными аза(деза)-модифицированными основаниями. В таких гетероциклических структурах атом азота в позиции 7 пуринового кольца может быть замещен атомом углерода (CH-группой), в то время как атомы углерода в позициях 5 и 8, наоборот, могут быть замещены атомами азота [106].

Фермент обладает уникальной способностью взаимодействовать с нетипичными основаниями, структура которых значительно отличается от природных субстратов. Эти нетипичные субстраты включают в себя такие соединения, как триазолы [107-110], бензимидазолы [111-115] и имидазолы [116]. Открытие того, что замещенные по 4 положению имидазолы могут служить субстратами для PNP, стало отправной точкой для нового направления исследований, приведшего к разработке новой концепции флексимерных оснований и нуклеозидов [116, 117].

Еще одним удивительным открытием стало то, что даже основания с добавленным третьим циклом, такие как трициклические основания, также являются субстратами для этого фермента [94, 95]. Этот факт указывает на удивительную адаптивность активного центра фермента, который способен катализировать реакции с разнообразными структурами, даже если они значительно отличаются от типичных природных субстратов.

По отношению к углеводной части молекулы пурииннуклеозидфосфорилаза *E. coli* также проявляет большую толерантность к нуклеозидам, содержащим модифицированные фрагменты углеводного остатка (арабиноза [82], 3-дезоксирибоза [118] и 2-фторарабиноза [119]). Особенно важно отметить, что активность PNP *E. coli* в отношении пуриновых арабинозидов превышает активность PNP млекопитающих в десять раз [98].

Все это означает, что PNP *E. coli* может эффективно катализировать реакции с различными субстратами. Такая широкая субстратная специфичность бактериальной фосфорилазы делает фермент ценным инструментом для биотехнологического синтеза модифицированных нуклеозидов.

В ходе исследования рассматривалась адаптация реакции трансгликозилирования для синтеза нуклеозидов (рибозидов, 2-дезоксирибозидов и арабинозидов) с нетипичными основаниями. Особый интерес представляли основания, обладающие аномально большими заместителями, такими как остаток бензоксазина. Такие основания обладают очень низкой растворимостью и, как следствие, плохой биодоступностью. Поэтому их гликозилирование создаст предпосылки для включения таких оснований в виде нуклеозида во внутриклеточный нуклеозидный обмен.

Также целью исследования было изучение специфики протекания ферментативных реакций при гликозилировании нетипичных оснований. Проведён анализ региоспецифичности реакций, особенно в случае образования аномальных продуктов. Важным этапом было проведение докинга *in silico* оснований в активном центре PNP. Использование компьютерного моделирования для предсказания структуры комплексов новых субстратов и активного центра фермента позволяет лучше понять молекулярные механизмы их взаимодействия, что необходимо при разработке эффективных ингибиторов фермента.

Проведённый первичный скрининг биологической активности и цитотоксичности полученных новых нуклеозидов позволил оценить потенциал синтезированных соединений для дальнейшего применения в биомедицинских и фармацевтических исследованиях. Интерес представляло также проведение анализа структура-активность среди серий гомологичных нуклеозидов, чтобы выявить закономерности и взаимосвязи между структурой и биологической активностью.

## 2 Обсуждение результатов<sup>1</sup>

Целью работы является разработка биокаталитического способа синтеза серии новых модифицированных нуклеозидов с нетипичными гетероциклическими основаниями с использованием нуклеозидфосфорилаз *E. coli*; изучение специфики протекания реакции трансгликозилирования; первичный скрининг противовирусных и антиметаболических свойств синтезированных соединений на биологических моделях *in vitro*.

Всю синтетическую работу можно подразделить на несколько основных этапов: определение субстратной специфичности PNP в отношении C2, C6-замещенных пуриновых оснований или рибонуклеозидов, флексимерных оснований. Оптимизация условий реакций трансгликозилирования, синтез новых нуклеозидов для первичного скрининга биологической активности.

### 2.1 Синтез модифицированных нуклеозидов

Всю экспериментальную работу можно подразделить по типу синтезированных нуклеозидов на три основных части: синтез аналогов 2-аминопурина, арабинозидов 2-хлораденина, замещенных по C6 положению и флексимерных нуклеозидов (Рис. 1).

*Первый этап* экспериментальных работ: ферментативный синтез трех серий нуклеозидов.

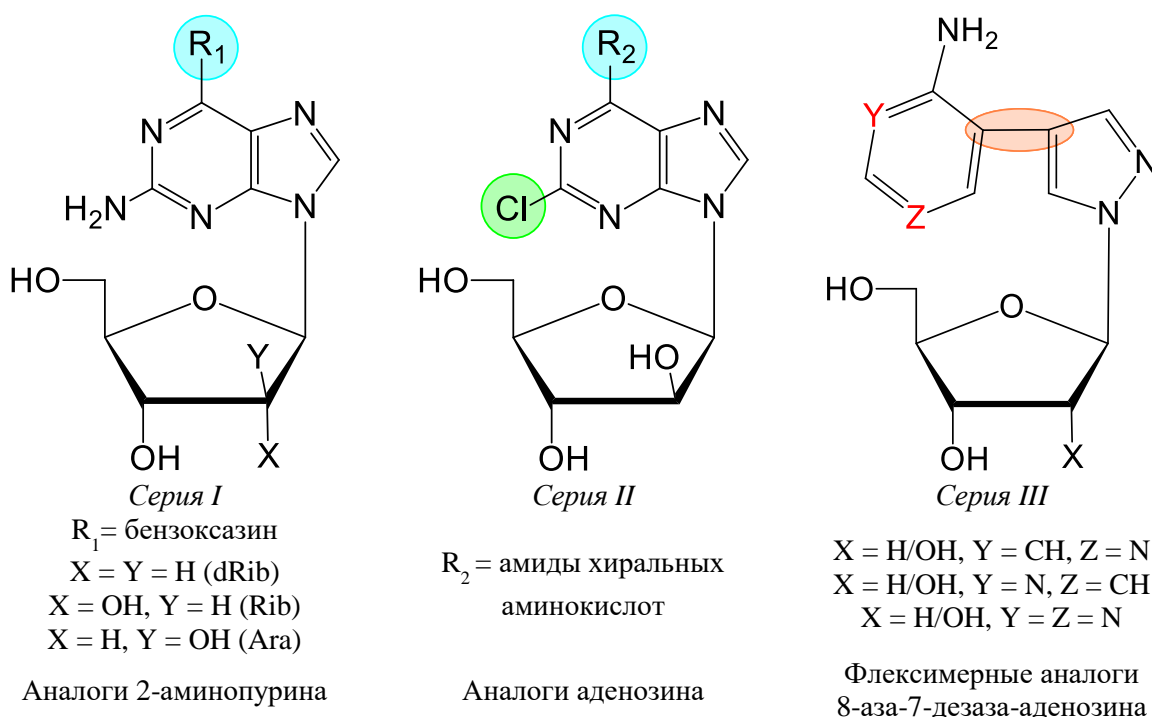


Рисунок 1 — Серии C2, C6-замещенных и флексимерных пуриновых нуклеозидов

<sup>1</sup> Нумерация соединений, схем и рисунков, используемая в разделах «Обсуждение результатов» и «Экспериментальная часть», отличается от нумерации в «Литературном обзоре».

Несмотря на обширные литературные данные о синтезе модифицированных нуклеозидов с использованием нуклеозидфосфорилазы, практически невозможно заранее предсказать, будет ли модифицированное основание/нуклеозид субстратом для PNP *E. coli*. Поэтому *на первом этапе* экспериментальных работ проводится тестовая реакция, чтобы определить субстратную специфичность PNP *E. coli*. Если в результате хроматографического анализа видно, что соединение субстрат, то на последующих этапах исследования определяются оптимальные параметры реакции трансгликозилирования, с целью достижения максимально возможной конверсии исходного соединения в нуклеозид.

Оптимизация ферментативного способа синтеза включает в себя следующие шаги:

- определение оптимальной пары субстратов для реакции ферментативного трансгликозилирования;
- установление оптимальных условий проведения реакции (соотношение субстратов, количество ферментных препаратов);
- отработка условия выделения целевого продукта из реакционной смеси;
- масштабирование процесса.

*Второй этап* экспериментальных работ включает в себя следующие задачи:

- определение устойчивости полученных нуклеозидов к воздействию внутриклеточной аденозиндезаминазы (для соединений I и II серий);
- первичный скрининг биологической активности синтезированных нуклеозидов на различных биологических моделях.

#### ***Конкретные задачи исследования по сериям:***

*Серия I* — Синтезировать монозамещенные аналоги аденозина из гетероциклических оснований химерных по составу, объединяющих молекулы двух классов в одной структуре: пуриновые гетероциклические основания, имеющие объемные заместители - замещенные бензоксазиновые группы, присоединенные непосредственно к пуриновому основанию или через гексаноильный спейсер. Определить, являются ли гетеродимеры пуринового основания и бензоксазина, обладающие сильными гидрофобными свойствами, субстратами для бактериальной пуриннуклеозидфосфорилазы. Получить серию новых нуклеозидов биокаталитическим способом из гетеродимерных оснований с тремя типами углеводного остатка: природным (рибоза и 2-дезоксирибоза) и неприродным (арабиноза). Установить, позволяет ли введение таких сложных заместителей в 6 положение гетероциклического пуринового основания от нежелательного действия аденозиндезаминазы внутри клетки. Исследовать противовирусную активность модифицированных нуклеозидов первой серии

в отношении вируса герпеса 1 типа (ВПГ-1, штамм L<sub>2</sub>) *in vitro*, включая устойчивый к ацикловиру штамм вируса (HSV-1, штамм L<sub>2</sub>/R).

*Серия II* — Синтезировать дизамещенные аналоги арабинозидов аденозина из соответствующих рибозидов, несущих остаток оптически активной аминокислоты в C<sub>6</sub> положении и атом хлора в C<sub>2</sub> положении. Определить, являются ли конъюгаты пуриновых рибозидов с хиральными аминокислотами субстратами для бактериальной пурииннуклеозидфосфорилазы. Тестирование субстратной специфичности ADA *E. coli* по отношению к синтезированным арабинозидам. Исследовать цитотоксическую активность соединений на клетках лейкемической моноцитарной лимфомы человека линии U937 (Т-лимфобластного лейкоза человека) *in vitro*.

*Серия III* — Синтезировать флексимерные аналоги 8-аза-7-дезаза-аденозина, представляющие собой проксимальные флексимерные аналоги аденозина (4'-5, C-C связь), где первый компонент цикла флексимерного основания - пиразол вместо имидазола, который обычно входит в состав всех аналогов нуклеозидов пуринового ряда; а второй компонент - аминопиридин или аминопиримидин. Определить, являются ли флексимерные основания субстратами для бактериальной пурииннуклеозидфосфорилазы. Получить серию новых нуклеозидов с тремя типами углеводного остатка: природным (рибоза и 2-дезоксирибоза) и неприродным (арабиноза). Исследовать антивирусную активность флексимерных аналогов 8-аза-7-дезаза-аденозина на широкой панели ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Изучить антибактериальное действие на 10 коллекционных тест-культурах (6 грамположительных бактериях, 2 грамотрицательных бактериях и 2 грибах).

### **2.1.1 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 C<sub>6</sub> 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.

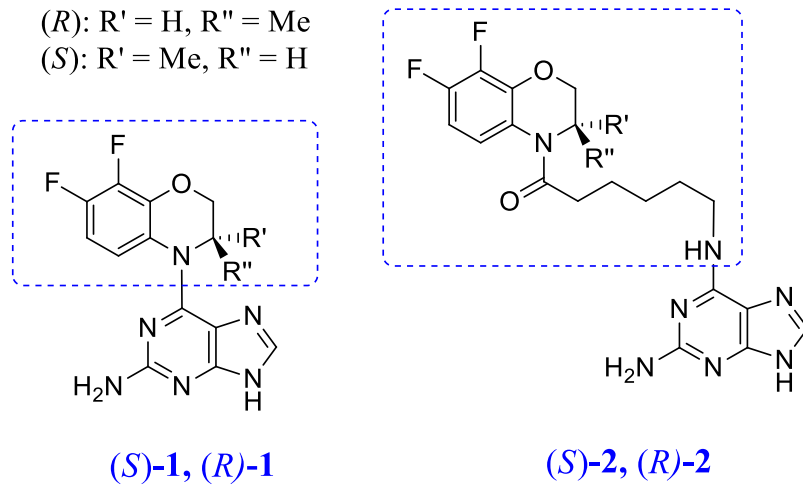
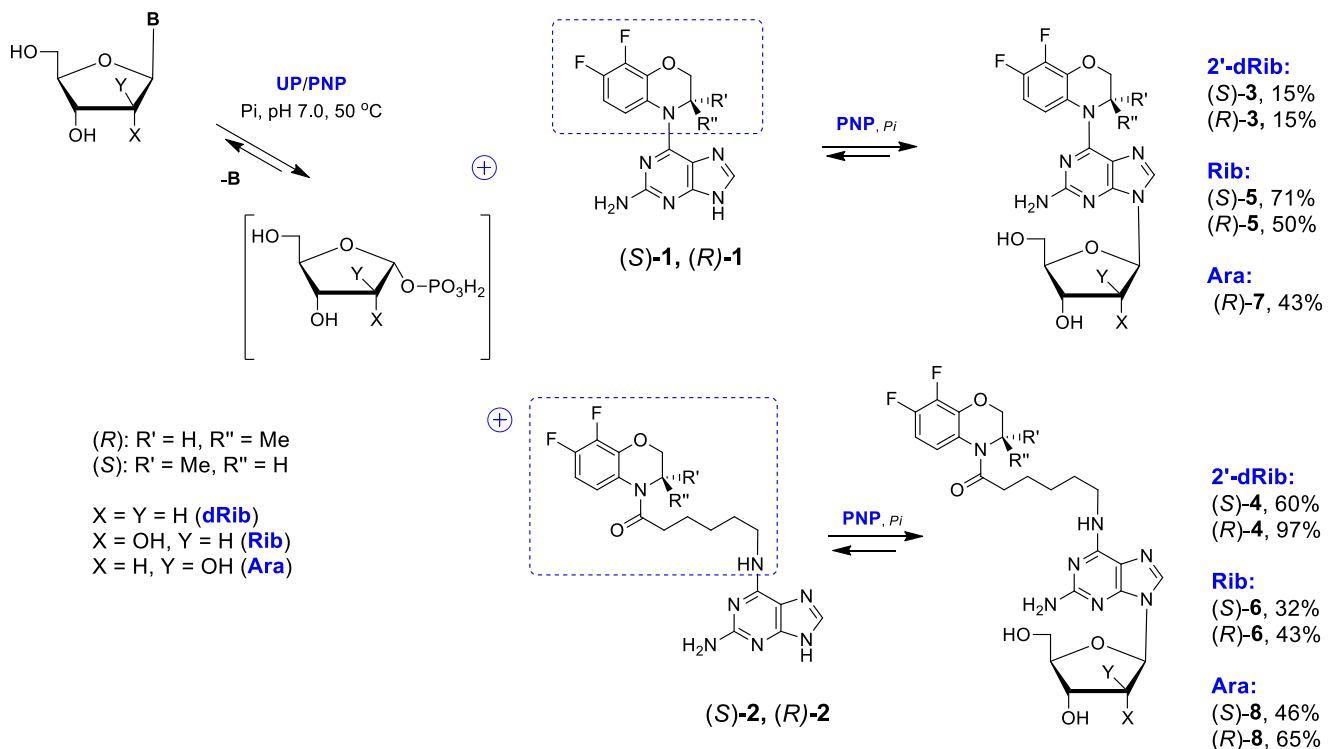


Рисунок 2 — Серия гетеродимерных гетероциклических оснований модифицированных по 6-му положению 2-аминопуринов

Тестовые реакции показали, что исследованные основания (конъюгаты 2-аминопурина с энантиомерами 3-метил-3,4-дигидро-2H-[1,4]бензоксазина (*R,S*)-1 и (*R,S*)-2 - субстраты для рекомбинантной PNP *E. coli* (EC 2.4.2.1). Кроме того, была показана возможность введения остатков рибозы, 2-деоксирибозы и арабинозы (Рис. 3)



PNP – Пури nukлеозидфосфорилаза *E. coli*, UP – Уридинфосфорилаза *E. coli* (EC 2.4.2.3)

Pi- фосфат неорганический

Рисунок 3 — Ферментативное трансгликозилирование 6-замещенных аналогов 2-аминопурина с использованием рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз

На Рис. 4 приведены полученные с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) данные по конверсии оснований в соответствующие нуклеозиды. Условия тестовых реакций: основание-акцептор (2 мМ), донор углеводного основания 2'-дезоксинозин (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.

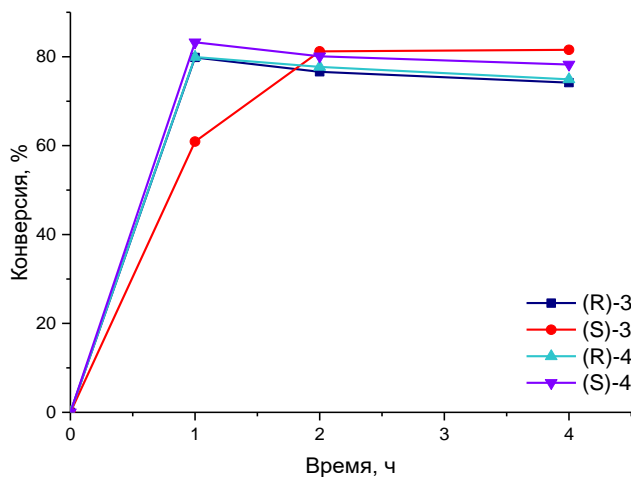


Рисунок 4 — Конверсия оснований (S,R)-1 и (S,R)-2 в 2'-дезоксирибозиды (S,R)-3 и (S,R)-4

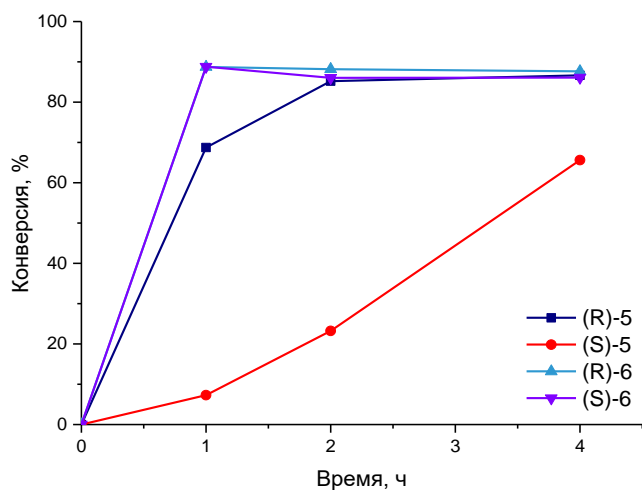


Рисунок 5 — Конверсия оснований (S,R)-1 и (S,R)-2 в рибозиды (S,R)-5 и (S,R)-6

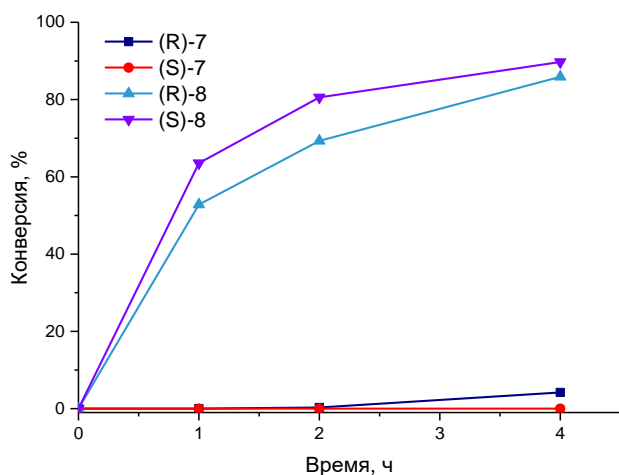


Рисунок 6 — Конверсия оснований (S,R)-1 и (S,R)-2 в арабинозиды (R)-7 и (S,R)-8

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.

Особенно хорошо разница в эффективности видна на примере арабинозилирования. Арабинозилирование соединений (R)-4 и (S)-4 (Рис. 6), 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 рибоз: аденозина (Ado); инозина (Ino); уридина (Urd). Как представлено на Рис. 7, конверсия основания (R)-2 в рибозид (R)-4 практически не зависела от донора рибозы.



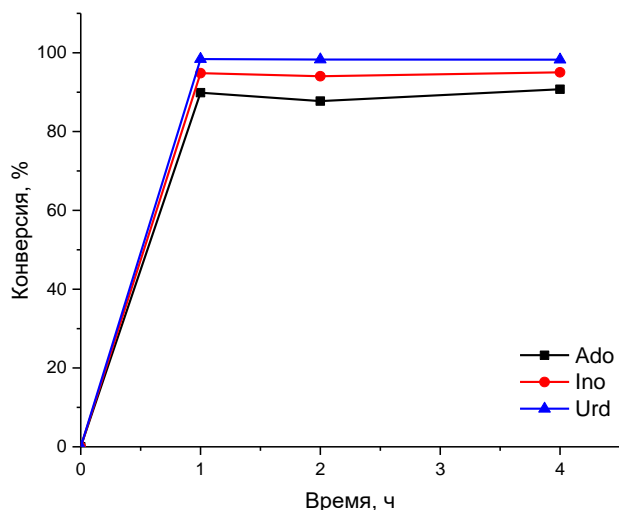


Рисунок 7 — Конверсия оснований (*R*)-2 в реакции с различными донорами рибофуранозы (Ado, Ino, Urd)

Условия тестовых реакций: 1.0 мл буфера (5 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.0), 50 °С, 4 ч, основание (*S*)-2 (2 мМ) и нуклеозид-донор: Urd (6 мМ), 6 ед. PNP *E. coli* и 4 ед UP

*E. coli*; Ino (6 мМ), 5 ед. акт. PNP *E. coli*; Ado (6 мМ), 5 ед. акт. PNP *E. coli*.

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  $\alpha$ -D-арабинофуранозил-1-фосфата (1-P-Ara), который образовывался *in situ* из 1- $\beta$ -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.

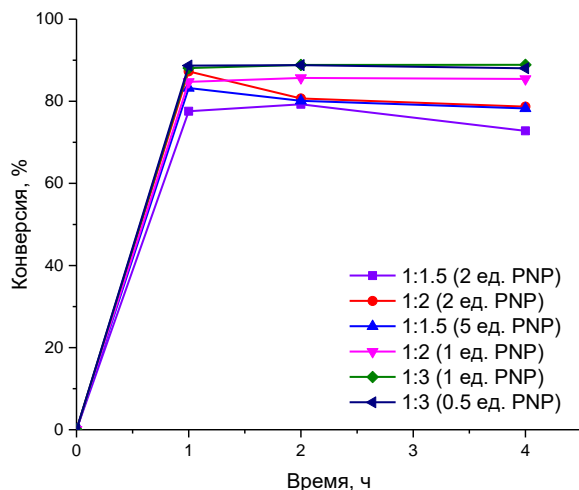


Рисунок 8 — Конверсия оснований (R)-2 в 2-дезоксирибозид (S)-4. Условия реакции: основание (S)-2 (2 мМ) и донор углеводного фрагмента 2'-dIno (3, 4, 6 мМ) в 1.0 мл 5 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7.0, 0.5, 1, 2, 5 ед. акт. PNP *E. coli*, 50 °С, 4 ч

Соотношение модифицированного гетероциклического основания и донора углеводного остатка 1:3 оказалось удачным для синтеза нуклеозидов всех трех типов. Параметры рН среды и температура не оптимизировали, т.к. известно, что UP и PNP активны в широком диапазоне рН и температуры, но оптимальными являются рН 7.0 (5-10 мМ калий-фосфатный буфер) и 50 °С [86].

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;
- рН 7.0 (5-10 мМ калий-фосфатный буфер);
- температура 50 °С.

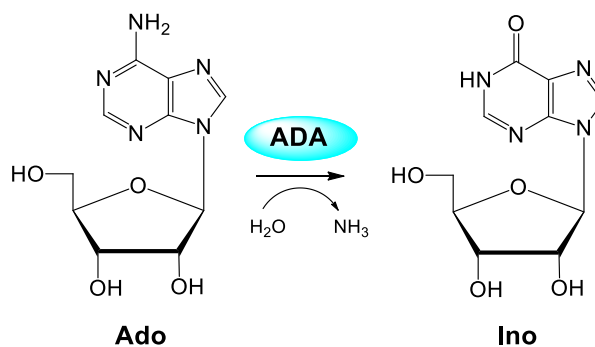
В результате синтезировано восемь новых модифицированных нуклеозидов с *природными типами* углеводного остатка и три новых, имеющих в составе неприродный углеводный остаток - *арабинозу*. Экспериментальные данные по синтезу и физико-химические свойства нуклеозидов серии I приведены в Табл. 8-9 в разделе 3. Все синтезированные соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов получены <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР спектры (включая [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H] и [<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C] 2D: COSY, HSQC и HMBC).

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

Известно, что действие внутриклеточного фермента ADA может привести к деактивации соединения; данное обстоятельство непосредственно повлияет на его биологическую активность (Рис 9).

В связи с этим мы проверили 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).



ADA – аденозиндезаминаза (EC 3.5.4.4)

Рисунок 9 — Дезаминирование аденозина аденозиндезаминазой (ADA)

Реакционные смеси содержали 1 мМ модифицированного нуклеозида, 20 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7.0), 1 ед. акт./мл ADA *E. coli* или 1 ед. акт./мл ADA *CI*, при 25 °С. Контрольные реакции проводились в идентичных условиях.

Таблица 1 — Результаты эксперимента по дезаминированию нуклеозидов Серии I

Субстрат/продукт	ADA <i>E. coli</i>		ADA <i>CI</i>	
	Конверсия субстрата, %		Конверсия субстрата, %	
	1 ч	24 ч	1 ч	24 ч
(S/R)-3	н/о	н/о	н/о	н/о
(S/R)-4	н/о	н/о	н/о	н/о
(S/R)-5	н/о	н/о	н/о	н/о
(S/R)-6	н/о	н/о	н/о	н/о

(R)-7	н/о	н/о	н/о	н/о
(S/R)-8	н/о	н/о	н/о	н/о
Ado / Ino	30.85	98.65	19.93	99.39
2'-dAdo / 2'-dIno	17.71	98.47	13.08	96.65
AraA / AraI	13.06	96.57	4.47	51.27

н/о – не определено

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 (Табл. 1).

Таким образом, соединения первой серии - это не субстраты аденозиндезаминаз ADA *E. coli* и ADA *Cl*. 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.

### 2.1.3 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 L<sub>2</sub> вируса герпеса простого типа1 (ВПГ-1/ L<sub>2</sub>), полученный из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, а также штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>/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) (Рис. 10).

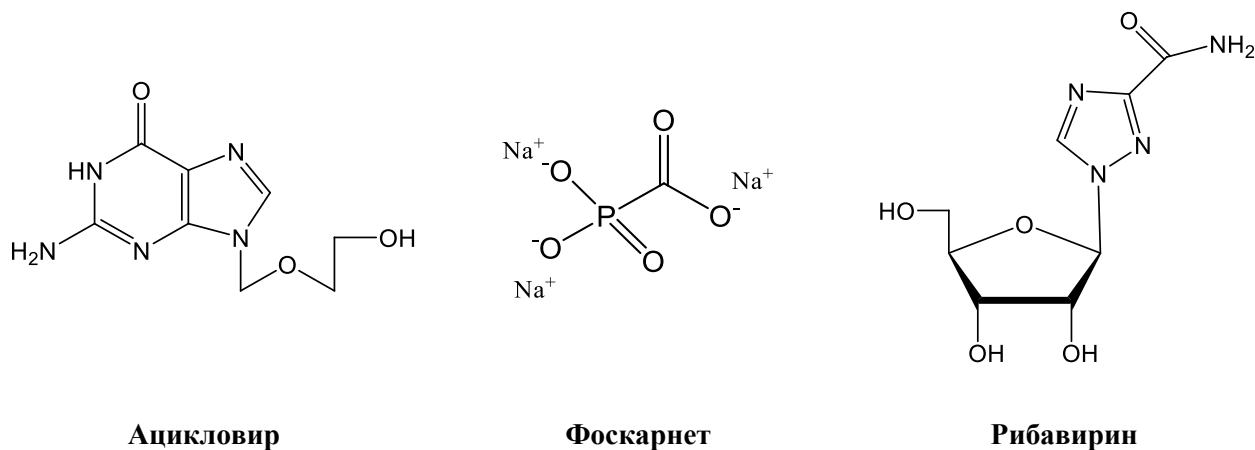


Рисунок 10 — Структурные формулы референс-препаратов

Противовирусную активность модифицированных нуклеозидов оценивали в отношении вируса герпеса 1 типа (ВПГ-1, штамм L<sub>2</sub>). Цитотоксические свойства соединений, в отношении клеток Vero Е6 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 (Таблица 2).

Как видно из представленных результатов, 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 = ЦД<sub>50</sub>/ ИД<sub>50</sub>, 1 ÷ 3), значения ЦД<sub>50</sub>, характеризующие уровень токсичности для культуры клеток Vero Е6, близки или превышают концентрацию 1000 мкг/мл. Их цитотоксичность оказалась ниже цитотоксичности оснований (*S*)-, (*R*)-**1** и (*R*)-**2**. Другие нуклеозиды проявляли умеренную цитотоксичность (ЦД<sub>50</sub> > 300 мкг/мл).

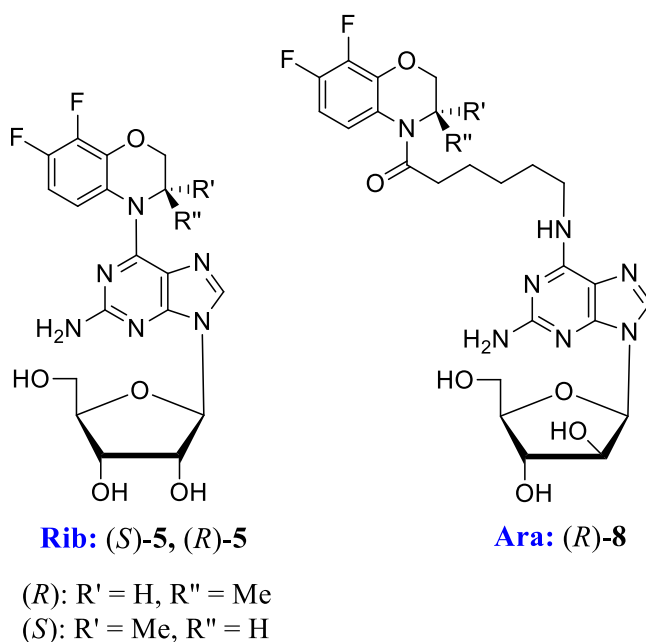


Рисунок 11 — Структурные формулы наиболее активных соединений в Серии I

Рибозиды **5** (Рис. 11) проявляют значительную селективную активность в отношении ВПГ-1 *in vitro*, включая устойчивый к ацикловиру штамм вируса (HSV-1, штамм L<sub>2</sub>/R).

Соединения (*S*)-**6** и (*R*)-**6** проявляют невысокую, но достоверную противовирусную активность на модели вируса герпеса простого типа ВПГ-1/ L<sub>2</sub> *in vitro*, включая штамм вируса ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R, глубоко резистентный к ацикловиру. Как следует из представленных результатов, рибозиды можно отнести к низкотоксичным соединениям (величины ЦД<sub>50</sub>, характеризующие уровень их токсичности для культуры клеток, близки или превышают концентрацию 1000 мкг/мл). (*S*)-**6** и (*R*)-**6** малотоксичны для культуры клеток Vero Е6 при использовании метода визуального наблюдения и при оценке жизнеспособности клеток (с помощью метода определения жизнеспособности клеточных культур окрашиванием трипановым синим).

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

Таблица 2 — Цитотоксические свойства и противовирусная активность нуклеозидов в культуре клеток Vero E6 на модели вируса герпеса простого типа 1 (HSV-1 штамм L<sub>2</sub>) и на модели HSV-1, устойчивого к действию ацикловира HSV-1 штамм L<sub>2</sub>/R (м.и. 0.1 БОЕ/кл)

Соединение	МПК, мкМ	ЦД <sub>50</sub> , мкМ	ВПГ-1/L <sub>2</sub>			ВПГ-1/L <sub>2</sub> /R		
			ИД <sub>50</sub> , мкМ	ИД <sub>95</sub> , мкМ	ХТИ	ИД <sub>50</sub> , мкМ	ИД <sub>95</sub> , мкМ	ХТИ
(S)-1	148.44	> 296.88	37.11	148.44	> 8	37.11	148.44	> 8
(R)-1	74.22	167.61 ± 9.66	74.22	148.44	2	74.11	148.44	2
(S)-2	296.83	660.80 ± 5.30	660.20	1200.50	1	660.20	1200.50	1
(R)-2	296.83	462.50 ± 11.50	148.44	>296.83	3	148.44	296.83	3
(S)-4	593.75	730.77 ± 50.00	593.75	>593.75	1.2	593.75	>593.75	1.2
(R)-4	593.75	690.38 ± 36.53	296.88	593.75	2.3	296.88	593.75	2.3
(S)-5	593.75	> 1187.5	37.11	593.74	> 32	37.11	593.75	> 32
(R)-5	593.75	855.82 ± 6.28	37.11	296.88	23	37.11	296.88	23
(S)-6	1187.5	1865.62 ± 34.38	593.75	1187.5	3.1	1187.5	1187.5	1.6
(R)-6	593.75	1441.38 ± 75.86	445.32	1187.5	3.2	445.32	1187.5	3.2
(S)-8	1187.5	1982.76 ± 65.52	593.75	1187.5	3.3	593.75	1187.5	3.3
(R)-8	> 875	> 875	218.75	593.75	> 4	-	-	-
Ацикловир	> 444	н.и.	1.73	6.93	> 256	> 444	> 444	0
Фоскарнет	> 416.61	н.и.	104.15	208.30	> 4	104.15	208.30	> 4
Рибавирин	> 4095	н.и.	511.88	2047.50	> 8	511.88	2047.50	> 8

БОЕ: бляшкообразующая единица. МПК: максимально переносимая концентрация - наибольшая концентрация соединения, не вызывающая деструктивных изменений клеточного монослоя, видимых в световой микроскоп. ЦД<sub>50</sub>: 50% цитотоксическая концентрация соединения, необходимая для снижения жизнеспособности клеток Vero E6 на 50%. ИД<sub>50</sub>: 50% эффективная концентрация соединения, обеспечивающая 50% защиту клеток Vero E6 от цитопатического действия HSV-1. ИД<sub>95</sub>: 95% эффективная концентрация соединения, обеспечивающая 95% защиту клеток Vero E6 от цитопатического действия HSV-1. ХТИ = ЦД<sub>50</sub>/ ИД<sub>50</sub>: индекс селективности. "-" – не определено.

#### 2.1.4 Выводы по разделу 2.1

Показано, что 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'-дезокси-, рибо-, арабинозилирования.

Зависимость влияния (S)- или (R)- конфигурации метильной группы в случае с б-замещенными основаниями, имеющими гексаноильный спейсер на субстратно-специфические свойства фермента PNP, не выявлено.

Скорость реакции трансгликозилирования основания, имеющего бензоксазиновый заместитель, присоединенный непосредственно к пуриновому основанию с метильной группой в (S)-конфигурации, ниже, чем у аналогичного (R)-изомера.

Оптимизированы методы ферментативного синтеза производных первой серии и получена серия из одиннадцати новых модифицированных нуклеозидов и углеводными остатками трех типов (рибоза, 2-дезоксирибоза и арабиноза).

Проведено изучение противовирусной активности шести синтезированных нуклеозидов на моделях вируса простого герпеса 1-го типа (эталонный штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>), а также штамма ВПГ-1/L<sub>2</sub>/R, резистентного к ацикловиру.

Результаты исследования опубликованы в статьях:

- B. Z. Eletsкая, et al. 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)
- B. Z. Eletsкая, et al. 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)

## 2.2 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 и хиральных аминокислот в С6 положении пуринового основания, оказались хорошими субстратами в реакции трансарабинозилирования (Рис. 12). Как показали эксперименты, равновесие реакции в большей степени смещено в сторону синтеза целых нуклеозидов.

Была оценена возможность получения арабинозидов на основе двенадцати 2,6-дизамещенных рибозидов. Рибозиды 2-хлор-6-замещенных пуринов синтезированы в Лаборатории биотехнологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

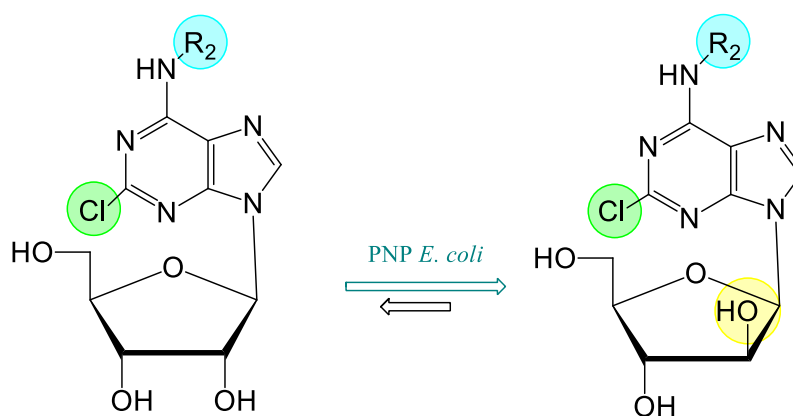
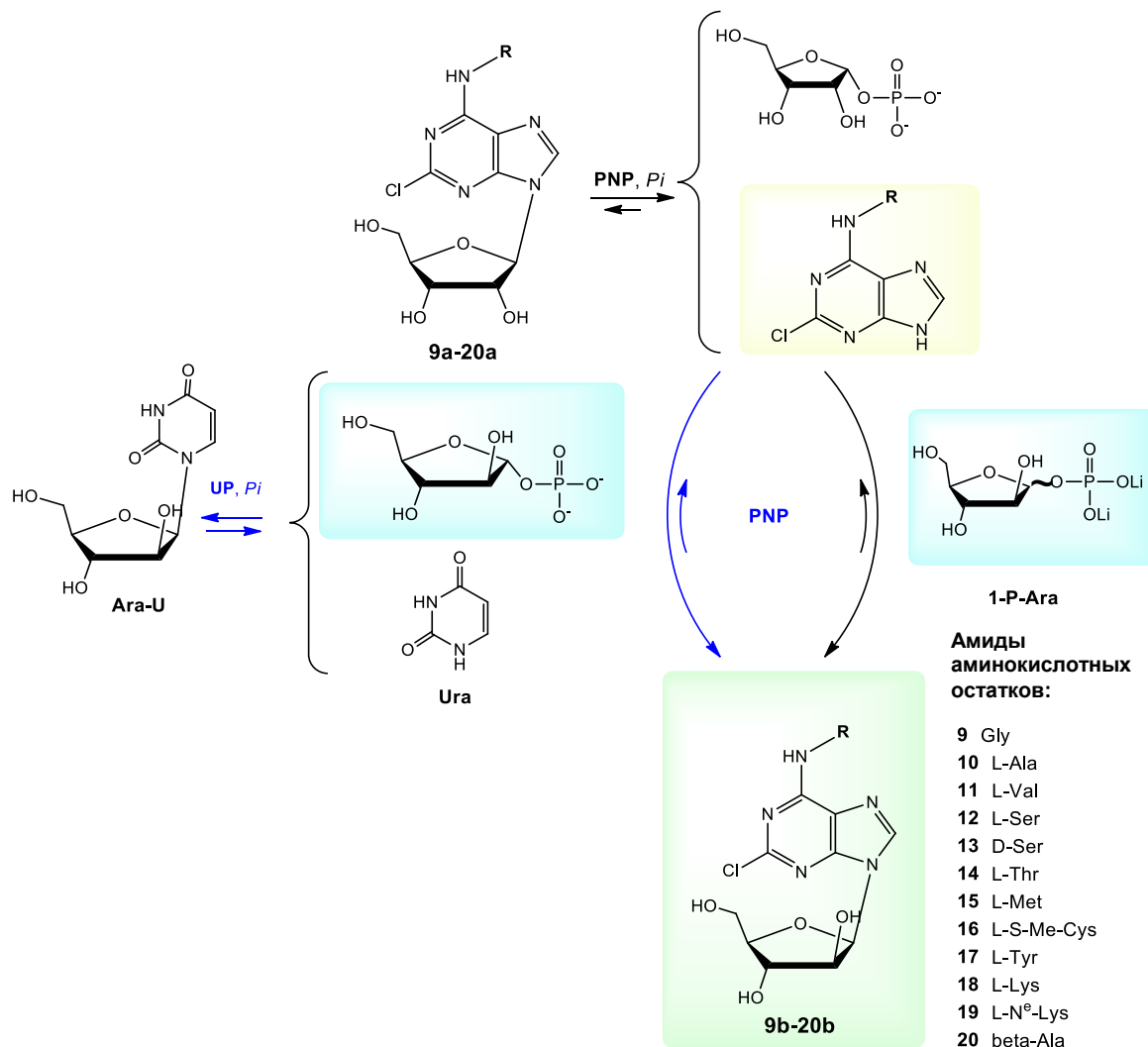


Рисунок 12 — Ферментативное трансарабинозилирование 2,6-дизамещенных рибозидов

Реакцию трансгликозилирования можно проводить двумя способами: используя в качестве донора арабинозы синтетический 1-фосфат арабинозы (1-P-Ara) [82] или 1-β-D-арабинофуранозилурацил (Ara-U). В первом случае применяется



пуриннуклеозидфосфорилаза (PNP) (Рис. 13, черная стрелка). Во втором случае используются два фермента - PNP и уридинфосфорилаза (UP) [3] (Рис 13, синяя стрелка). AraU легко синтезировать из уридина через 2,2'-ангидроуридин по методу I. Wempen [120].



PNP – пуриннуклеозидфосфорилаза *E. coli*, UP – уридинфосфорилаза *E. coli*

Pi- неорганический фосфат, 1-P-Ara - 1-фосфат арабинозы

Рисунок 13 — Способы получения пуриновых арабинозидов

Для примера на Рис. 14 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.

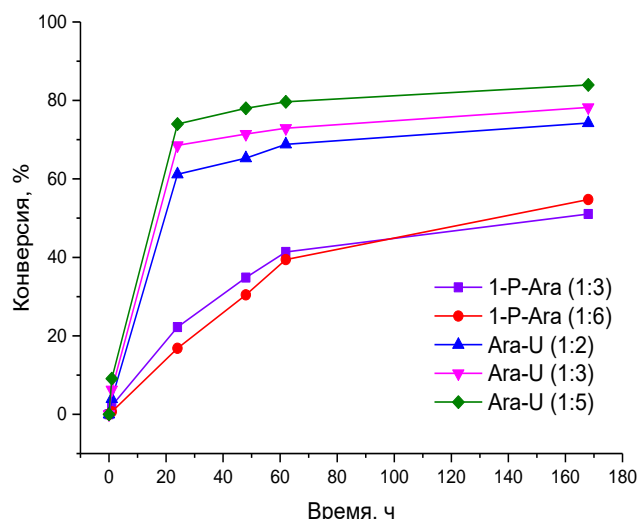


Рисунок 14 — Зависимость превращения рибозида **9a** в арабинозид **9b** от типа и количества донора арабинозы

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 (pH 7.0).

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

Экспериментальные данные конверсии и выход арабинозидов серии II представлены в Таблица 3.

Таблица 3 — Экспериментальные данные по конверсии рибозидов **9b** – **20b** в реакции синтеза арабинозидов

Соединение	Амид аминокислоты	Заместитель (-R)	Конверсия в нуклеозид, % (ВЭЖХ),	Выход (%),
<b>9b</b>	Gly	-CH-CONH <sub>2</sub>	82.88	63
<b>10b</b>	L-Ala	-CH(CH <sub>3</sub> )-CONH <sub>2</sub>	81.44	50
<b>11b</b>	L-Val	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub>	69.15	46
<b>12b</b>	L-Ser	-CH(CH <sub>2</sub> OH)-CONH <sub>2</sub>	90.60	81
<b>13b</b>	D-Ser	-CH(CH <sub>2</sub> OH)-CONH <sub>2</sub>	78.10	77
<b>14b</b>	L-Thr	-CH(CH(OH)CH <sub>3</sub> )-CONH <sub>2</sub>	80.57	60
<b>15b</b>	L-Met	-CH(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub> )-CONH <sub>2</sub>	91.51	88
<b>16b</b>	L-S-Me-Cys	-CH(CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub> )-CONH <sub>2</sub>	80.39	75
<b>17b</b>	L-Tyr	-CH(CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH)-CONH <sub>2</sub>	94.83	68
<b>18b</b>	L-Lys	-CH(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> )-CONH <sub>2</sub>	96.85	92
<b>19b</b>	N <sup>ε</sup> -Lys	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )-CONH <sub>2</sub>	71.76	52
<b>20b</b>	β-Ala	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub>	70.02	63

### 2.2.2 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. 16A).

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. 16A)

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) [121-123].

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 [124]. В присутствии солей мышьяковой кислоты в активном центре PNP из рибозида образуется интермедиат - нестабильное соединение  $\alpha$ -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. 15).

Арсенат арабинозы в реакционной смеси практически не образуется при добавлении каталитического количества арсената натрия  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  (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  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  (до 0.5 мМ) содержащийся в реакции исходный рибозид в течение 24 ч быстро гидролизовался до соответствующего гетероциклического основания. Это позволило селективно вывести из реакции ферментативного синтеза D-рибофуранозу. В оптимизированных условиях было синтезировано двенадцать новых модифицированных нуклеозидов.

В результате использования арсенолиза рибозидов количество компонентов в реакционных смесях (по данным ВЭЖХ) уменьшается с шести до четырех (Рис. 16B) и существенно облегчается выделение целевых продуктов. Поэтому для выделения целевых

нуклеозидов мы использовали обычную колоночную хроматографию вместо препаративной ВЭЖХ.

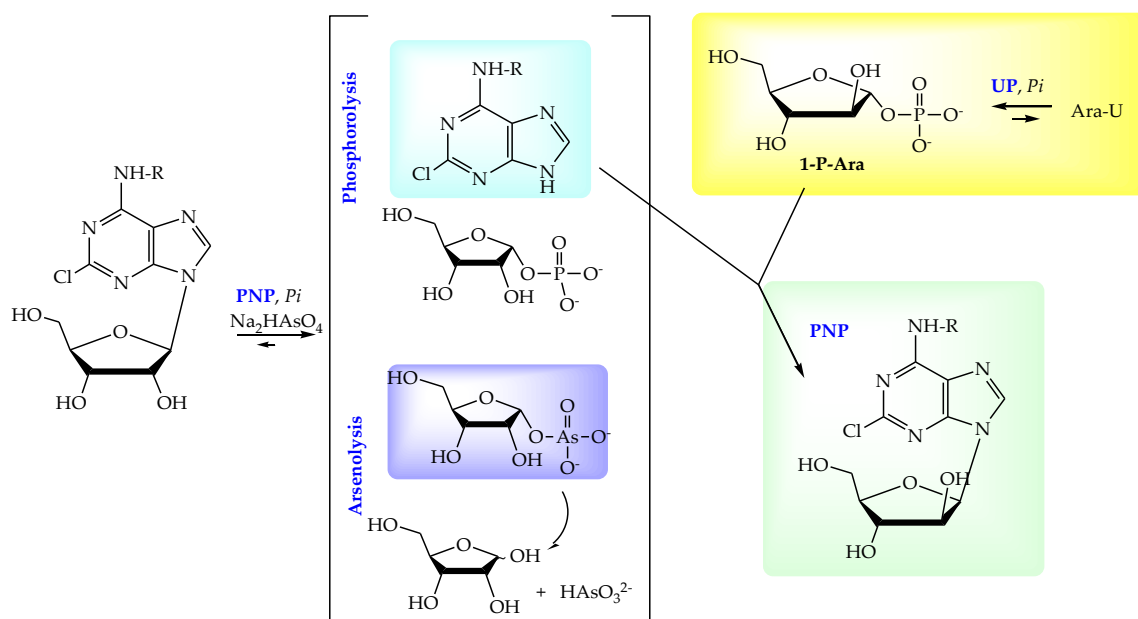


Рисунок 15 — Схема процесса арсенолиза рибозидов в реакции ферментативного трансгликозилирования

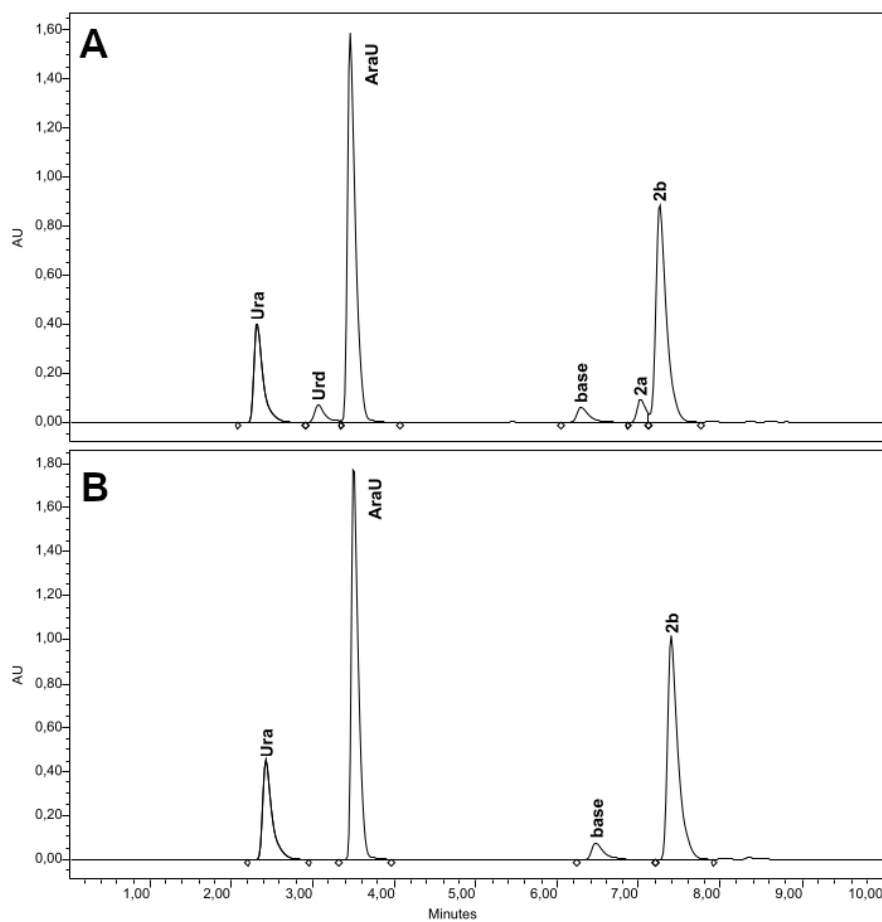


Рисунок 16 — ВЭЖХ-профили реакционной смеси для синтеза производного аланина 2b без арсената (А) и с арсенатом натрия (В)

Таблица 4 — Время удерживания ( $t_R$ ) и площадь пиков соединений

Компонент	Ura	Urd	Ara-U	ГЦО	10a	10b
$t_R$ соединения, мин	2.312	3.062	3.454	6.285	7.014	7.248
Площадь пика до добавления арсената, %	13.25	2.84	44.72	3.00	2.87	33.32
Площадь пика после добавления арсената, %	15.09	-	44.00	3.57	-	37.34

Интересно, что эффективность синтеза арабинозида не меняется в зависимости от того, когда был добавлен арсенат: в самом начале синтеза или после достижения равновесного состояния.

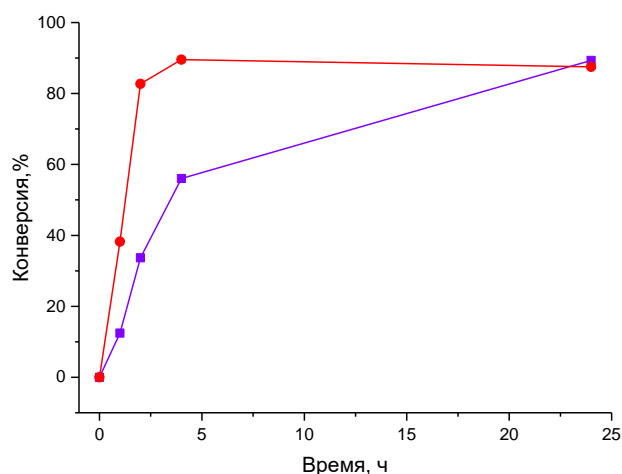


Рисунок 17 — Зависимость скорости синтеза арабинозида **15b** от момента добавления арсената в реакционную смесь.

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

На Рис. 17 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.

В результате синтезировано двенадцать новых модифицированных нуклеозидов **9b – 20b**, имеющих в составе неприродный углеводный остаток - *арабинозу*. Экспериментальные данные по синтезу и физико-химические свойства нуклеозидов серии II приведены в Табл. 10 - 11 в разделе 3. Все синтезированные соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов были получены  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры (включая  $[\text{}^1\text{H}, \text{}^1\text{H}]$  и  $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C}]$  2D: COSY, HSQC и HMBC).  $^1\text{H}$  ЯМР спектры нуклеозидов серии II приведены в Приложении 12-24.

### 2.2.3 Изучение субстратной специфичности аденозиндезаминазы ADA *E. coli*

Оценивали устойчивость полученных соединений к действию аденозиндезаминазы *E. coli* (Рис. 18). Для установления корреляции структура-активность в биологических экспериментах дополнительно синтезировали шесть нуклеозидов: 9-β-D-арабинофуранозил-2-амино-6-(Nα-глицинил)-пурин (**21**), 9-β-D-арабинофуранозил-2-амино-6-(N<sup>α</sup>-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** [25], **24** [44], **25** и **26** [45] были синтезированы в лаборатории по ранее разработанным методикам.

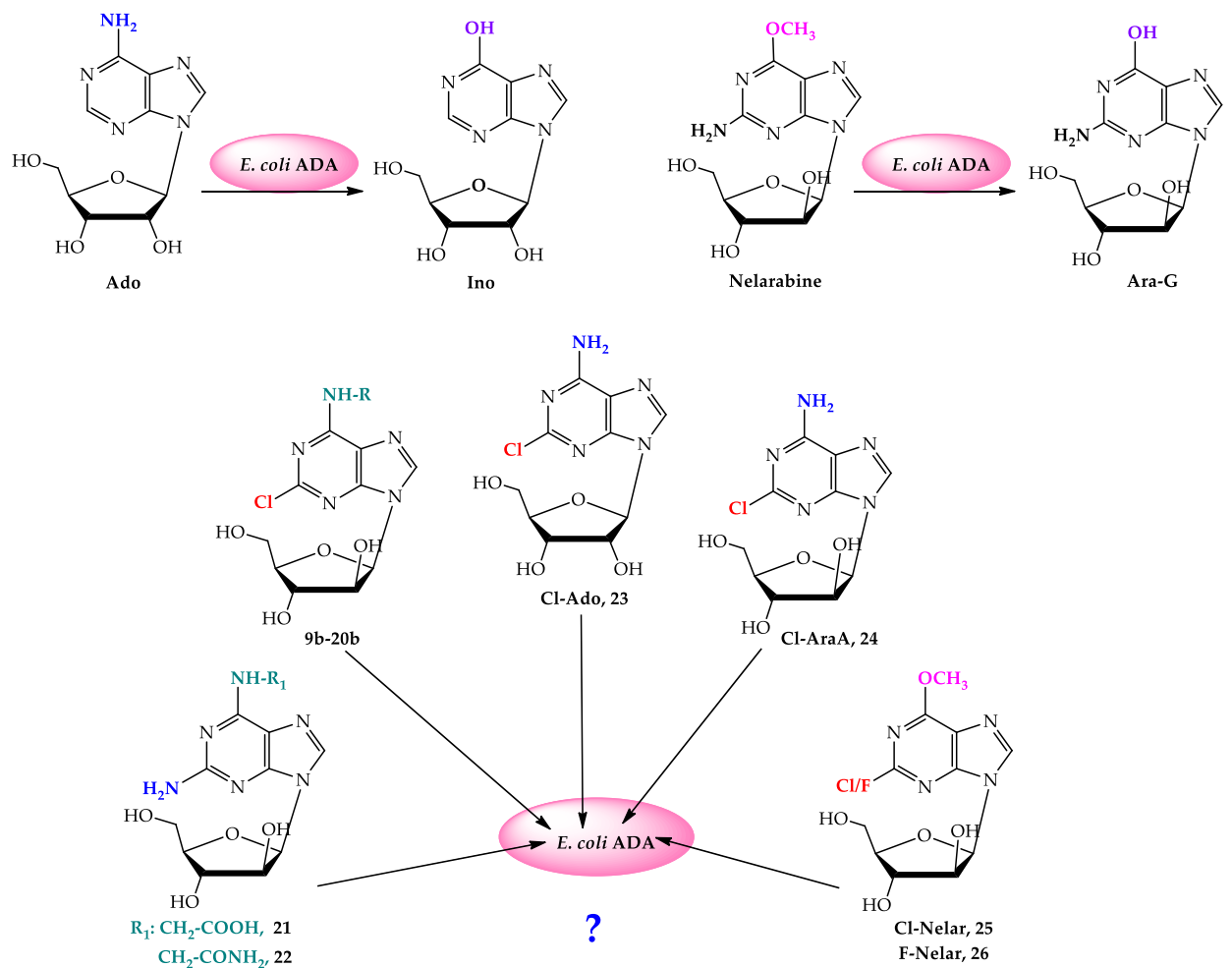


Рисунок 18 — Тестирование субстратной специфичности ADA *E. coli* по отношению к синтезированным нуклеозидам

Все арабинонуклеозиды **9b** – **20b** были устойчивы к бактериальной ADA. Кроме того, атом хлора/фтора в положении C2 пурина предотвращает связывание нуклеозидов с активным центром ADA.

Оба арабинофуранозиды глицина 2-хлораденина **9b** и 2-аминоаденина **22** не являются субстратами бактериальной ADA. Введение амида аминокислоты в положение C6 пурина делает нуклеозиды устойчивыми к аденозиндезаминазе.

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. Действие 2-хлораденозина **23**, 2-хлор-9-β-D-арабинофуранозиладенина **24** и L-сериларабинофуранозида **12b** на активность ADA показано на Рис. 19.

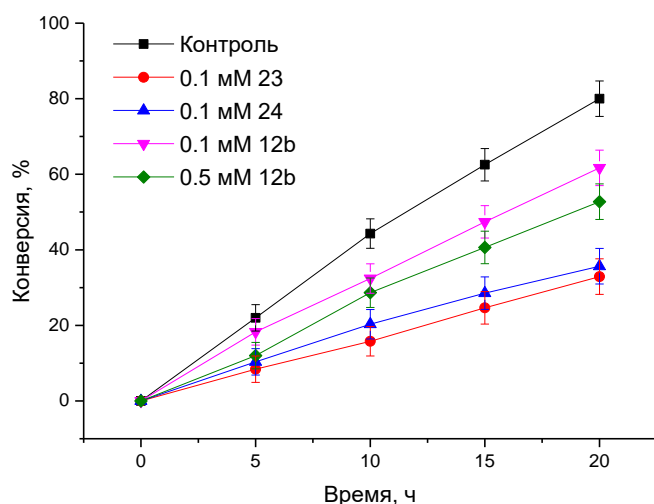


Рисунок 19 — Скорость дезаминирования аденозина в присутствии нуклеозидов **23**, **24** и **12b** (контроль – аденозин)

Все реакции проводили в 1 мл 20 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7.0) при 25 °С. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Реакционные смеси содержали аденозин (0.26 мг, 0.1 ммоль), **23**, **24** (0.3 мг, 0.1 ммоль) или соединение **4b** (0.38 мг, 0.1 ммоль) и 0.23 ед. акт. рекомбинантной ADA *E. coli*. Погрешность измерения не превышала 5%.

Согласно уравнению Лайнуивера — Берка строили графики в обратных в координатах  $1/V$  (y) от  $1/[S]$  (x), получив прямую, тангенс угла наклона который равен величине  $K_m/V_{max}$ ; а отрезок, отсекаемый прямой от оси ординат, представляет собой  $1/V_{max}$  (обратная величина максимальной скорости). Используя наклон и пересечение графиков с осью  $1/V$ , определили значения  $K_m$  и  $V_{max}$  при разных концентрациях ингибитора.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}, \text{ где}$$

$V$  - скорость реакции,  $K_m$  - константа Михаэлиса,  $V_{max}$  - максимальная скорость реакции,  $[S]$  - концентрация субстрата.

Формула 1 — Уравнение Лайнуивера — Берка

Графики Лайнуивера-Берка для дезаминирования аденозина при различных концентрациях **23**, **24** и соединения **12b** представлены на Рис. 20.

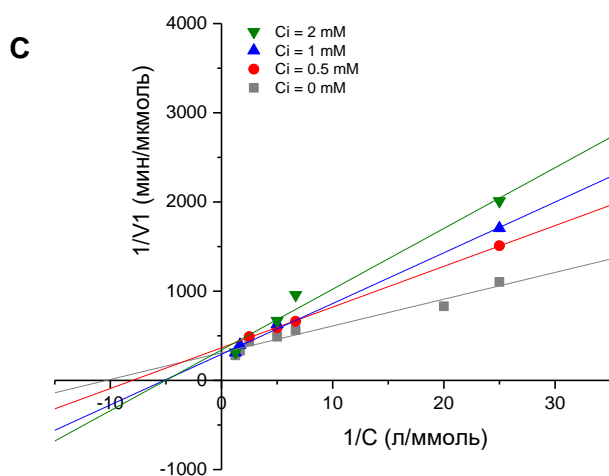
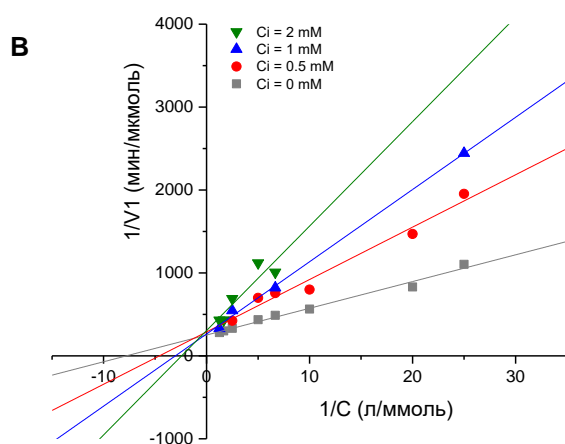
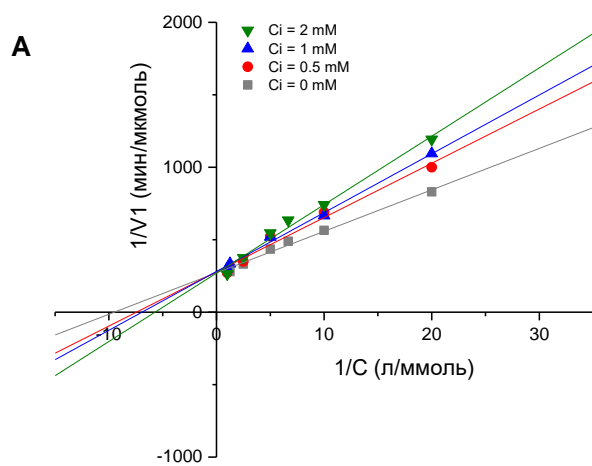


Рисунок 20 — Графики Лайнуивера–Берка для дезаминирования аденозина при различных концентрациях 2-хлораденозина **23** (A), 2-хлор-арабиноаденозина **24** (B) и соединения **12b** (C)



При изучении кинетики фосфоорида аденозина в присутствии изучаемых аналогов, было показано, что соединения являются конкурентными ингибиторами. При разных концентрациях ингибитора получили семейство прямых с различным наклоном, пересекающихся в одной точке на оси ординат. Константы ингибирования рассчитывали по уравнению ингибирования конкурентного типа.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}, \text{ где}$$

$V$  - скорость реакции,  $K_m$  - константа Михаэлиса,  $K_i$  - константа ингибирования,  $V_{max}$  - максимальная скорость реакции,  $[S]$  - концентрация субстрата,  $[I]$  - концентрация ингибитора.

Формула 2 — Уравнение Михаэлиса-Ментен для конкурентного типа ингибирования.

Таблица 5 — Ингибирование аденозиндезаминазы *E. coli*

Ингибитор	$K_i$ , mM
2-хлораденозин, <b>23</b>	$0.078 \pm 0.012$
2-хлорарабиноаденозин, <b>24</b>	$0.13 \pm 0.02$
<b>12b</b>	$1.2 \pm 0.2$

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.

## 2.2.4 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 лейкемической 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, основанного на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенную соль тетразолия в голубые кристаллы формазана, растворимые в ДМСО.

Результаты выражали в виде средних значений для 4-х параллельных измерений в 2-3 экспериментах как выживаемость клеток в % (опыт/контроль)×100. Соединение считали активным, если его концентрация, вызывающая ингибирование роста на 50% (IC<sub>50</sub>, вычисленная по кривой доза-эффект) была равна или меньше IC<sub>50</sub> для неларабина. Неларабин в диапазоне концентраций от 0.01 мкМ до 100 мкМ подавлял рост клеток U937. Зависимость ингибирования роста клеток от концентрации соединения представлена в Табл. 6.

Для соединений **12b** и **23** показана тенденция дозозависимого повышения цитотоксической активности, при этом значения IC<sub>50</sub> составляют 16.0 и 22.0 мкМ, соответственно (Рис. 21). Цитотоксическая активность соединений сопоставима с активностью стандарта сравнения (IC<sub>50</sub> = 3.3 мкМ).

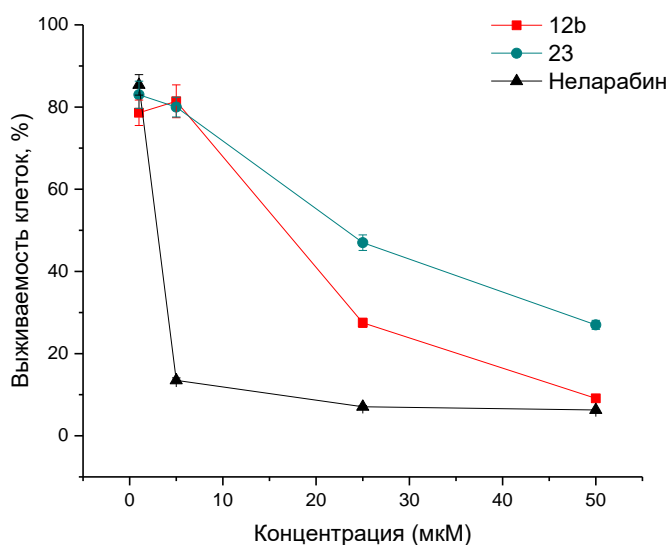


Рисунок 21 — Зависимость выживаемости клеток линии U937 от концентрации соединений **12b**, **23** и препарата сравнения неларабина

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 С1-Неларабина **25** или F-Неларабина **26** показало отсутствие противоопухолевых свойств ( $IC_{50} > 50$  мкМ).

Таблица 6 — Влияние структурных нуклеозидов на выживаемость клеток U937

Соединение	Выживаемость клеток U937, %				$IC_{50}$ , мкМ
	1.00 мкМ	5.00 мкМ	25.00 мкМ	50.00 мкМ	
<b>9b</b>	79 ± 2.3	83 ± 2.4	64 ± 3.2	60 ± 3.0	>50
<b>10b</b>	73 ± 3.6	90 ± 3.6	71 ± 2.8	68 ± 2.0	>50
<b>11b</b>	81 ± 3.2	85 ± 2.5	69 ± 2.7	65 ± 1.9	>50
<b>12b</b>	78 ± 3.1	81 ± 4.0	27 ± 1.1	9 ± 0.2	16.0
<b>13b</b>	80 ± 4.0	76 ± 3.8	58 ± 2.3	48 ± 1.4	50
<b>14b</b>	98 ± 4.9	90 ± 2.7	85 ± 2.5	79 ± 2.3	>50
<b>15b</b>	100 ± 4.0	105 ± 5.2	90 ± 3.6	76 ± 2.2	>50
<b>16b</b>	85 ± 3.4	83 ± 2.4	70 ± 2.1	56 ± 1.7	≈50
<b>17b</b>	88 ± 4.4	82 ± 4.1	76 ± 2.3	70 ± 2.8	>50
<b>18b</b>	74 ± 2.2	71 ± 2.1	69 ± 3.4	61 ± 1.8	>50
<b>19b</b>	84 ± 4.2	89 ± 4.4	84 ± 4.2	79 ± 2.3	>50
<b>20b</b>	100 ± 4.0	82 ± 3.2	71 ± 2.1	69 ± 2.0	>50
<b>21</b>	98 ± 4.0	87 ± 2.6	75 ± 3.0	63 ± 1.8	> 50
<b>22</b>	94 ± 2.8	77 ± 2.3	69 ± 3.4	50 ± 2.0	50
<b>23</b>	83 ± 3.3	80 ± 2.4	47 ± 1.9	27 ± 1.1	22.0
<b>25</b>	92 ± 3.6	88 ± 4.4	80 ± 4.0	73 ± 2.1	>50
<b>26</b>	98 ± 3.9	93 ± 3.7	84 ± 2.5	76 ± 3.8	>50
<b>Неларабин</b>	85 ± 2.5	13 ± 0.6	7 ± 0.3	6 ± 0.1	3.3

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 Сб на гидроксил с образованием аналога активной молекулы Ara-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.

### 2.2.5 Выводы по разделу 2.2

Впервые было показано, что модифицированные пуриновые рибозиды с атомом хлора по C2 и с хиральными аминокислотами по C6 положениям являются хорошими субстратами пурииннуклеозидфосфорилазы.

Оптимизированы условия проведения ферментативного синтеза и синтезировано двенадцать модифицированных арабинозидов, содержащих остатки хиральных аминокислот в C6 положении.

Впервые в синтезе модифицированных арабинозидов использован параллельный процесс арсенлиза исходного рибозида с целью упрощения состава реакционных смесей и выделения целевых нуклеозидов.

Все синтезированные соединения переданы на изучение цитотоксической активности на клетках Т-лимфобластного лейкоза человека *in vitro*.

Исследована противоопухолевая активность (в отношении лейкемической моноцитарной лимфомы человека линия U937) двенадцати синтезированных нуклеозидов серии II. Для соединения **12b** показана тенденция дозозависимого повышения активности с  $IC_{50} = 16.0 \mu M$ , что сопоставимо с активностью препарата сравнения неларабина ( $IC_{50} = 3.3 \mu M$ ). К сожалению, остальные 2,6-замещенные пуриновые арабинозиды оценены как неактивные в отношении лимфомы человека линии U937.

Результаты исследования опубликованы в статье: Eletskaia B.Z., 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 24(7) (2023): 6223, (IF 6.208, Q1). <https://doi.org/10.3390/24076223>

### 2.3 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). 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.

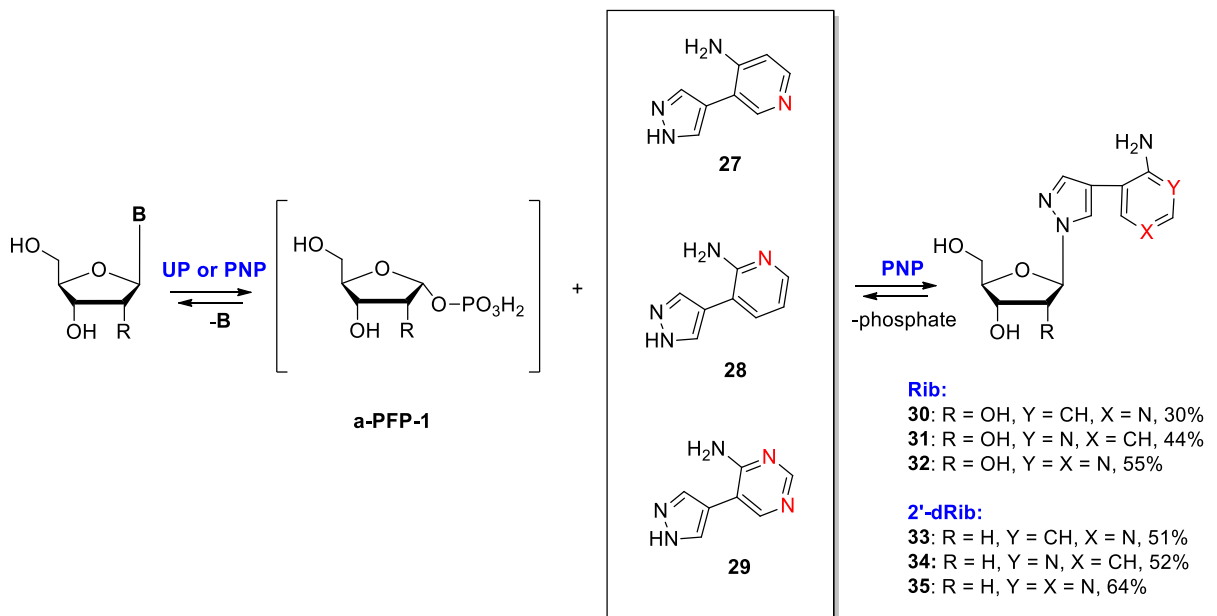


Рисунок 22 — Ферментативное трансгликозилирование флексимерных оснований с использованием рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз *E. coli*

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. 23 - 24 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 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.

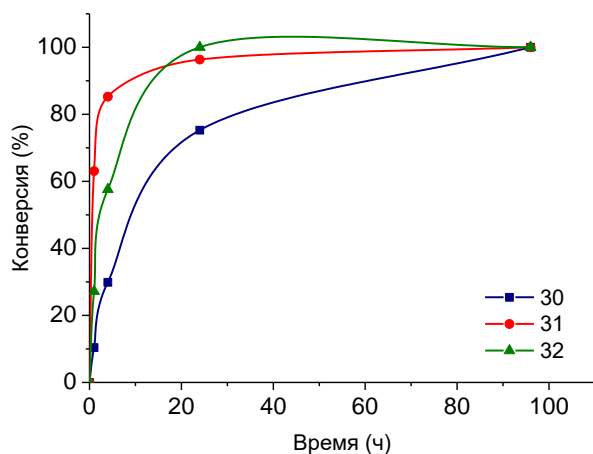


Рисунок 23 — Конверсия флексимерных оснований **27** – **29** в рибозиды **30** – **32**

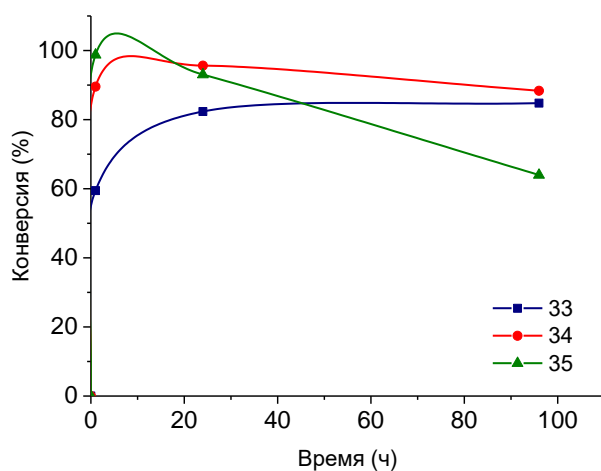


Рисунок 24 — Конверсия флексимерных оснований **27** – **29** в 2'-дезоксирибозиды **33** – **35**

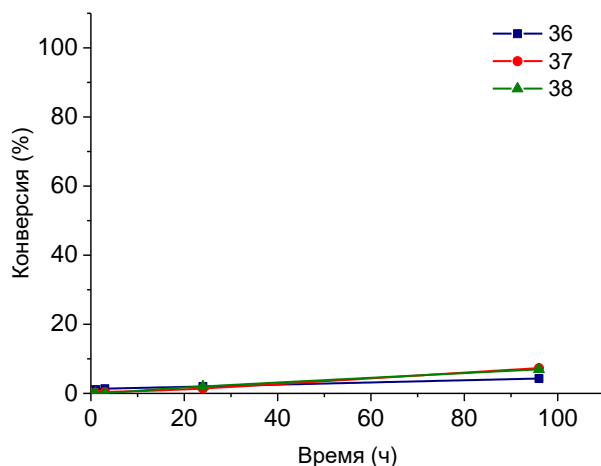


Рисунок 25 — Конверсия флексимерных оснований **27** – **29** в арабинозиды **36** – **38**

При оптимизации ферментативного синтеза с использованием различных доноров рибозы (аденозин (Ado); инозин (Ino); уридин (Urd)) и доноров 2-дезоксирибозы (2'-дезоксиинозин (2'dIno); 2'-дезоксиуридин (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 (Рис. 26).

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% (Рис. 27). Полученные зависимости были одинаковы для флексимерных оснований **27** - **29**.

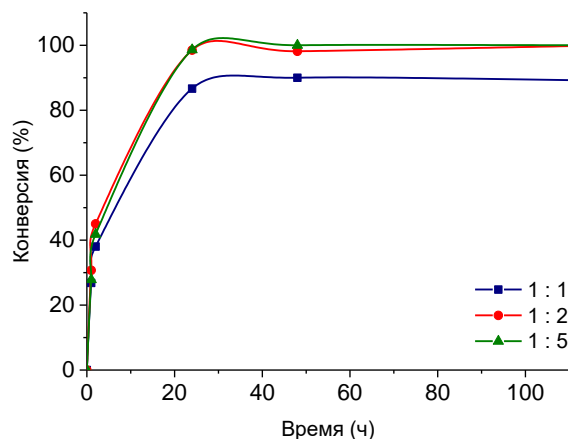


Рисунок 26 — Соотношение субстрат/донор (основание **29** / Urd)

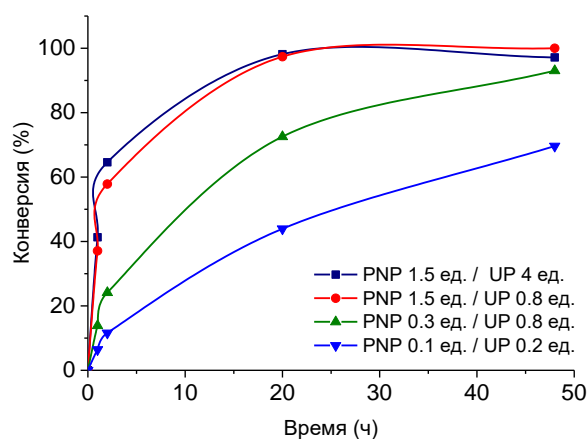


Рисунок 27 — Соотношение ферментов UP/PNP (основание **29** / 2'd-Urd)

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, рН 7.0 (10 мМ калий-фосфатный буфер),
- концентрация ферментов: 0.8 ед. акт./мл UP, 0.3 ед. акт./мл PNP.

### 2.3.1 Побочные продукты реакции трансгликозилирования (4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразола

Из трех представленных оснований в случае трансгликозилирования флексимера 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразола **27** с использованием рекомбинантной PNP *E. coli* было обнаружено образование побочных продуктов реакции. Для определения структур этих образовавшихся соединений была проведена оптимизация 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. 28).

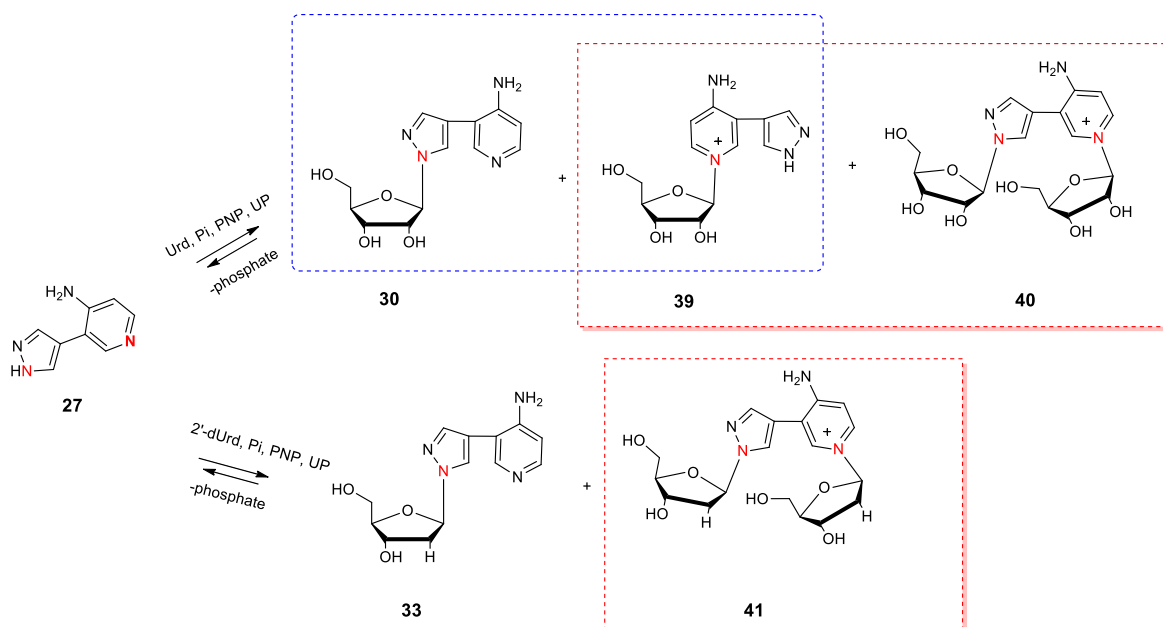


Рисунок 28 — Ферментативное трансгликозилирование флексимерного основания **27** с образованием побочных продуктов реакции.

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. 29).

В случае дезоксирибозилирования отмечается преимущественное гликозилирование по пиразольному циклу **33** и образование продукта бисгликозилирования **41** (Рис. 30).



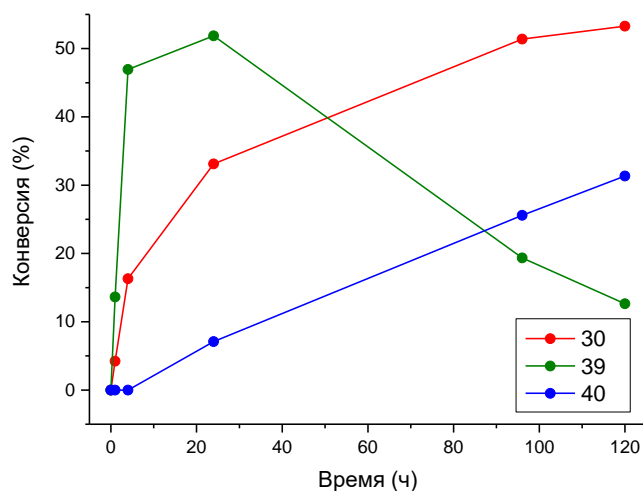


Рисунок 29 — Конверсия основания **27** в рибозиды **30**, **39** и бисгликозид **40**

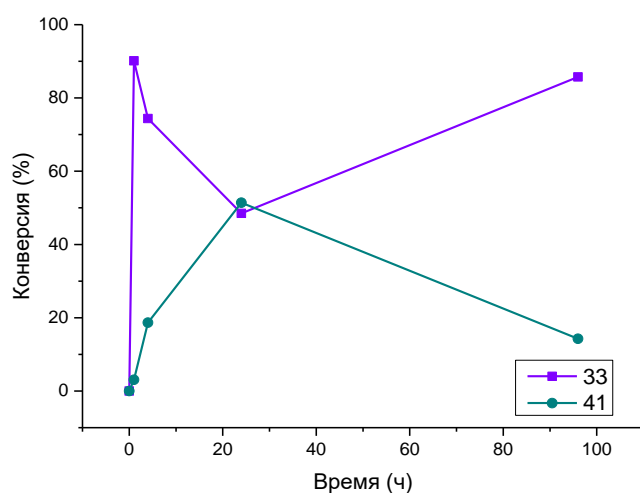


Рисунок 30 — Конверсия основания **27** в 2'-дезоксирибозид **33** и бисгликозид **41**

*Условия реакции:* флексимерное основание **27** (2 мМ), Urd (20 мМ) или 2'-dUrd 20 мМ) в 1.0 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера (pH 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, pH 7.0 (10 мМ калий-фосфатный буфер),
- концентрация ферментов: 0.8 ед. акт./мл UP, 1.5 ед. акт./мл PNP.

В результате нами синтезировано девять новых флексимерных нуклеозидов. Экспериментальные данные по синтезу и физико-химические свойства нуклеозидов серии III приведены в Табл. 12-13 в разделе 3. Все синтезированные соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов были получены  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры (включая  $[\text{}^1\text{H}, \text{}^1\text{H}]$  и  $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C}]$  2D: COSY, HSQC и HMBC).  $^1\text{H}$  ЯМР спектры нуклеозидов серии III приведены в Приложении 25-33.

### 2.3.2 Зависимость образования минорных 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 mM), донор углеводного основания 2'dUrd и Urd (20 mM). В каждую реакционную смесь добавляли 1.5 ед. акт. PNP *E. coli*. Реакции проводили в 1.0 мл 10 mM калий-фосфатного буфера, pH 7.0, 120 ч при 50 °C.

Исходя из результатов эксперимента, была установлена зависимость образования пиразольного рибозида **30**, апинопиридинового рибозида **39** и бис-рибозида **40** от pH. Результаты рибозилирования гетероциклического флексимера **27** при различных значениях pH реакционной среды приведены на Рис. 31 - 33.

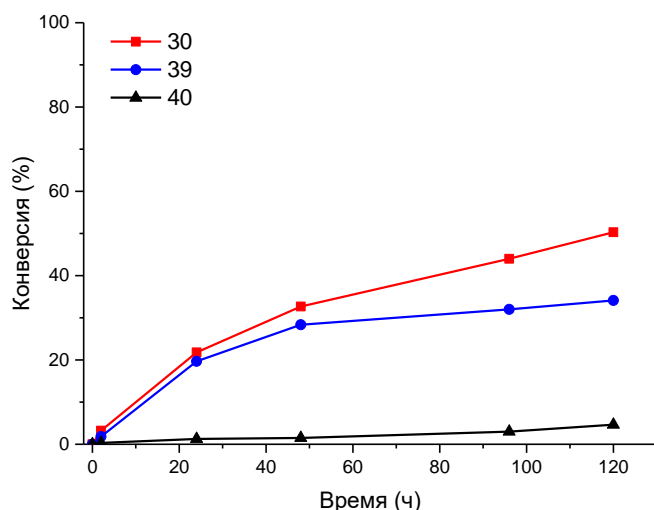


Рисунок 31 — Конверсия флексимерного основания **27** в пиразольный рибозид **30**, апинопиридиновый рибозид **39** и бис-рибозид **40** при pH 5.0

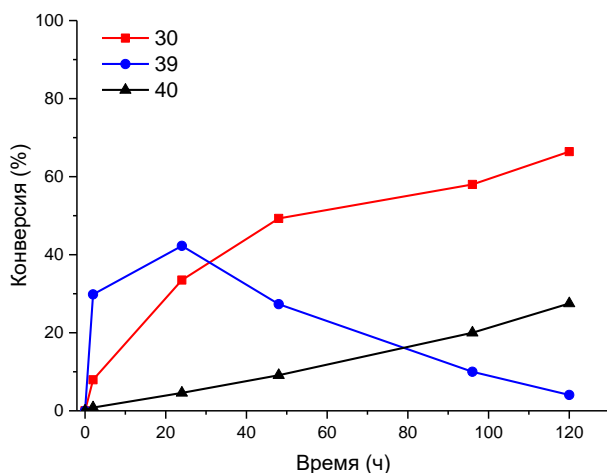


Рисунок 32 — Конверсия флексимерного основания **27** в пиразольный рибозид **30**, апинопиридиниевый рибозид **39** и бис-рибозид **40** при рН 7.0

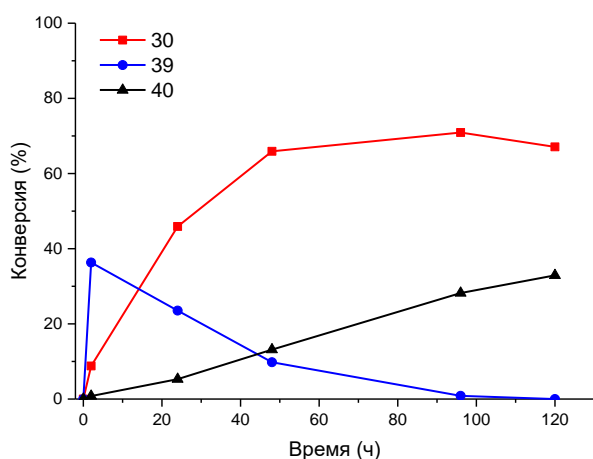


Рисунок 33 — Конверсия флексимерного основания **27** в пиразольный рибозид **30**, апинопиридиниевый рибозид **39** и бис-рибозид **40** при рН 9.0

Образование изомерного пиридингликозида в большей степени зависило от рН реакционной смеси: продукт нестабилен при рН 8 – 9, а при рН 5 – 7 его конверсия достигает 34 - 44%. При рН 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 рН 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.

### 2.3.3 Квантово-химический анализ *ab initio*

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

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.

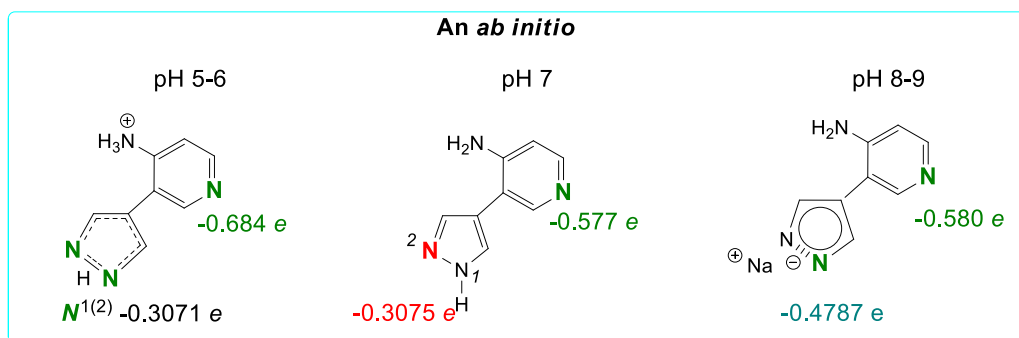


Рисунок 34 — Наиболее вероятные электронные структуры флексимерного основания **27** при различных значениях pH реакционной среды

Квантово-химический анализ соединения **27** в свободном состоянии в зависимости от формы аниона показал, что парциальный заряд *sp*<sup>2</sup>-атома азота пиридиновых фрагментов изменяется незначительно [ $\Delta N_{\text{аром}} = -0.5803 - (-0.5759) = -0.0044$  e], в то время как парциальный заряд атома азота *sp*<sup>2</sup> пиразольного фрагмента существенно изменяется [ $\Delta e = -0.4787 - (-0.3071) = -0.1716$ ] в сторону увеличения нуклеофильности (Рис. 34). 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.

### 2.3.4 Сравнение ЯМР-спектров нового соединения с известными соединениями: анализ структурных характеристик

Существование нуклеозида **39** возможно в двух таутомерных формах: амино- и имино (Рис. 35). Сначала предположили, что продукт существует в амино-форме, тогда ЯМР-спектр мог быть похож на спектр никотинамидрибозида [119]. 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 NH<sub>2</sub> группы: 7.42 и 8.55 м. д. Форма сигналов и химсдвиги не коррелировались с опубликованными данными ЯМР- спектров никотинамидрибозида.

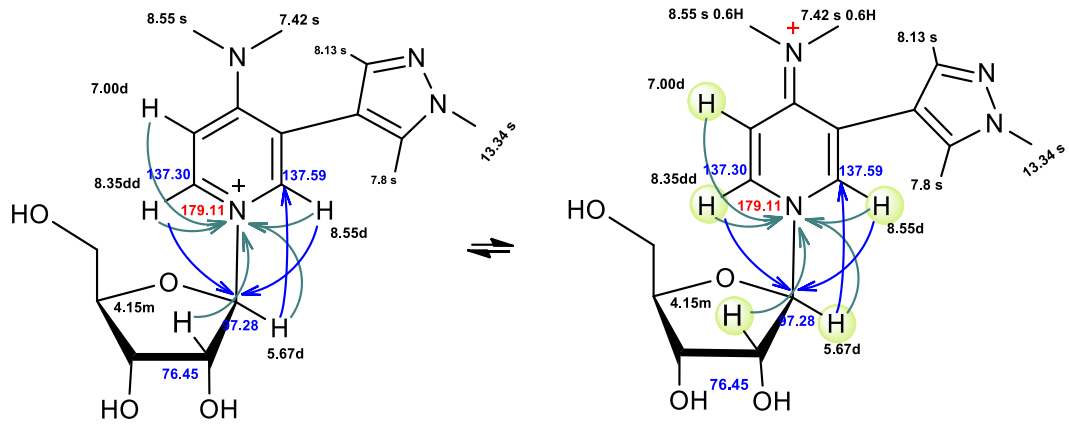


Рисунок 35 — Предположительные структуры флексимерного рибозида **39**

В связи с этим было принято решение провести сравнительный анализ ЯМР спектров нового синтезированного нуклеозида с известными спектрами клитидина [125] (Рис. 36). 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.

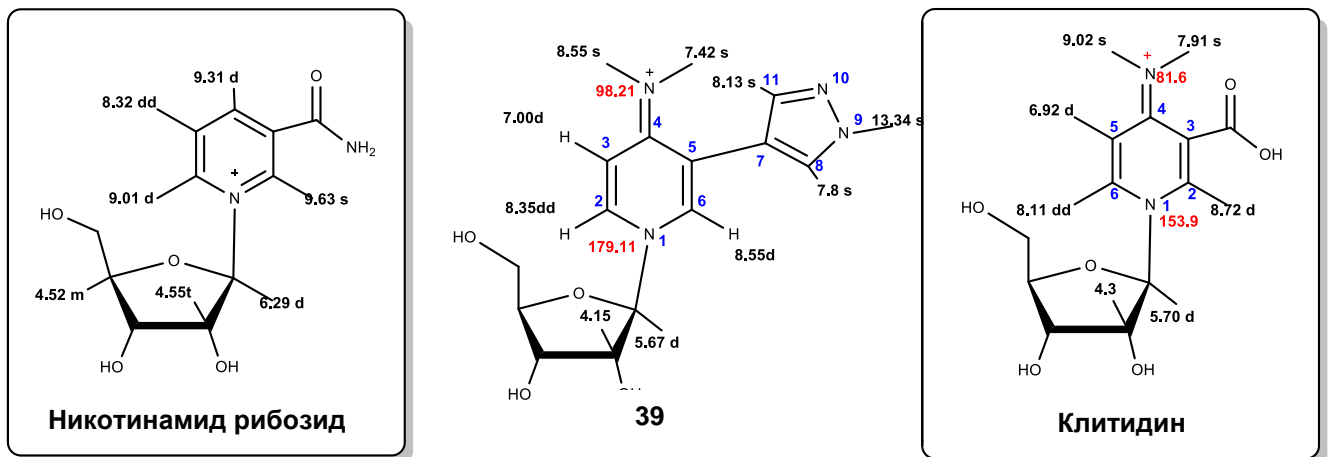


Рисунок 36 — Сравнение химсдвигов протонов в спектрах ЯМР никотинамид рибозид, флексимерного рибозид **39** и Клитидина

В литературе представлены данные ЯМР для клитидина со значениями химических сдвигов протонов иминогруппы 7.91 и 9.02 м. д. [125]. 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.

### 2.3.5 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.

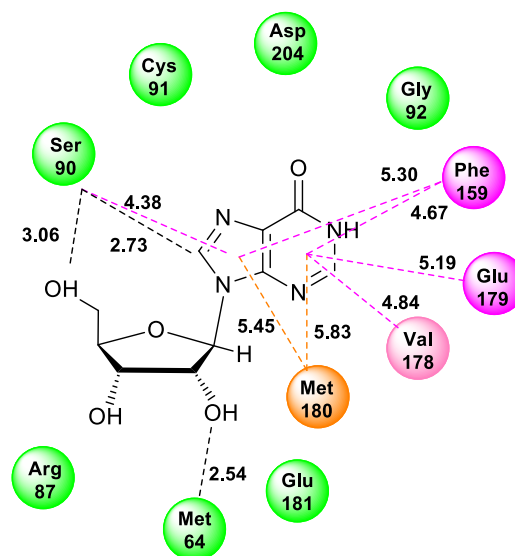
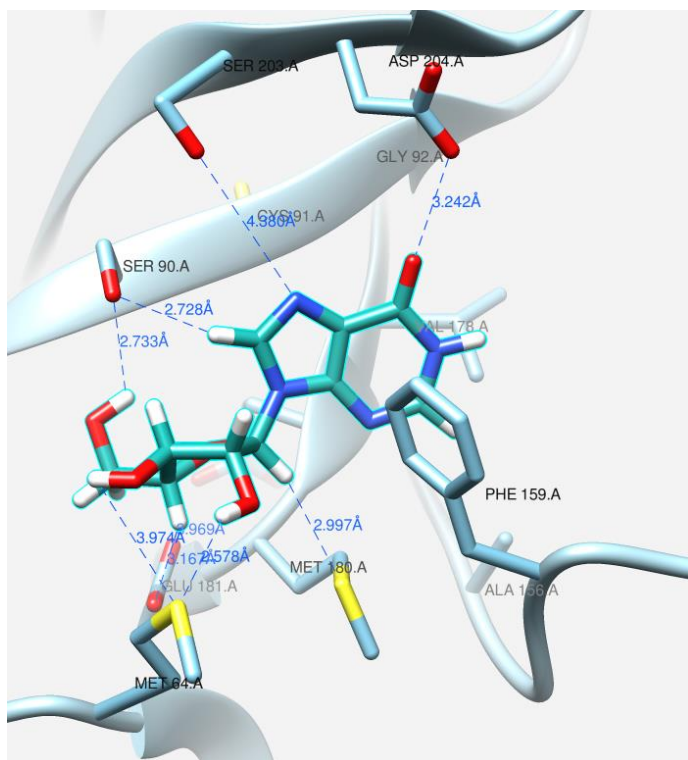
Перед стыковкой флексимеров были проанализированы кристаллографические структуры пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli*, депонированные на сайте ProteinDataBase. Это был шаг, необходимый для определения наиболее частых взаимодействий (водородные связи,  $\pi$ - $\pi$ -стакинг и т. д.) активного центра PNP 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  $60^\circ$  с плоскостью пуринового кольца, что обеспечивает  $\pi$ - $\pi$  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 (Рисунок 37).

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.

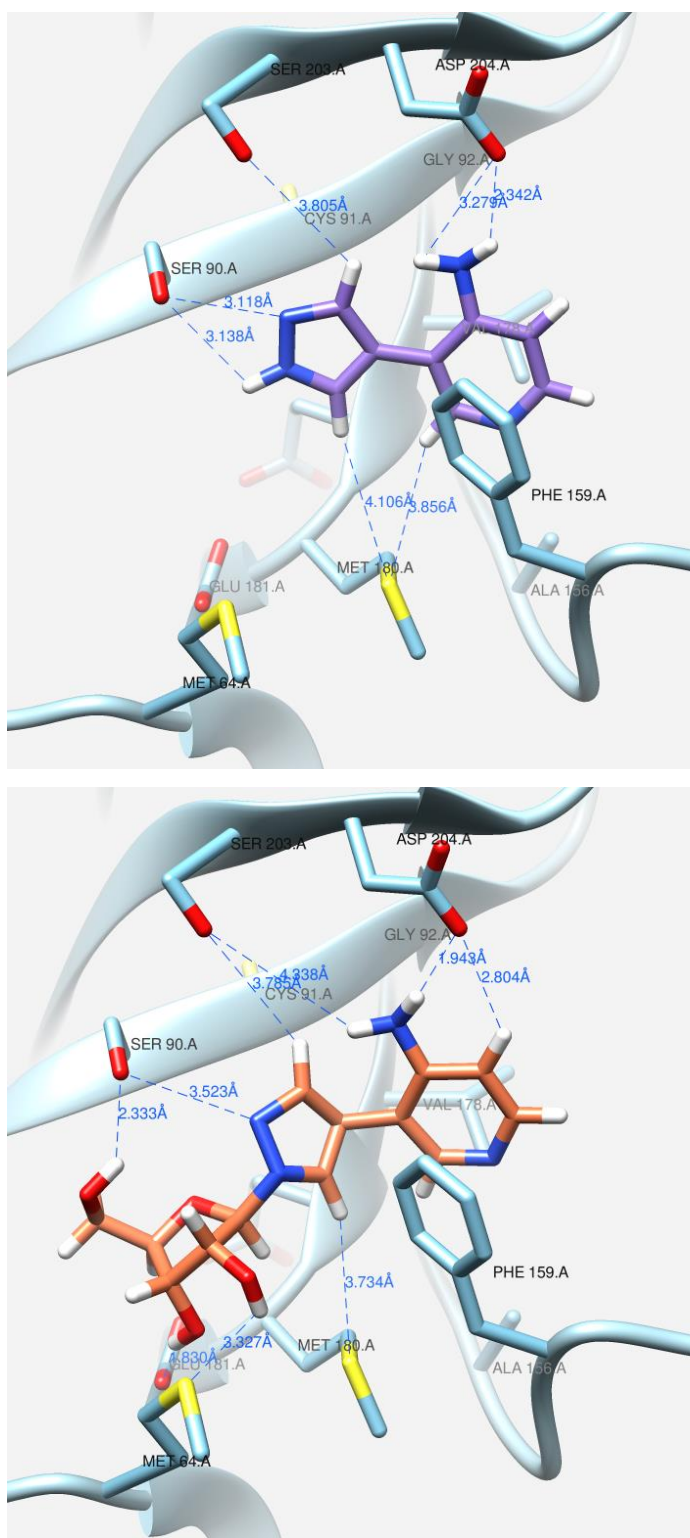


	Ван-дер-Ваальсово взаимодействие
	Водородная связь
	Углерод-водородная связь
	$\pi$ -электронное облако ароматического кольца взаимодействует с неподеленной парой электронного облака атома серы.
	$\pi$ - $\pi$ взаимодействие между двумя ароматическими группами T-образным образом
	$\pi$ - $\pi$ -взаимодействие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

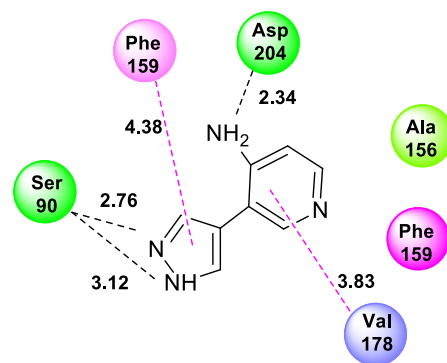
Рисунок 37 — Взаимодействия инозина в активном центре PNP

За связывание 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-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.

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



А



Б

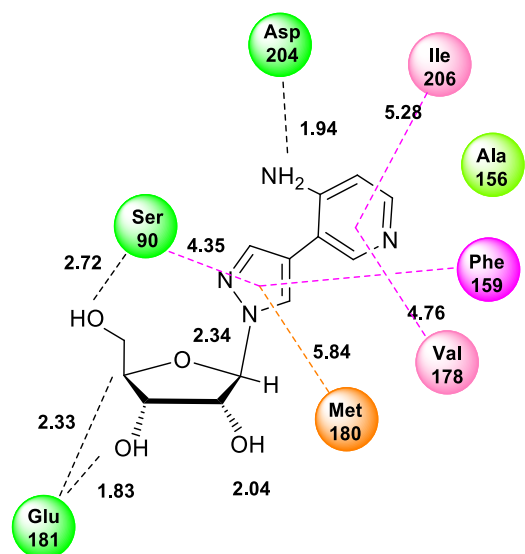
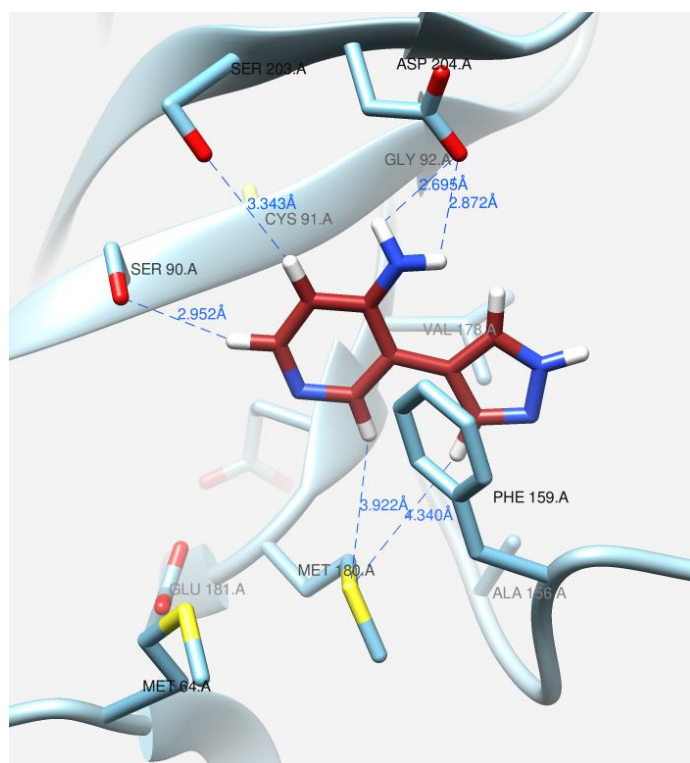


Рисунок 38 — Взаимодействия флексимерного основания **27** (А) и рибозида **30** (Б) в активном центре PNP

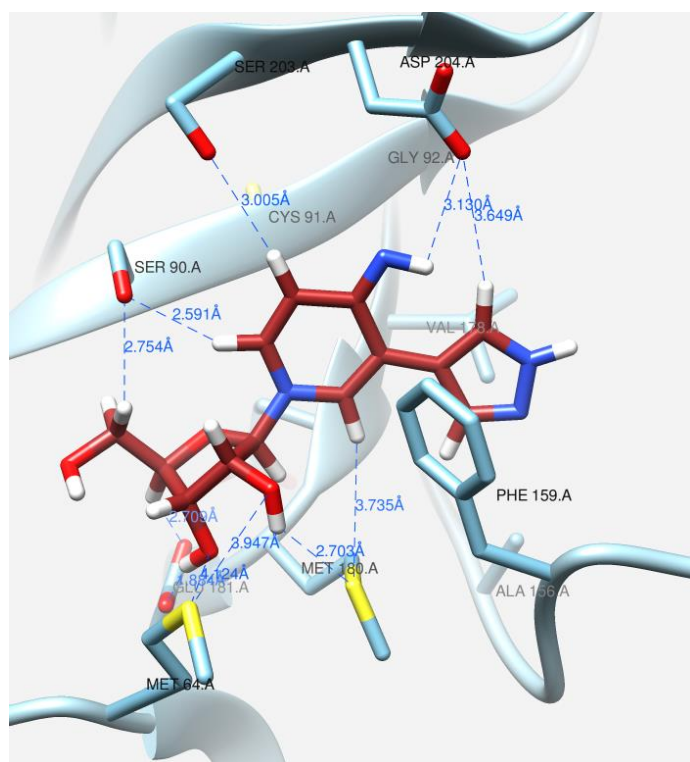
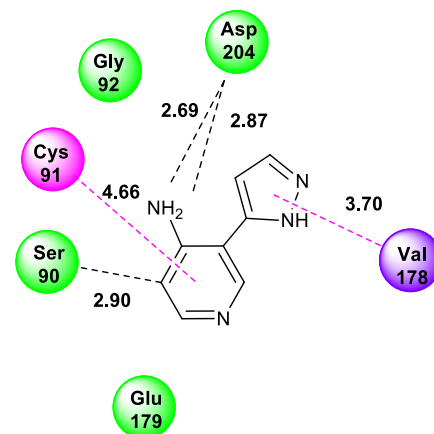
Кроме того, важным фактором является образование водородной связи с Asp204. Когда пиридиниевый цикл размещается близко к остатку Phe159 и образуется водородная связь с



аминогруппой Asp204, это позволяет азоту пиразольного кольца находиться в определенной позиции в активном центре, взаимодействовать с фосфатом рибозы и образовывать гликозидную связь (Рис. 38).



А



Б

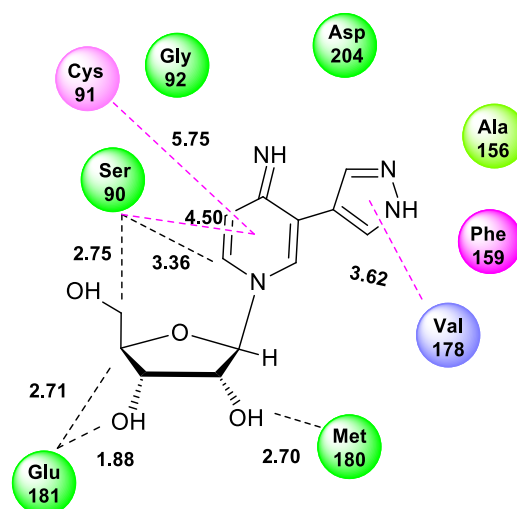


Рисунок 39 — Взаимодействия флексимерного основания **27** (А) и рибозида **39** (Б) в активном центре PNP

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. 39).

В случае пиридинового рибозида **39** следует обратить внимание на две возможные позиции в активном центре (Рис. 40). 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.

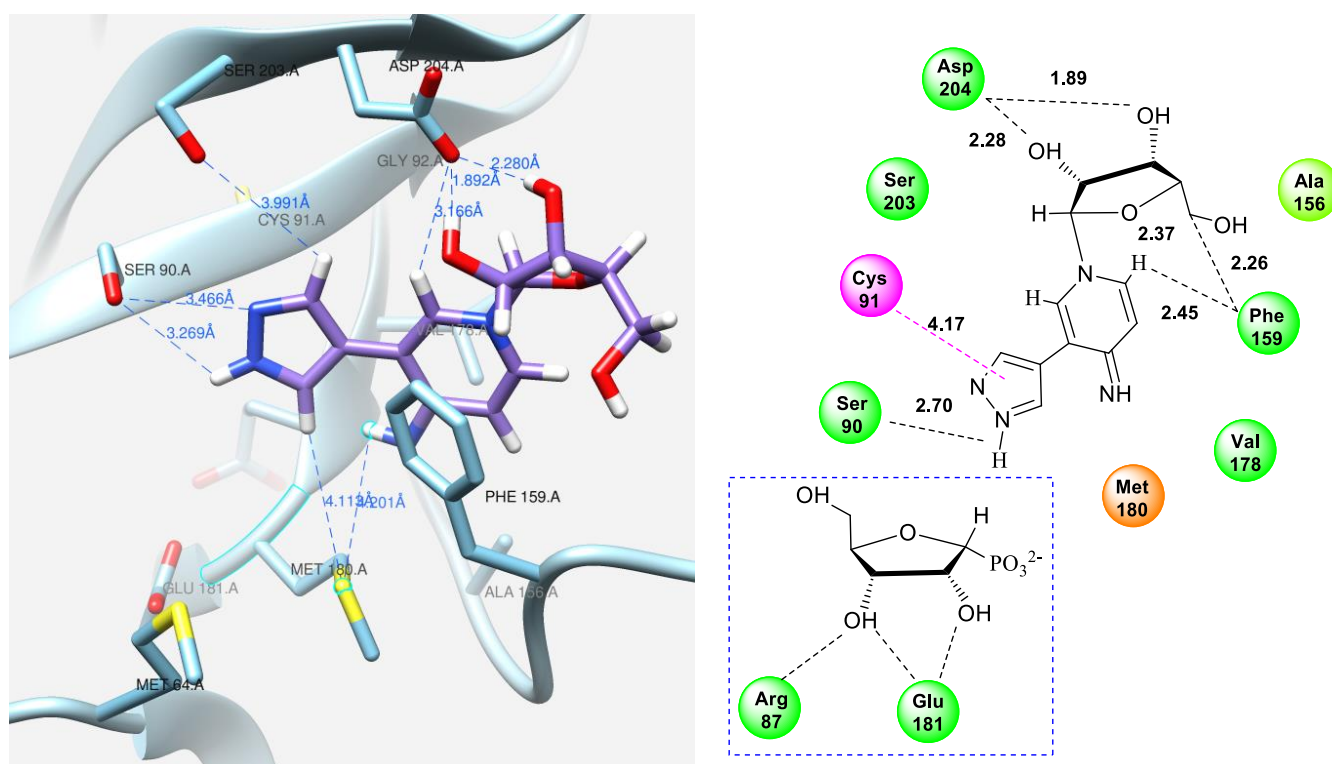


Рисунок 40 — Взаимодействия флексимерного рибозида **39** «альтернативная позиция» в активном центре PNP

Таблица 7 — Результаты стыковки инозина, флексимерного основания 27 и рибозидов 30 и 39

Модель	Кластер	Энергия (Ккал/моль)	$\Delta G$ (Ккал/моль)	Контактирующие АК-остатки с типом взаимодействия		
				Водородная связь	$\pi$ - $\pi$ взаимодействие	
Рис. 37	Инозин	7	13.56	-6.82	Ser90, Met64	Met180, Phe159, Val178, Glu179
Рис. 38А	Флексимерное основание 27	3	3.76	-6.55	Ser90, Asp204	Cys91, Val178
Рис. 38 Б	Пиразольный рибозид 30	3	63.71	-7.07	Ser90, Cys91, Glu181, Asp204	Phe159, Val179, Met 180, Ile206
Рис. 39А	Флексимерное основание 27	4	7.00	-6.07	Ser90, Asp204	Cys91, Val178
Рис. 39 Б	Пиримидиниевый рибозид 39	6	12.99	-7.80	Ser90, Met180, Glu181	Cys91, Val178
Рис. 40	Пиримидиниевый рибозид 39	0	25.75	-7.60	Ser90, Phe159, Asp204	Cys91

Эксперименты по стыковке показали, что флексимерные основания и рибозиды локализуются в выбранном кармане связывания, свободная энергия связи ( $\Delta G$ ) и контактирующие аминокислотные остатки с типом взаимодействия указаны в Табл. 7.

### 2.3.6 Антивирусная активность

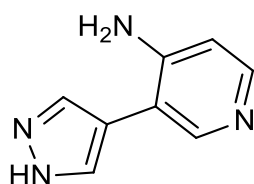
Для исследования противовирусной активности полученные флексимерные аналоги 8-аза-7-дезаза-аденозина были переданы в Институт медицинских исследований Rega (Левен, Бельгия).

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<sup>+</sup> и TK), цитомегаловирусе человека (HCMV, штаммы AD-169 и Davis), папилломавирусе человека (штамм HEb<sub>11260.1</sub>) 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).

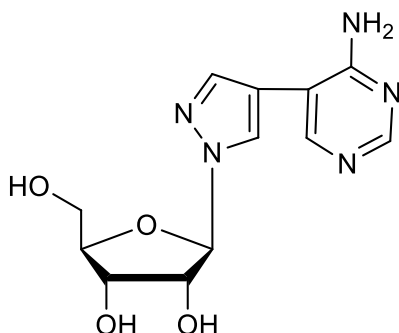
Цитотоксичность соединений была оценена на нескольких клеточных линиях (почки собаки Майдин-Дэрби (MDCK), легкого эмбриона человека (HEL299), эпителия почки

африканской зеленой марышки (Vero), печени человека (гепатокарцинома, Huh7). Исследуемые соединения были нетоксичны в концентрации  $\geq 100$  мкМ.

Соединения, показавшие умеренную противовирусную активность:



4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-пиразол **27**  
подавлял вирус желтой лихорадки с  $EC_{90}$   
11.3 мкМ и норовирус с  $EC_{50}$  4.2 мкМ.

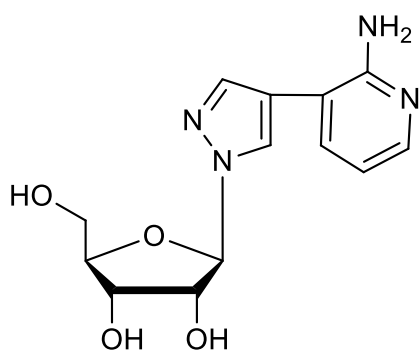


1-β-D-Рибофуранозил-4-(4-  
аминопиридин-5-ил)пиразол **32**  
в концентрации 80 мкМ способен  
ослаблять цитопатический эффект на  
клетки, вызванный SARS-CoV-2

### 2.3.7 Антибактериальная активность

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* MC<sup>2</sup> 155), 2 грамотрицательных бактериях (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) и двух грибах (*Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259).



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

### 2.3.8 Выводы по разделу 2.4

Синтезирована серия новых флексимерных модифицированных нуклеозидов аналогов 8-аза-7-дезаза-аденозина (4'-5, С-С связь между гетероциклическими основаниями). Получена серия из шести новых модифицированных нуклеозидов с углеводными остатками двух типов (рибоза, 2-дезоксирибоза).

Впервые наработаны и охарактеризованные минорные соединения, являющиеся региоизомерами реакции трансгликозилирования и продуктами бис-гликозилирования гетероциклического основания 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1*H*-пиразола.

Для более полного понимания механизма функционирования активного центра РNP *E. coli* проведен анализ активного центра, и с помощью методов компьютерного моделирования *in silico* предсказаны возможные структуры комплексов региоизомеров и продуктов бисгликозилирования в активном центре фермента.

Изучена противовирусная активность флексимерных нуклеозидов на широкой линейке ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Показано, что 1-β-*D*-рибофуранозил-4-(4-аминопиримидин-5-ил)пиразол 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)-1*H*-пиразол проявил избирательное воздействие на *Mycobacterium smegmatis*.

Результаты исследования опубликованы в статье: Khandazhinskaya A, Eletskaia B. et al. Novel fleximer -пиразол-containing adenosine analogues: chemical, enzymatic and highly efficient biotechnological synthesis. *Org Biomol Chem*. 2021 Sep 14; 19(34): p. 7379-7389. doi: 10.1039/d1ob01069g. Epub 2021 Jul 2. PMID: 34198312.

### 3 Экспериментальная часть

#### 3.1 Материалы и оборудование.

##### **В работе использовались следующие реагенты:**

Гетероциклические основания синтезированы в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург); модифицированные рибозиды синтезированы в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; флексимерные гетероциклические основания синтезированы в Институте молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН. Препараты бактериальных нуклеозидфосфорилаз и аденозиндезаминазы получены в лаборатории биофармацевтических технологий ИБХ РАН под рук. д.х.н. Есипова Р.С. Использовались природные нуклеозиды фирмы Sigma Aldrich, 1- $\alpha$ -фосфат-арабинозы получали по методике, описанной ранее [82].

**Растворители:** этанол, метанол, хлороформ, ацетонитрил, трифторуксусная кислота, водный аммиак. Все органические растворители использовались без дополнительной очистки.

**Ферментные препараты:** пуриннуклеозидфосфорилаза *E. coli* 1400 ед. акт./мл, уридиновая фосфорилаза *E. coli* 1700 ед. акт. мл, аденозиндезаминаза *E. coli* 37.5 ед. акт./мл, аденозиндезаминаза из кишечника теленка (Roche) 20 ед. акт./мл.

**Колоночная хроматография:** Силикагель «Kieselgel 60» (Merck), обращенно-фазовый сорбент C18 «Kieselgel 100» (Fluka).

**ВЭЖХ система:** хроматограф Waters 1525, спектрофотометрический детектор Waters мкм 2489, программное обеспечение Breeze 2 (США).

##### **Элюенты:**

Элюент А: 0.1% трифторуксусная кислота (ТФУ)/вода,

Элюент В: 70% ацетонитрил в 0.1% ТФУ/вода.

##### **Аналитические колонки:**

- A. Waters, Nova-Pak C18, 4 мкм, 4.6×150 м, скорость потока – 1 мл/мин;
- B. Supelco, Ascentis Express C18, 2.7 мкм, 7.5 × 3.0 мм, скорость потока – 0.5 мл/мин.

##### **Методы элюирования:**

1. от 0 до 70 % В 20 мин, детекция при 254 нм и 280 нм;
2. от 0 до 100% В 20 мин, детекция при 254 нм и 280 нм;
3. от 0 до 50 % В 20 мин, детекция при 254 нм и 280 нм;
4. от 0 до 10% В начиная с 5 до 15 мин, детектирование 225 нм и 280 нм.

(Кодировка использованного метода ВЭЖХ далее по тексту: «буквенная часть» – аналитическая колонка, «цифра» – метод элюирования, пример: A1, B2).

**Спектры ЯМР** регистрировали на спектрометре Bruker Avance DRX-700 в ДМСО-d<sub>6</sub> при 303 К. Рабочая частота для <sup>1</sup>H-ЯМР - 700 МГц, для <sup>13</sup>C - 176 МГц, для <sup>15</sup>N - 71 МГц. Химические сдвиги измерены в м.д. (δ) относительно остаточных сигналов протонов ДМСО (2.50 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Константы спин-спинового взаимодействия (*J*) измерены в Гц.

**Масс-спектры** зарегистрированы на спектрометрах Agilent 6224, ESI-TOF, LC/MS (ESI+) (США) и Bruker Daltonics micrOTOF-Q II (ESI+) (США).

**УФ-спектры** измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония), кварцевая кювета с длиной оптического пути 1.0 см, и на приборе Agilent 1260 LC в смеси вода–ацетонитрил.

**Угол поворота плоскости поляризации** измерен на поляриметре JASCO DIP-360 (Япония), кювета 3.5 мм×5.0 см.

## 3.2 Методы

### 3.2.1 Изучение субстратно - специфических свойств ферментов нуклеозидфосфорилаз

Готовили 2 мМ раствор основания-акцептора и 6 мМ раствор нуклеозида-донора углеводного основания (dIno, Urd или AraU) в 1 мл 5 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0). (при необходимости реакцию смесь нагревали или добавляли до 15 % ДМСО до полного растворения компонентов). В каждую реакцию смесь добавляли 5 ед. акт. PNP *E. coli*, в случае использования нуклеозидов-доноров 2'-dUrd, Urd или AraU добавляли еще 5 ед. акт. UP *E. coli*.

При использовании в качестве углеводного остатка химически синтезированного фосфата арабинозы готовили 2 мМ раствор модифицированного пуринового гетероциклического основания (или модифицированного рибозида) и 15 мМ раствор α-1-фосфата арабинозы в 1 мл 3 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0).

Реакции термостатировали при 50 °С. Отбор проб производили в течение 7 дней после начала реакции. Останавливали реакцию замораживанием проб при -20 °С. За ходом эксперимента следили с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

### 3.2.2 Общая методика синтеза нуклеозидов 2-аминопурина с 2,3-дигидро-7,8-дифтор-бензоксазиновыми заместителями (Серия I).

Навески основания-акцептора, нуклеозида-донора (Urd, dUrd, dIno) и КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> растворяли в воде. Реакционную смесь нагревали при 40–50 °С до полного растворения компонентов. Доводили рН до 7.0 прикапыванием 5N раствора гидроксида калия. Добавляли PNP и UP и инкубировали при 50 °С. Реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. Когда конверсия достигала максимального значения, реакцию останавливали добавлением 95% этилового спирта.

Целевые соединения, содержащие гексаноильный спейсер, экстрагировали из реакционной смеси хлороформом (3×30 мл). Объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия, концентрировали и остаток наносили на колонку с силикагелем (10×150 мм). Элюировали градиентом концентрации этанола в хлороформе (0 - 7%, 120 мл, скорость потока 1.0 мл/мин). Фракции, содержащие искомый продукт, объединяли, растворитель удаляли в вакууме и остаток сушили в вакууме над пятиокисью фосфора.

В случае соединений без спейсера, реакционная смесь без концентрирования наносилась на колонку (15×150 мм), заполненную обращенно-фазовым сорбентом (C18). Элюировали градиентом концентрации ацетонитрила в воде (7 - 70 %, 270 мл, скорость потока 1.5 мл/мин). Фракции, содержащие продукт, объединяли, растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили в вакууме над пятиокисью фосфора.

Выход и физико-химические характеристики синтезированных арабинозидов приведены в Табл. 8. Все синтезированные соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии (Табл. 9) и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов были получены спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР (включая [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ] и [ $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ] 2D: COSY, HSQC и HMBC).

### 3.2.3 Общая методика синтеза дизамещенных аналогов аденозина (Серия II).

Навеску  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяли в воде и доводили pH раствора до 7.0, прикапывая 5N раствор гидроксида калия. В полученном буфере при небольшом нагревании растворяли модифицированный рибозид и AgaU. В реакционную смесь добавляли PNP и UP. Раствор термостатировали при 55 °C. За ходом эксперимента следили с помощью ВЭЖХ. Процесс проводили до постоянного содержания продукта. Добавляли в реакционную смесь 300 мкл 20 mM (pH 7.0) арсената натрия. Останавливали реакцию после завершения гидролиза исходного модифицированного рибозид (< 1%) добавлением 95% этилового спирта.

По окончании процесса реакционную смесь концентрировали до объема 5 мл и наносили на хроматографическую колонку (20×220 мм), заполненную обращенно-фазовым сорбентом (C18). Целевое соединение элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила в воде (0 - 100 %, 600 мл, скорость потока 2.0 мл/мин) Фракции, содержащие продукт, объединяли, растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили в вакууме над пятиокисью фосфора.

Выход и физико-химические характеристики синтезированных арабинозидов приведены в Табл. 10. Все синтезированные соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии (Табл. 11) и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов были получены спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР (включая [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ] и [ $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ] 2D: COSY, HSQC и HMBC).



### 3.2.4 Общая методика синтеза флексимерных аналогов 8-аза-7-дезаза-аденозина (Серия III)

Навески флексимерного основания-акцептора, нуклеозида-донора (Urd, 2'-dUrd) и  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  растворяли в воде. Реакционную смесь нагревали при 40–50 °С до полного растворения компонентов. Доводили pH до 7.0 прикапыванием 5N раствора гидроксида калия. Добавляли ферментные препараты PNP и UP и инкубировали при 50 °С. Реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. Когда конверсия достигала максимального значения, реакцию останавливали добавлением 95% этилового спирта.

По окончании процесса реакцию смесь концентрировали до объема 5 мл и наносили на хроматографическую колонку (10×150 мм), заполненную обращенно-фазовым сорбентом (C18). Целевое соединение элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила в воде (0 - 50 %, 250 мл, скорость потока 1.0 мл/мин) Фракции, содержащие продукт, объединяли, растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили в вакууме над пятиокисью фосфора.

Выход и физико-химические характеристики синтезированных арабинозидов приведены в Табл. 12. Все синтезированные соединения охарактеризованы данными ВЭЖХ, УФ-, LC/MS-спектрометрии (Табл. 13) и ЯМР-спектроскопии. Для всех синтезированных нуклеозидов были получены спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР (включая [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ] и [ $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ] 2D: COSY, HSQC и HMBC).

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

Реакционные смеси содержали 1 мМ раствор модифицированного нуклеозида, 20 мМ калий-фосфатный буфера (pH 7.0), 1 ед. рекомбинантной ADA *E. coli* или 1 ед. ADA CI, инкубация при 25 °С. В качестве контроля использовались Ado, 2'-dAdo и AraA, контрольные реакции проводились в идентичных условиях. Реакционные смеси инкубировали при 25°С в течение 24 ч, за ходом эксперимента следили с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

### 3.2.6 Ингибирование рекомбинантной ADA *E. coli*.

В качестве контрольного соединения для тестирования ингибирования ADA использовали аденозин. Контрольная реакция объемом 1 мл содержала 0.04 мМ раствор аденозина в 20 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.0), фермент 0.008 ед. акт./мл ADA *E. coli*. Реакционные смеси (3 повтора) инкубировали при 25°С в течение 20 мин, за ходом эксперимента следили с помощью ВЭЖХ. Через 10 минут конверсия аденозина в инозин составляла 50%.

Затем аденозин подвергали дезаминированию в присутствии синтезированных нуклеозидов в аналогичных условиях: реакции объемом 1 мл содержали 0.04 мМ раствор аденозина, 0.1 мМ раствор ингибитора в 5 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.0), ADA *E. coli*. 0.008 ед. акт. / мл.

Таблица 8 — Экспериментальные данные по синтезу нуклеозидов серии I

Соединение, г/моль	Акцептор, г/моль	Донор, г/моль	Объем, мл [5 мМ КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> ]	Субстрат		PNP, ед. акт.	UP, ед. акт.	Время, ч	Конверсия ГЦО в нуклеозид (ВЭЖХ данные), %	Элюент, %
				Акцептор, мг (ммоль)	Донор, мг (ммоль)					
(S)-3 451.2	(S)-1 318.1	dIno 252.2	40	25 (78.6)	60 (238)	55	-	3	85.61	50
(R)-3 451.2	(R)-1 318.1	dIno 252.2	40	25 (78.6)	60 (238)	55	-	3	93.70	50
(S)-4 564.2	(S)-2 432.2	dUrd 228.2	35	30 (70)	48 (210)	39	122	3	94.17	50
(R)-4 564.2	(R)-2 432.2	dUrd 228.2	19	16 (37)	26 (114)	10	33	3	94.15	50
(S)-5 435.2	(S)-1 318.1	Urd 244.2	47	30 (94)	60 (246)	39	90	2	61.32	7-70
(R)-5 435.2	(R)-1 318.1	Urd 244.2	40	25 (78.6)	68 (278)	39	90	2	56.12	7-70
(S)-6 548.2	(S)-2 432.2	Urd 244.2	35	25 (58)	50 (205)	39	90	2	95.10	7-70
(R)-6 548.2	(R)-2 432.2	Urd 244.2	35	25 (58)	50 (205)	82	126	2	90.33	7-70
(R)-7 435.2	(R)-1 318.1	AraU 244.2	40	25 (78.6)	29 (120)	180	290	360	43.10	50
(S)-8 548.2	(S)-2 432.2	AraU 244.2	28	25 (58)	20 (87)	115	145	168	46.15	7-70
(R)-8 548.2	(R)-2 432.2	AraU 244.2	28	25 (58)	21 (87)	115	145	168	65.03	7-70

Таблица 9 — Физико-химические свойства нуклеозидов серии I

Соединение	Выход %, (мг)	Чистота, % [t <sub>R</sub> , мин] метод ВЭЖХ	UV λ <sub>max</sub> , нм	HRMS расч.: m/z. [M+H] <sup>+</sup>	HRMS: m/z [M+H] <sup>+</sup>
(S)-3	15 (5)	84.09 [10.30] A2	200, 212, 290, 322	435.1592	435.1523, 319.1116 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(R)-3	15 (5)	96.31 [10.13] A2	209, 290, 322	435.1592	435.1521, 319.1109 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(S)-4	60 (25)	98.16 [10.81] A2	202, 212, 248, 320	548.2432	548.2412, 432.1942 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(R)-4	97 (34)	97.52 [10.80] A2	202, 212, 248, 320	548.2432	548.2107, 432.1943 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(S)-5	71 (34)	97.80 [10.05] A2	212, 250, 284, 300	451.1541	451.1523, 319.1100 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(R)-5	50 (10)	97.96 [9.86] A2	212, 250, 284, 302	451.1541	451.1519, 319.1095 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(S)-6	32 (20)	99.38 [10.64] A2	214, 250, 284, 300	564.2382	564.2356, 432.1937 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(R)-6	43 (25)	98.15 [10.52] A2	214, 250, 284, 302	564.2382	564.2358, 432.1938 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(R)-7	43 (15)	99.5 [14.18] A1	212, 250, 284, 302	451.1546	451.1474 319.1095 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(S)-8	46 (15)	96.9 [16.16] A1	214, 250, 284, 300	564.2382	564.2300 319.1100 [ГЦО+H] <sup>+</sup>
(R)-8	65 (17)	96.6 [16.16] A1	214, 250, 284, 302	564.2382	564.2297 319.1095 [ГЦО+H] <sup>+</sup>

Таблица 10 — Экспериментальные данные синтеза арабинозидов (Серия II)

Соединение	Акцептор, г/моль	Донор, г/моль	Субстрат		Объем реакции, мл	PNP, ед. акт.	UP, ед. акт.	Объем, мл [20 мМ Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> ]	Время, ч	Конверсия ГЦО в нуклеозид (ВЭЖХ), %	Элюент %
			Акцептор, мг (ммоль)	Донор, мг (ммоль)							
<b>9b</b>	<b>9a</b> 359.09	Ara-U 244.2	75 (0.21)	260 (1.06)	104	162	94	0.208	196	82.88	50
<b>10b</b>	<b>10a</b> 373.10		80 (0.21)	260 (1.06)	106	165	95	0.212	196	81.44	50
<b>11b</b>	<b>11a</b> 401.13		80 (0.20)	244 (1.00)	100	156	90	0.200	336	69.15	70
<b>12b</b>	<b>12a</b> 389.10		80 (0.21)	251 (1.03)	103	161	93	0.206	216	90.60	50
<b>13b</b>	<b>13a</b> 389.10		100 (0.26)	313 (1.28)	128	200	115	0.256	504	78.10	50
<b>14b</b>	<b>14a</b> 403.11		100 (0.25)	300 (1.23)	75	115	70	0.150	196	80.57	70
<b>15b</b>	<b>15a</b> 433.11		34 (0.08)	90 (0.37)	20	133	90	0.040	168	91.51	70
<b>16b</b>	<b>16a</b> 419.09		40 (0.10)	120 (0.49)	40	61	41	0.080	196	80.39	70
<b>17b</b>	<b>17a</b> 465.13		100 (0.21)	260 (1.06)	60	90	54	0.120	196	94.83	70
<b>18b</b>	<b>18a</b> 430.16		15 (0.03)	41 (0.17)	50	76	45	0.100	168	96.85	70
<b>19b</b>	<b>19a</b> 430.16		100 (0.23)	286 (1.17)	117	91	166	0.234	196	71.76	70
<b>20b</b>	<b>20a</b> 373.10		80 (0.21)	261 (1.07)	107	167	96	0.214	168	70.02	50

Таблица 11 — Физико-химические свойства арабинозидов **1b-12b**

Соединение	Выход %, (мг)	Чистота, % метод ВЭЖХ	t <sub>R</sub> , мин метод ВЭЖХ	[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup>	UV λ <sub>max</sub> , нм (ε)	HRMS расч.: m/z. [M+H] <sup>+</sup>	HRMS: m/z [M+H] <sup>+</sup>
<b>9b</b>	63 (43)	98.69	9.50 A2	16.8 (c 0.25, H <sub>2</sub> O/DMSO 1:1)	268 (14 900), 212 (18 800)	359.0865	227.0458 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 359.0894
<b>10b</b>	50 (40)	99.72	7.47 A2	40.4 (c 0.5, H <sub>2</sub> O)	270 (15 200) 213 (18 600)	373.1021	241.0592 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 373.1015
<b>11b</b>	46 (37)	96.63	9.24 A2	20.8 (c 0.5, H <sub>2</sub> O)	270 (16 800) 213 (18 700)	401.1334	269.0889 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 401.1335
<b>12b</b>	81 (58)	99.27	6.15 A2	43.6 (c 0.5, H <sub>2</sub> O)	270 (17 900) 212 (23 600)	389.0971	257.0541 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 389.1007
<b>13b</b>	77 (77)	95.48	5.76 A2	-20.4 (c 0.5, H <sub>2</sub> O)	268 (16 600) 212 (20 400)	389.0971	257.0541 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 389.1007
<b>14b</b>	60 (60)	95.75	5.68 B2	76.0 (c 1.0, H <sub>2</sub> O/DMSO)	269 (21 000) 213 (24 800)	403.1127	271.0695 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 403.1107
<b>15b</b>	88 (30)	98.20	7.35 B2	54.0 (c 1.0, H <sub>2</sub> O/DMSO)	268 (19 400) 212 (23 200)	433.1055	301.0636 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 433.1061
<b>16b</b>	75 (21)	91.20	7.01 B2	80.0 (c 1.0, H <sub>2</sub> O/DMSO)	270 (16 700) 212 (18 700)	419.0898	287.0457 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 419.08703
<b>17b</b>	68 (68)	94.38	6.91 B2	46.0 (c 1.0, H <sub>2</sub> O/DMSO)	271 (19 200) 213 (25 400)	465.1284	333.0851 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 465.1269
<b>18b</b>	92 (10)	98.42	6.63 B2	-	270 (15 300) 213 (17 800)	430.1600	298.1161 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 430.1581
<b>19b</b>	52 (52)	95.60	5.35 B2	4.8 (c 1.0, H <sub>2</sub> O/DMSO)	270 (15 400) 213 (17 800)	430.1600	298.1161 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 430.1581
<b>20b</b>	63 (50)	99.13	7.24 B2	-4.8 (c 0.25, H <sub>2</sub> O/DMSO 1:1)	270 (16 500) 213 (19 400)	373.1021	241.0603 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 373.1043

Таблица 12 — Экспериментальные данные по синтезу нуклеозидов серии III

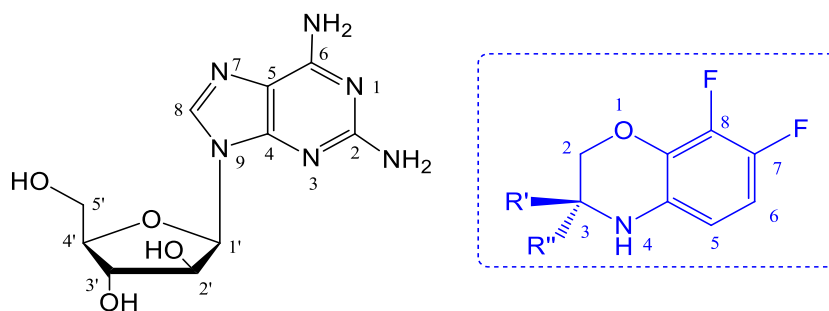
Соединение, г/моль	Акцептор, г/моль	Донор, г/моль	Субстрат		Объем реакции, мл	PNP, ед. акт.	UP, ед. акт.	Конверсия ГЦО в нуклеозид за 24 ч (ВЭЖХ), %	Время, ч	Финальная конверсия ГЦО в нуклеозид (ВЭЖХ), %	Элюент, %
			Акцептор, мг (ммоль)	Донор, мг (ммоль)							
<b>30</b>	<b>27</b> 160.18	Urd 244.2	0.05 (0.312)	0.152 (0.62)	156	167	73	46	48	74	50
<b>31</b>	<b>28</b> 160.18		0.020 (0.125)	0.061 (0.25)	62	18.6	49.6	69	168	96	50
<b>32</b>	<b>29</b> 161.16		0.020 (0.125)	0.061 (0.25)	62	18.6	49.6	44	408	99	50
<b>33</b>	<b>27</b> 160.18	dUrd 228.2	0.05 (0.312)	0.142 (0.62)	156	167	73	81	21	99	50
<b>34</b>	<b>28</b> 160.18		0.020 (0.125)	0.057 (0.25)	62	18.6	49.6	95	168	98	50
<b>35</b>	<b>29</b> 161.16		0.020 (0.125)	0.057 (0.25)	62	18.6	49.6	89	120	100	50
<b>39</b>	<b>27</b> 160.18	Urd 244.2	0.05 (0.312)	0.762 (3.12)	156	234	125	-	120	49	50
<b>40</b>								-	1368	46	50
<b>41</b>		dUrd 228.2	0.05 (0.311)	0.712 (3.11)	156	234	124	-	21	53	50

Таблица 13 — Физико-химические свойства флексимерных нуклеозидов

Соединение	Выход %, (мг)	Чистота, % метод ВЭЖХ	t <sub>R</sub> , мин	UV λ <sub>max</sub> , нм (ε)	HRMS расч.: m/z [M+H] <sup>+</sup>	HRMS: m/z [M+H] <sup>+</sup>
<b>30</b>	30 (29)	99.7 В3	5.4	273 (5500)	293.1244	161.0824 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 293.1233
<b>31</b>	44 (16)	91.2 В3	5.3	305 (5800)	293.1244	161.0858 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 293.1233
<b>32</b>	55 (20)	95.8 В3	2.8	285 (5200)	294.1197	162.0767 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 294.1182
<b>33</b>	51 (22)	98.3 В3	6.6	272 (7000)	277.1295	161.0853 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 277.1274
<b>34</b>	52 (18)	95.2 В3	7.5	309 (5000)	277.1295	161.0851 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 277.1298
<b>35</b>	64 (22)	95.1 В3	5.25	285 (5300)	278.1248	162.0769 [ГЦО+H] <sup>+</sup> 278.1237
<b>39</b>	17 (3)	96.65 В4	6.4	273	293.124	293.1233
<b>40</b>	11 (3)	98.28 В4	6.7	273	425.1662	425.1648
<b>41</b>	21 (5)	90.03 В4	7.9	273	393.1769	393.1742

### 3.3 Данные спектров ЯМР

#### 3.3.1 Аналоги 2-аминопурина (Серия I)



**(3S)-4-[2-амино-9-(β-D-2'-дезоксирибофуранозил)-пурин-6-ил]-7,8-дифтор-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин [(S)-3]**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta$  = 8.14 (с, 1 H, пурин Н-8), 7.56 (ддд,  $J$  = 9.1, 5.8, 1.2, 1 H, бензоксазин Н-5), 6.86 (дт,  $J$  = 9.1, 1 H, бензоксазин Н-6), 6.24 (дд,  $J$  = 7.2, 6.5, 1 H, Н'-1), 6.14 (уш. с, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 5.62 (м, 1 H, бензоксазин Н-3), 5.27 (д,  $J$  = 1.8, 1 H, 3'-ОН), 5.01 (т,  $J$  = 5.0, 1 H, 5'-ОН), 4.43 (дд,  $J$  = 10.8,  $<0.5$ , 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.37 (м, 1H, Н'-3), 4.17 (дд,  $J$  = 10.8, 1.7, 1 H, бензоксазин Н-2б), 3.84 (м, 1 H, Н-4'), 3.58 (м, 1 H, Н-5'a), 3.52 (м, 1 H, Н-5'b), 2.58 (ддд,  $J$  = 13.2, 6.9, 5.9, 1 H, Н-2'b), 2.22 (ддд,  $J$  = 12.9, 5.8, 2.9, 1 H, Н-2'a), 1.32 (м, 3 H, Me).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta$  = 159.28 (пурин С2), 153.70 (пурин С4), 152.23 (пурин С6), 145.54 (дд,  $J_{\text{C-F}}$  = 240.2, 10.6, бензоксазин С8), 138.95 (дд,  $J_{\text{C-F}}$  = 242.5, 15.3, бензоксазин С7), 136.85 (пурин С8), 135.56 (д,  $J_{\text{C-F}}$  = 8.8, бензоксазин С8а), 122.51 (бензоксазин С5а), 119.29 (д,  $J_{\text{C-F}}$  = 8.0, бензоксазин С5), 114.80 (пурин С5), 106.43 (д,  $J_{\text{C-F}}$  = 17.7, бензоксазин С6), 87.60 (С4'), 82.66 (С1'), 70.77 (С3'), 69.57 (бензоксазин С2), 61.75 (С5'), 47.90 (бензоксазин С3), 39.20 (С2'), 15.48 (СН<sub>3</sub>).

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta$  = 243.3 (N7), 206.2 (N1), 188.8 (N3), 170.3 (N9), 101.6 (бензоксазин N), 80.2 (NH<sub>2</sub>).

**(3R)-4-[2-Амино-9-(β-D-2'-дезоксирибофуранозил)-пурин-6-ил]-7,8-дифтор-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин [(R)-3]**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta$  = 8.14 (с, 1 H, пурин Н-8), 7.58 (ддд,  $J$  = 9.2, 5.2, 2.2, 1 H, бензоксазин Н-5), 6.86 (дт,  $J$  = 9.3, 8.7, 1 H, бензоксазин Н-6), 6.24 (дд,  $J$  = 7.3, 6.2, 1 H, Н'-1), 6.14 (уш. с, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 5.62 (м, 1 H, бензоксазин Н-3), 5.26 (д,  $J$  = 3.8, 1 H, 3'-ОН), 5.00 (т,  $J$  = 5.5, 1 H, 5'-ОН), 4.43 (дд,  $J$  = 10.8, 1.0, 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.37 (м, 1H, Н'-3), 4.16 (дд,  $J$  = 10.8, 2.2, 1 H, бензоксазин Н-2б), 3.84 (м, 1 H, Н-4'), 3.58 (ддд,  $J$  = 11.6, 5.0, 4.8, 1 H, Н-5'a), 3.51 (ддд,  $J$  = 10.8, 5.0, 4.8, 1 H, Н-5'b), 2.59 (ддд,  $J$  = 13.3, 7.8, 5.8, 1 H, Н-2'b), 2.23 (ддд,  $J$  = 13.0, 5.9, 3.1, 1 H, Н-2'a), 1.33 (д,  $J$  = 6.7, 3 H, Me).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta$  = 159.26 (пурин С2), 153.75 (пурин С4), 152.23 (пурин С6), 145.65 (дд,  $J_{\text{C-F}}$  = 239.8, 8.2, бензоксазин С8), 138.89 (дд,  $J_{\text{C-F}}$  = 242.0, 15.0, бензоксазин С7), 136.84 (пурин С8),



135.60 (д,  $J_{C-F} = 8.9$ , бензоксазин С8а), 122.51 (бензоксазин С5а), 119.29 (д,  $J_{C-F} = 6.2$ , бензоксазин С5), 114.78 (пурин С5), 106.43 (д,  $J_{C-F} = 17.5$ , бензоксазин С6), 87.59 (С4'), 82.71 (С1'), 70.76 (С3'), 69.55 (бензоксазин С2), 61.73 (С5'), 47.94 (бензоксазин С3), 39.99 (С2'), 15.48 (СН<sub>3</sub>).

<sup>15</sup>N ЯМР:  $\delta = 243.3$  (N7), 206.3 (N1), 188.7 (N3), 170.5 (N9), 101.8 (бензоксазин N), 80.2 (NH<sub>2</sub>).

**(3S)-4-[6-(2-Амино-9-( $\beta$ -D-2'-дезоксирибофуранозил)-пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифтор-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин [(S)-4]**

<sup>1</sup>H ЯМР:  $\delta = 7.89$  (с, 1 H, пурин Н-8), 7.66 (м, 1H, бензоксазин Н-5), 7.23 (уш. с, 1 H, гексаноил NH-6), 6.91 (ддд,  $J = 9.6, 8.6, 1$  H, бензоксазин Н-6), 6.17 (дд,  $J = 8.1, 6.0, 1$  H, Н'-1), 5.74 (уш. с, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.24 (т,  $J = 5.3, 1$  H, 5'-ОН), 5.21 (д,  $J = 3.9, 1$  H, 3'-ОН), 4.70 (уш. сигн, 1 H, бензоксазин Н-3), 4.35 (м, 1H, Н'-3), 4.34 (м, 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.14 (дд,  $J = 10.3, <1, 1$  H, бензоксазин Н-2b), 3.83 (м, 1 H, Н-4'), 3.58 (дд,  $J = 11.8, 4.3, 1$  H, Н-5'а), 3.51 (дд,  $J = 11.8, 4.0, 1$  H, Н-5'б), 3.39 (м, 2 H, гексаноил 2×Н-6), 2.65 (м, 1 H, гексаноил Н-2а), 2.58 (ддд,  $J = 13.5, 8.2, 5.5, 1$  H, Н-2'б), 2.46 (м, 1 H, гексаноил Н-2b), 2.16 (ддд,  $J = 13.0, 5.8, 2.5, 1$  H, Н-2'а), 1.58-1.60 (м, 4 H, гексаноил 2×Н-3 и 2×Н-5), 1.34 (м, 2 H, гексаноил 2×Н-4), 1.10 (м, 3 H, Me).

<sup>13</sup>C ЯМР:  $\delta = 171.00$  (гексаноил СО), 159.94 и 154.86 (пурин С2 и С6), 150.33 (пурин С5), 146.43 (дд,  $J_{C-F} = 256.3, \sim 16.8$ , бензоксазин С8), 138.92 (дд,  $J_{C-F} = 243.8, 15.2$ , бензоксазин С7), 136.44 (д,  $J_{C-F} = 8.5$ , бензоксазин С8а), 135.67 (пурин С8), 121.79 (бензоксазин С5а), 119.25 (бензоксазин С5), 113.60 (пурин С4), 106.77 (д,  $J_{C-F} = 17.7$ , бензоксазин С6), 87.64 (С4'), 83.06 (С1'), 71.00 (С3'), 69.84 (бензоксазин С2), 61.96 (С5'), 40.27 (бензоксазин С3), 39.29 (С2'), 39.17 (гексаноил С6, сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 33.44 (гексаноил С2), 28.95 (гексаноил С5), 25.92 (гексаноил С4), 24.43 (гексаноил С3), 15.11 (СН<sub>3</sub>).

<sup>15</sup>N ЯМР:  $\delta = 241.1$  (N7), 169.3 (N9), 131.1 (бензоксазин N).

**(3R)-4-[6-(2-Амино-9-( $\beta$ -D-2'-дезоксирибофуранозил)-пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифтор-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин [(R)-4]**

<sup>1</sup>H ЯМР:  $\delta = 7.88$  (с, 1 H, пурин Н-8), 7.64 (м, 1 H, бензоксазин Н-5), 7.21 (уш. с, 1 H, гексаноил NH-6), 6.91 (ддд,  $J = 9.6, 8.6, 1$  H, бензоксазин Н-6), 6.17 (дд,  $J = 8.2, 6.0, 1$  H, Н'-1), 5.72 (уш. с, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.26 (уш.т, 1 H, 5'-ОН), 5.22 (д,  $J = 3.9, 1$  H, 3'-ОН), 4.70 (уш. сигн., 1 H, бензоксазин Н-3), 4.35 (м, 1H, Н'-3), 4.34 (м, 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.14 (дд,  $J = 10.7, \sim 1.5, 1$  H, бензоксазин Н-2b), 3.83 (м, 1 H, Н-4'), 3.58 (м, 1 H, Н-5'а), 3.51 (м, 1 H, Н-5'б), 3.41 (м, 2 H, гексаноил 2×Н-6), 2.64 (м, 1 H, гексаноил Н-2а), 2.58 (ддд,  $J = 13.3, 8.3, 5.6, 1$  H, Н-2'б), 2.46 (м, 1 H, гексаноил Н-2b), 2.15 (ддд,  $J = 13.1, 6.0, 2.7, 1$  H, Н-2'а), 1.57-1.60 (м, 4 H, гексаноил 2×Н-3 и 2×Н-5), 1.34 (м, 2 H, гексаноил 2×Н-4), 1.10 (м, 3 H, Me).

<sup>13</sup>C ЯМР:  $\delta = 171.01$  (гексаноил СО), 159.97 и 154.93 (пурин С2 и С6), 150.36 (пурин С5),

146.51 (дд,  $J_{C-F} \sim 255$ ,  $\sim 31$ , бензоксазин С8), 138.18 (дд,  $J_{C-F} = 243.6$ , 14.8, бензоксазин С7), 135.69 (д,  $J_{C-F} = 7.3$ , бензоксазин С8а), 135.34 (пурин С8), 121.79 (бензоксазин С5а), 119.29 (бензоксазин С5), 113.61 (пурин С4), 106.84 (д,  $J_{C-F} = 9.87$ , бензоксазин С6), 87.64 (С4'), 83.08 (С1'), 71.02 (С3'), 69.85 (бензоксазин С2), 61.98 (С5'),  $\sim 40$  (бензоксазин С3), 39.98 (С2'), 39.1 (гексаноил С6, сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 33.45 (гексаноил С2), 28.97 (гексаноил С5), 25.94 (гексаноил С4), 24.45 (гексаноил С3), 15.14 (СН<sub>3</sub>).

<sup>15</sup>N ЯМР:  $\delta = 241.4$  (N7), 169.5 (N9), 131.2 (бензоксазин N).

**(3S)-4-[2-Амино-9-(β-D-рибофуранозил)-пурин-6-ил]-7,8-дифтор-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин [(S)-5]**

<sup>1</sup>H ЯМР:  $\delta = 8.16$  (с, 1 H, пурин Н-8), 7.58 (ддд,  $J = 9.2, 5.8, <1$ , 1 H, бензоксазин Н-5), 6.88 (дт,  $J = 9.4$ , 1 H, бензоксазин Н-6), 6.15 (с, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.83 (д,  $J = 6.0$ , 1 H, Н'-1), 5.64 (м, 1 H, бензоксазин Н-3), 5.38(м, 1 H, 2'-ОН), 5.12 (м, 2 H, 3'-ОН и 5'-ОН), 4.50 (м, 1H, Н'-2), 4.445 (д,  $J = 10.7$ , 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.188 (дд,  $J = 10.9, <2$ , 1 H, бензоксазин Н-2b), 4.13 (м, 1H, Н'-3), 3.91 (м, 1 H, Н-4'), 3.65 (м, 1 H, Н-5'a), 3.55 (м, 1 H, Н-5'b), 1.34 (д,  $J = 6.8$ , 3 H, Me).

<sup>13</sup>C ЯМР:  $\delta = 159.27$  (пурин С2), 154.02 (пурин С4), 152.23 (пурин С6), 145.52 (д,  $J_{C-F} = 232.2$ , бензоксазин С8), 139.04 (д,  $J_{C-F} = 225.7$ , бензоксазин С7), 137.11 (пурин С8), 135.55 (д,  $J_{C-F} = 10.2$ , бензоксазин С8а), 122.48 (бензоксазин С5а), 119.26 (д,  $J_{C-F} = 8.0$ , бензоксазин С5), 114.8 (пурин С5), 106.51 (д,  $J_{C-F} = 17.6$ , бензоксазин С6), 86.46 (С1'), 85.23 (С4'), 73.36 (С2'), 70.37 (С3'), 69.54 (бензоксазин С2), 61.40 (С5'), 47.86 (бензоксазин С3), 15.45 (СН<sub>3</sub>).

<sup>15</sup>N ЯМР:  $\delta = 243.2$  (N7), 206.3 (N1), 189.1 (N3), 166.6 (N9), 101.4 (бензоксазин N), 80.2 (NH<sub>2</sub>).

**(3R)-4-[2-Амино-9-(β-D-рибофуранозил)-пурин-6-ил]-7,8-дифтор-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин [(R)-5]**

<sup>1</sup>H ЯМР:  $\delta = 8.16$  (с, 1 H, пурин Н-8), 7.59 (ддд,  $J = 9.5, 5.35, 2.1$ , 1 H, бензоксазин Н-5), 6.87 (дт,  $J = 9.8, 8.7$ , 1 H, бензоксазин Н-6), 6.14 (уш. с, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.82 (д,  $J = 5.9$ , 1 H, Н'-1), 5.63 (м, 1 H, бензоксазин Н-3), 5.38(м, 1 H, 2'-ОН), 5.11 (м, 2 H, 3'-ОН и 5'-ОН), 4.50 (дд,  $J = 5.6, 5.4$ , 1H, Н'-2), 4.43 (дд,  $J = 11.0, 1.2$ , 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.17 (дд,  $J = 11.0, 2.46$ , 1 H, бензоксазин Н-2b), 4.12 (дд,  $J = 4.8, 3.6$ , 1H, Н'-3), 3.91 (м, 1 H, Н-4'), 3.64 (дд,  $J = 12.0, 3.9$ , 1 H, Н-5'a), 3.54 (дд,  $J = 11.9, 3.70$ , 1 H, Н-5'b), 1.34 (д,  $J = 6.9$ , 3 H, Me).

<sup>13</sup>C ЯМР:  $\delta = 159.25$  (пурин С2), 154.09 (пурин С4), 152.25 (пурин С6), 145.70 (дд,  $J_{C-F} = 238.4, 8.9$ , бензоксазин С8), 139.05 (дд,  $J_{C-F} = 242.2, 15.2$ , бензоксазин С7), 137.11 (пурин С8), 135.55 (д,  $J_{C-F} = 8.9$ , бензоксазин С8а), 122.48 (бензоксазин С5а), 119.27 (д,  $J_{C-F} = 7.8$ , бензоксазин С5), 114.78 (пурин С5), 106.53 (д,  $J_{C-F} = 17.6$ , бензоксазин С6), 86.55 (С1'), 85.23 (С4'), 73.39 (С2'), 70.37 (С3'), 69.54 (бензоксазин С2), 61.39 (С5'), 47.94 (бензоксазин С3), 15.47 (СН<sub>3</sub>).

<sup>15</sup>N ЯМР:  $\delta = 243.2$  (N7), 166.7 (N9), 101.9 (бензоксазин N), 80.2 (NH<sub>2</sub>).

**(3S)-4-[6-(2-Амино-9-( $\beta$ -D-рибофуранозил)-пурин-6-ил)-амино-гексаноил]-7,8-дифтор-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин [(S)-6]**

<sup>1</sup>H ЯМР:  $\delta = 7.89$  (с, 1 H, пурин Н-8), 7.64 (м, 1 H, бензоксазин Н-5), 7.23 (уш. с, 1 H, гексаноил NH-6), 6.92 (ддд,  $J = 9.5, 8.7$ , 1 H, бензоксазин Н-6), 5.72 (д,  $J = 6.2$ , 1 H, Н'-1), 5.72 (уш. с, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.42 (м, 1 H, 5'-ОН), 5.34 (м, 1 H, 2'-ОН), 5.09 (м, 1 H, 3'-ОН), 4.71 (уш. сигн., 1 H, бензоксазин Н-3), 4.50 (м, 1H, Н'-2), 4.34 (д,  $J = 10.3$ , 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.14 (м, 1 H, бензоксазин Н-2b), 4.09 (м, 1H, Н'-3), 3.90 (м, 1 H, Н-4'), 3.63 (дт,  $J = 11.9, 3.3$ , 1 H, Н-5'а), 3.53 (ддд,  $J = 11.9, 6.3, 3.8$ , 1 H, Н-5'б), 3.31 (м, 2 H, гексаноил 2×Н-6), 2.65 (м, 1 H, гексаноил Н-2а), 2.46 (м, 1 H, гексаноил Н-2b), 1.58-1.61 (м, 4 H, гексаноил 2×Н-3 и 2×Н-5), 1.34 (м, 2 H, гексаноил 2×Н-4), 1.10 (м, 3 H, Me).

<sup>13</sup>C ЯМР:  $\delta = 170.99$  (гексаноил СО), 159.91 и 154.98 (пурин С2 и С6), 150.52 (пурин С5), 146.42 (дд,  $J_{C-F} = 244.0, \sim 12$ , бензоксазин С8), 138.93 (дд,  $J_{C-F} = 243.0, 15.7$ , бензоксазин С7), 135.71 (д,  $J_{C-F} \sim 10$ , бензоксазин С8а), 135.67 (пурин С8), 121.79 (бензоксазин С5а), 119.27 (бензоксазин С5), 113.70 (пурин С4), 106.76 (бензоксазин С6), 87.00 (С1'), 85.45 (С4'), 73.14 (С2'), 70.64 (С3'), 69.85 (бензоксазин С2), 61.70 (С5'), 39.04 (гексаноил С6, сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 33.44 (гексаноил С2), 28.95 (гексаноил С5), 25.93 (гексаноил С4), 24.43 (гексаноил С3), 15.11 (СН<sub>3</sub>).

<sup>15</sup>N ЯМР:  $\delta = 240.8$  (N7), 166.03 (N9), 130.98 (бензоксазин N).

**(3R)-4-[6-(2-Амино-9-( $\beta$ -D-рибофуранозил)-пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифтор-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин [(R)-6]**

<sup>1</sup>H ЯМР:  $\delta = 7.89$  (с, 1 H, пурин Н-8), 7.67 (м, 1 H, бензоксазин Н-5), 7.25 (уш. с, 1 H, гексаноил NH-6), 6.92 (м,  $J > 9$ , 1 H, бензоксазин Н-6), 5.72 (д,  $J = 6.1$ , 1 H, Н'-1), 5.70 (уш. с, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.43 (м, 1 H, 5'-ОН), 5.34 (м, 1 H, 2'-ОН), 5.09 (м, 1 H, 3'-ОН), 4.70 (уш. сигн., 1 H, бензоксазин Н-3), 4.50 (т,  $J = 5.5, 1H, Н'-2$ ), 4.35 (дд,  $J = 10.8, < 0.8$ , 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.14 (дд,  $J = 10.5, 1.5$ , 1 H, бензоксазин Н-2b), 4.09 (дд,  $J = 4.4, 3.0$ , 1H, Н'-3), 3.90 (м, 1 H, Н-4'), 3.64 (м, 1 H, Н-5'а), 3.53 (м, 1 H, Н-5'б), 3.39 (м, 2 H, гексаноил 2×Н-6), 2.65 (м, 1 H, гексаноил Н-2а), 2.47 (м, 1 H, гексаноил Н-2b), 1.59-1.60 (м, 4 H, гексаноил 2×Н-3 и 2×Н-5), 1.34 (м, 2 H, гексаноил 2×Н-4), 1.10 (м, 3 H, Me).

<sup>13</sup>C ЯМР:  $\delta = 170.98$  (гексаноил СО), 159.92 (пурин С2), 155.07 (пурин С6), 150.52 (пурин С5), 138.85 (дд,  $J_{C-F} = 238.9, \sim 10$ , бензоксазин С7), 135.77 (пурин С8), 135.67 (м, бензоксазин С8а), 121.78 (бензоксазин С5а), 119.22 (м, бензоксазин С5), 113.04 (пурин С4), 106.76 (бензоксазин С6), 86.98 (С1'), 85.46 (С4'), 73.16 (С2'), 70.64 (С3'), 69.84 (бензоксазин С2), 61.69 (С5'), 39.14 (гексаноил С6, сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 33.45 (гексаноил С2), 28.98 (гексаноил С5), 25.94 (гексаноил С4), 24.43 (гексаноил С3), 15.14 (СН<sub>3</sub>).

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 240.8$  (N7), 166.34 (N9), 131.0 (бензоксазин N).

***(3R)-4-[2-Амино-9-( $\beta$ -D-арабинофуранозил)пурин-6-ил]-7,8-дифтор-3-метил-3,4-дигидро-2H-[1,4]бензоксазин [(R)-7]***

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 1.34$  (д,  $J = 6.6$ , 3 H, Me), 3.61 (м, 1 H, Ага Н-5В), 3.66 (м, 1 H, Ага Н-5А), 3.76 (м, 1 H, Ага Н-4), 4.08 (м, 1 H, Ага Н-2), 4.10 (м, 1 H, Ага Н-3), 4.16 (д,  $J = 10.5$ , 1 H, бензоксазин Н-2В), 4.44 (д,  $J = 10.9$ , 1 H, бензоксазин Н-2А), 5.04 (уш. т,  $J = 4.8$ , 1 H, ОН-5 Ага), 5.49 (д,  $J = 3.7$ , 1 H, ОН-3 Ага), 5.62 (д,  $J = 5.0$ , 1 H, ОН-2 Ага), 5.64 (м, 1 H, бензоксазин Н-3), 6.15 (уш. с, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 6.16 (д,  $J = 4.5$ , 1 H, Ага Н-1), 6.87 (м, 1 H, бензоксазин Н-6), 7.60 (м, 2 H, бензоксазин Н-5), 7.98 (с, 1 H, пурин Н-8).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 16.02$  ( $\text{CH}_3$ ), 48.45 (бензоксазин С-3), 61.46 (Ага С-5), 70.06 (бензоксазин С-2), 75.83 и 75.97 (Ага С-2 и С-3), 83.68 (Ага С-1), 84.71 (Ага С-4), 107.0 (д,  $J_{\text{C-F}} = 17.8$ , бензоксазин С-6), 114.49 (пурин С-5), 119.78 С5 (дд,  $J_{\text{C-F}} = 9.4$ , 3.7, бензоксазин С-5), 123.11 (бензоксазин С-5а), 136.07 (дд,  $J_{\text{C-F}} = 10.6$ , 2.4, бензоксазин С-8а), 139.8 (пурин С-8), 139.43 (дд,  $J_{\text{C-F}} = 256.3$ , 15.0, бензоксазин С-7), 146.41 (дд,  $J_{\text{C-F}} = 239.6$ , 10.6, бензоксазин С-8), 152.58, 154.52 и 159.8 (пурин С2, С4 и С6).

***(3R)-4-[6-(2-Амино-9-( $\beta$ -D-арабинофуранозил)пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифтор-3-метил-3,4-дигидро-2H-[1,4]бензоксазин [(R)-8]***

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 1.12$  (м, 3 H, Me), 1.36 (м, 2 H, гексаноил  $2 \times \text{H-4}$ ), 1.56-1.65 (м, 4 H, гексаноил  $2 \times \text{H-3}$  и  $2 \times \text{H-5}$ ), 2.48 (м, 1 H, гексаноил Н-2b, partially сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 2.67 (м, 1 H, гексаноил Н-2а), 3.41 (м, 2 H, гексаноил  $2 \times \text{H-6}$ , overlapped by  $\text{H}_2\text{O}$  signal), 3.61 (дд,  $J = 11.7$ , 5.1, 1 H, Ага Н-5b), 3.66 (дд,  $J = 11.7$ , 4.4, 1 H, Ага Н-5а), 3.75 (м, 1 H, Ага Н-4), 4.03 (м, 1 H, Ага Н-2), 4.08 (м, 1 H, Ага Н-3), 4.16 (уш. д,  $J = 10.6$ , 1 H, бензоксазин Н-2b), 4.36 (уш. д,  $J = 10.6$ , 1 H, бензоксазин Н-2а), 4.71 (м, 1 H, бензоксазин Н-3), 5.08 (уш. с. 1 H, Ага ОН-5), 5.47 (уш. с. 1 H, Ага ОН-3), 5.61 (уш. с. 1 H, Ага ОН-2), 5.80 (уш. с, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 6.08 (д,  $J = 4.6$ , 1 H, Ага Н-1), 6.93 (ддд,  $J = 9.2$ , 9.2, 8.8, 1 H, бензоксазин Н-6), 7.18 (уш. с, 1 H, гексаноил НН-6), 7.71 (м, 1 H, бензоксазин Н-5), 7.77 (с, 1 H, пурин Н-8).

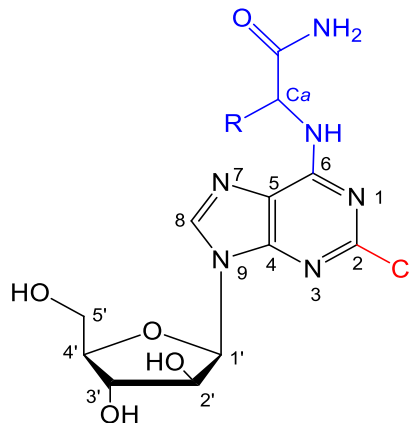
$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 15.07$  ( $\text{CH}_3$ ), 24.39 (гексаноил С-3), 25.90 (гексаноил С-4), 28.86 (гексаноил С-5), 33.40 (гексаноил С-2), 39.63 (гексаноил С-6, сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 40.93 (бензоксазин С-3), 61.03 (С-5'), 69.79 (бензоксазин С-2), 75.42 и 75.50 (Ага С-2 и С-3), 83.10 (Ага С-1), 84.04 (Ага С-4), 106.73 (д,  $J_{\text{C-F}} = 18.3$ , бензоксазин С-6), 112.53 (пурин С-5), 119.23 (бензоксазин С-5а), 121.74 (бензоксазин С-5), 135.65 (бензоксазин С-8а), 136.11 (м, бензоксазин С-8), 136.55 (пурин С-8), 139.37 (дд,  $J_{\text{C-F}} = 243.2$ , 15.0, бензоксазин С-7), 150.9 (пурин С-4), 154.75 и 160.10 (пурин С-2 и С-6), 170.95 (гексаноил СО).

**(3S)-4-[6-(2-Амино-9-(β-D-арабинофуранозил)пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифтор-3-метил-3,4-дигидро-2H-[1,4]бензоксазин [(S)-8]**

<sup>1</sup>H ЯМР: δ = 1.11 (м, С4 3 Н, Me), 1.35 (м, 2 Н, гексаноил 2×Н-4), 1.56-1.65 (м, 4 Н, гексаноил 2×Н-3 и 2×Н-5), 2.48 (м, 1 Н, гексаноил Н-2b, сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 2.66 (м, 1 Н, гексаноил Н-2а), 3.40 (м, 2 Н, гексаноил 2×Н-6, сигнал накладывается на сигнал Н<sub>2</sub>O), 3.60 (м, 1 Н, Ага Н-5b), 3.65 (м, 1 Н, Ага Н-5а), 3.74 (м, 1 Н, Ага Н-4), 4.02 (м, 1 Н, Ага Н-2), 4.08 (м, 1 Н, Ага Н-3), 4.15 (д, *J* = 11.0, 1 Н, бензоксазин Н-2b), 4.36 (д, *J* = 11.0, 1 Н, бензоксазин Н-2а), 4.70 (м, 1 Н, бензоксазин Н-3), 5.07 (м, 1 Н, ОН-5 Ага), 5.46 (д, *J* = 3.9, 1 Н, Ага ОН-3), 5.60 (д, *J* = 4.0, 1 Н, Ага ОН-2), 5.79 (уш. с, 2 Н, NH<sub>2</sub>), 6.08 (д, *J* = 4.6, 1 Н, Ага Н-1), 6.93 (ддд, *J* = 9.8, 9.8, 8.8, 1 Н, бензоксазин Н-6), 7.17 (уш. с, 1 Н, гексаноил NH-6), 7.63 (м, 2 Н, бензоксазин Н-5), 7.76 (с, 1 Н, пурин Н-8).

<sup>13</sup>C ЯМР: δ = 15.07 (CH<sub>3</sub>), 24.40 (гексаноил С-3), 25.90 (гексаноил С-4), 28.89 (гексаноил С-5), 33.40 (гексаноил С-2), 39.13 (гексаноил С-6, сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 39.23 (бензоксазин С-3, сигнал накладывается на сигнал ДМСО), 61.03 (Ага С-5), 69.78 (бензоксазин С-2), 75.42 и 75.51 (Ага С-2 и С-3), 83.09 (Ага С-1), 84.03 (Ага С-4), 106.72 (д, *J*<sub>C-F</sub> = 17.7, бензоксазин С-6), 112.49 (пурин С-5), 119.21 (бензоксазин С-5а), 121.74 (бензоксазин С-5), 135.63 (д, *J*<sub>C-F</sub> = 12, бензоксазин С-8а), 136.42 (пурин С-8), 136.63 (м, бензоксазин С-8), 138.80 (дд, *J*<sub>C-F</sub> = 243.0, 14.0, бензоксазин С-7), 150.64 (пурин С-4), 154.75 и 160.00 (пурин С-2 и С-6), 170.94 (гексаноил СО).

### 3.3.2 Аналоги 2-хлорпурина (Серия II)



**9-β-D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(Nα-глициниламидо)-пурин (9b)**

<sup>1</sup>H ЯМР: δ = 8.25 и 8.22 (2 с, 0.60Н и 0.16Н, Н-8), 8.12 и 8.01 (2 с, 0.78Н и 0.17Н, С6-NH), 7.41 и 7.05 (2 сигн., 1Н, СО-NH), 7.41 и 7.01 (2 сигн., 1Н, СО-NH), 6.17 (д, *J* = 5.2, 0.81Н, Н-1'), 5.64 (уш.с., 0.90Н, 2'-ОН), 5.52 (с, 1Н, 3'-ОН), 5.05 (с, 0.89Н, 5'-ОН), 4.19 (м, 1Н, Н-2'), 4.13 (м, 1Н, Н-3'), 3.99 (уш.сигн., 1.65Н, NH-CH<sub>2</sub>), 3.79 (м, 1Н, Н-4'), 3.68 (м, 1Н, Н-5'a), 3.65 (м, 1Н, Н-5'b).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 140.39$  (C8), 83.36 (C1'), 83.75 (C4'), 75.22 (C2'), 74.29 (C3'), 60.30 (C5'), 42.43 (NH-CH<sub>2</sub>).

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 239.3$  (N7), 169.1 (N9), 103.6 (CO-NH<sub>2</sub>), 85.1 (C6-NH).

**9-β-D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(N<sup>α</sup>-L-аланиниламидо)-пурин (10b)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.25$  (с, 1H, H-8), 7.87 и 7.86 (уш.д.,  $J = 6.0$ , 1 H, C6-NH), 7.44 и 7.08 (2 сигн., 1H, CO-NH), 7.44 и 7.05 (2 сигн., 1H, CO-NH), 6.17 (д,  $J = 4.7$ , 1H, H-1'), 5.63 (д.,  $J = 4.7$ , 1H, 2'-OH), 5.52 д.,  $J = 3.9$ , 1H, 3'-OH), 5.05 (уш.сигн., 1H, 5'-OH), 4.61 (уш.сигн., 1H, NH-CH), 4.18 (м, 1H, H-2'), 4.12 (м, 1H, H-3'), 3.79 (м, 1H, H-4'), 3.68 (м, 1H, H-5'a), 3.66 (м, 1H, H-5'b), 1.42 (д.,  $J = 6.9$ , 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 140.48$  (C8) 83.78 (C4'), 83.41 (C1'), 75.21 (C2'), 74.29 (C3'), 60.30 (C5'), 48.88 (NH-CH), 18.07 (CH<sub>3</sub>).

$^{15}\text{N}$  ЯМР  $\delta = 239.2$  (N7), 169.1 (N9), 105.9 (CO-NH<sub>2</sub>), 98.0 (C6-NH).

**9-β-D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(N<sup>α</sup>-L-валиниламидо)-пурин (11b)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.27$  (с, 1H, H-8), 7.77 и 7.43 (2 с., 0.2H и  $J = 7.6$ , 0.78H, C6-NH), CO-NH, 7.54 и 7.14 (2 с., 0.8H и 0.23H, CO-NH), 7.37 и 7.18 (2 с., 0.22H и 0.77H, CO-NH), 6.18 (д,  $J = 7.6$ , 1H, H-1'), 5.63 (уш.сигн., 1H, 2'-OH), 5.54 (уш.сигн., 1H, 3'-OH), 5.32 и 5.06 (2 с., 0.2H и 0.8H, 5'-OH), 4.63 (м, 0.8H, CβH) 4.18 (м, 1H, H-2'), 4.13 (м, 1H, H-3') 3.79 (м, 1H, H-4') 3.69 (м, 1H, H-5'a), 3.65 (м, 1H, H-5'b), 2.18 (м, 1H, CαH) 0.96 (м, 3H, CH<sub>3</sub>) 0.94 (м, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 172.40$  (CO-NH<sub>2</sub>), 154.57 (C6), 152.62 (C2), 149.69 (C4), 140.90 (C8), 117.68 (C5), 84.06 (C4'), 83.74 (C1'), 75.47 (C2'), 74.52, (C3'), 60.57 (C5'), 58.86 (Cα), 30.54 (Cβ), 19.14 (CH<sub>3</sub>), 18.29 (CH<sub>3</sub>).

**9-β-D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(N<sup>α</sup>-L-сериниламидо)-пурин (12b)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.27$  и 8.25 (2 с., 0.84H и 0.14, H-8), 7.60 и 7.55 (уш.сигн., 0.18H, и уш.д.,  $J = 6.2$ , 0.82H, C6-NH), 7.47 и 7.45 (2 с., 0.78H и 0.24H, CO-NH), 7.16 (с, 1H, CO-NH), 6.18 (д,  $J = 5.0$ , 1H, H-1'), 5.64 (уш.сигн., 1H, 2'-OH), 5.52 (уш.д.,  $J = 3.4$ , 1H, 3'-OH), 5.05 (уш.сигн., 1H, 5'-OH), 5.04 и 4.93 (2 с., 0.80H и 0.2H, OH-Ser), 4.63 (м, 0.80H, CαH) 4.18 (м, 1H, H-2'), 4.13 (м, 1H, H-3') 3.81 (м, 2H, CH<sub>2</sub>OH) 3.79 (м, 1H, H-4') 3.68 (м, 1H, H-5'a), 3.66 (м, 1H, H-5'b).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 140.57$  (C8), 83.79 (C4'), 83.43 (C1'), 75.21 (C2'), 74.30 (C3'), 61.30 (CH<sub>2</sub>OH), 60.33 (C5'), 55.74 (Cα).

$^{15}\text{N}$  ЯМР  $\delta = 238.7$  (N7), 169.3 (N9), 104.8 (CO-NH<sub>2</sub>), 90.9 (C6-NH).

**9-β-D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(N<sup>α</sup>-D-сериниламидо)-пурин (13b)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.28$  и 8.25 (2 с., 0.85H и 0.25H, H-8), 7.60 и 7.53 (2 с., 0.05H и 0.83H, C6-NH), 7.49 и 7.14 (2уш.сигн., 0.88H, 0.22H, CO-NH), 7.45 и 7.18 (2 с., 0.16 и 0.91H, CO-NH), 6.18 (д,  $J = 5.2$ , 1H, H-1'), 5.64 (уш.сигн., 1H, 2'-OH), 5.54 (уш.сигн., 1H, 3'-OH), 5.06 (уш.сигн., 1H, 5'-OH), 5.02 (уш.сигн., 1H, OH-Ser), 4.63 (м, 1H, CαH) 4.19 (м, 1H, H-2'), 4.13 (м, 1H, H-3') 3.80

(м, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ) 3.79 (м, 1H, H-4') 3.68 (м, 1H, H-5'a), 3.66 (м, 1H, H-5'b).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 171.29$  (CO-NH<sub>2</sub>), 154.36 (C6), 152.59 (C2), 149.65 (C4), 140.85 (C8), 117.87 (C5), 84.00 (C4'), 83.68 (C1'), 75.48 (C2'), 74.46 (C3'), 61.56 (CH<sub>2</sub>OH), 60.54 (C5'), 55.99 (C $\alpha$ ).

$^{15}\text{N}$  ЯМР  $\delta = 238.7$  (N7), 169.7(N9), 105.1 (CO-NH<sub>2</sub>), 90.9 (C6-NH).

**9- $\beta$ -D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(Na-L-треониниламидо)-пурин (14b)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.28$  и  $8.26$  (2 с, 0.78H и 0.22H, H-8), 7.49 и 7.43, (2 с., 0.97H, CO-NH), 7.20 (д,  $J = 8.5$ , 0.78H, C6-NH) 7.13 и 7.11 (2 с., 0.98H, CO-NH), 6.18 (д,  $J = 5.2$ , 1H, H-1'), 5.64 (д.,  $J = 5.6$ , 1H, 2'-OH), 5.52 (д.,  $J = 5.0$ , 1H, 3'-OH), 5.11 (уш.д,  $J = 6.0$ , 0.76H, OH), 5.05 (т,  $J = 5.5$ , 1H, 5'-OH), 4.53 (уш.сигн., 0.78H, NH- $\text{CH}$ ), 4.19 (м, 2H, H-2'), 4.13 (м, 1H, H-3'), 3.79 (м, 1H, H-4'), 3.68 (м, 1H, H-5'a), 3.66 (м, 1H, H-5'b), 1.13 (д,  $J = 6.6$ , 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  ЯМР  $\delta = 171.58$  (CO-NH<sub>2</sub>), 154.81 (C6), 152.62 (C2), 149.64 (C4), 140.98 (C8), 117.84 (C5), 84.06 (C4'), 83.73 (C1'), 75.47 (C3'), 74.53 (C2'), 66.65 (CH-OH), 60.57 (C5'), 59.12 (NH-CH), 20.40 (CH<sub>3</sub>).

$^{15}\text{N}$  ЯМР  $\delta = 238.5$  (N7), 227.2 (N1), 169.3 (N9), 105.2 (CO-NH<sub>2</sub>), 87.7 (C6-NH).

**9- $\beta$ -D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(N $^{\alpha}$ -L-метиониниламидо)-пурин (15b)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.26$  (с, 1H, H-8), 8.06 (уш.д, 1H  $J = 7.6$ , C6-NH), 7.45 и 7.42 (2 с., 0.75H и 0.18H, CO-NH), 7.11 и 7.09 (2 с., 0.72H и 0.22H, CO-NH), 6.18 (д,  $J = 5.2$ , 1H, H-1'), 5.63 (уш.с, 1H, 2'-OH), 5.51(д,  $J = 4.5$ , 1H, 2'-OH), 5.04 (уш.с, 1H, 5'-OH), 4.68 (м, 0.91H, C $\alpha$ H), 4.18 (уш.с, 1H, H-2'), 4.13 (м, 1H, H-3'), 3.79 (м, 1H, H-4'), 3.68 (м, 1H, H-5'a), 3.66 (м, 1H, H-5'b), 2.55 (м, 1H, C $\gamma$ Ha), 2.51 (м, 1H, C $\gamma$ Hb), 2.10 (м, 2H, C $\beta$ Ha и C $\beta$ Hb), 2.05 (м, 3H, C $\epsilon$ H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 172.88$  (CO-NH<sub>2</sub>), 154.61(C6), 152.56 (C2), 149.70 (C4), 140.72 (C8), 117.80 (C5), 84.06 (C4'), 83.69 (C1'), 75.45 (C2'), 74.58 (C3'), 60.59 (C5'), 53.04 (C $\alpha$ ), 31.26 (C $\beta$ ), 29.85 (C $\gamma$ ), 14.49 (C $\epsilon$ ).

$^{15}\text{N}$  ЯМР  $\delta = 239.5$  (N7), 227.8 (N1), 169.2 (N9), 104.4 (CO-NH<sub>2</sub>), 94.8 (C6-NH).

**9- $\beta$ -D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(Na-L-C-метилцистеиниламидо)-пурин (16b)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.27$  (с, 1H, H-8), 8.05 и 7.94 (2 с., 0.22H и 0.78H, C6-NH), 7.57 и 7.51 (2 с., 0.74H и 0.26H, CO-NH), 7.23 (с, 1H, CO-NH), 6.18 (д,  $J = 5.2$ , 1H, H-1'), 5.65 и 5.60 (2 уш.с., 0.70H и 0.30H, 2'-OH), 5.53 (уш.с., 1H, 3'-OH), 5.06 (уш.с., 1H, 5'-OH), 4.81 (м, 0.8H, NH- $\text{CH}$ ), 4.19 (уш.т., 1H, H-3'), 4.13 (уш.т., 1H, H-2'), 3.79 (м, 1H, H-4'), 3.68 (м, 1H, H-5'a), 3.65 (м, 1H, H-5'b), 2.99 и 2.84 (2м, 1.85H и 0.15H, ), (м, 0.25H, CH<sub>2</sub>), 2.10 и 2.08 (2 с, 2.40H и 0.6H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 171.77$  (CO-NH<sub>2</sub>), 154.52 (C6), 152.55 (C2), 149.78 (C4), 140.89 (C8), 117.76 (C5), 84.03 (C4'), 83.68 (C1'), 75.47 (C2'), 74.52 (C3'), 60.56, (C5'), 52.90 (NH-CH), 35.75 (CH<sub>2</sub>-C), 15.00 (C-CH<sub>3</sub>).

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 238.6$  (N7), 227.5 (N1), 169.5 (N9), 105.7 (CO-NH<sub>2</sub>), 95.3 (C6-NH).

**9-β-D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(Na-L-тирозиниламидо)-пурин (17b)**

<sup>1</sup>H ЯМР: δ = 9.14 (с, 1H, OH), 8.40 (с, 1H, H-8), 8.04 и 7.88 (уш.д, J = 9.6, 0.20H и д, J = 8.0, 0.71H, CO-NH), 7.57 и 7.50 (2 с., 0.69H и 0.20H, CO-NH) 7.15 (уш.сигн., 0.69H, CO-NH) 7.12 и 7.08 (м, J = 8.5, J = 8.2, 2H, CδH), 6.62 и 6.61 (м, 2H, CεH), 5.81 (д, J = 6.0, 1H, H-1'), 5.47 (д, J = 6.1, 1H, 3'-OH), 5.18 (уш.д, J = 5.0, 1H, 2'-OH), 5.04 (м, 1H, 5'-OH), 4.76 (м, 0.74H, CαH), 4.51 (м, 1H, H-3'), 4.34 (д, J = 4.2, 0.12H, ), 4.13 (м, 1H, H-2') 3.94 (м, 1H, H-4'), 3.65 (м, 1H, H-5'a), 3.55 (м, 1H, H-5'b) 3.07 (м, 0.8H, CβHa) 3.01( м, 1.2H, CβHb).

<sup>13</sup>C ЯМР: δ = 172.69 (CO-NH<sub>2</sub>), 155.66 (Cζ) 154.55 (C6), 152.71 (C2), 149.55 (C4), 140.07 (C8), 129.97 (Cδ), 127.90 (C γ), 118.54 (C5), 114.77 (Cε), 87.36 (C1'), 85.61 (C4'), 73.56 (C3'), 70.26 (C2'), 61.23 (C5'), 55.36 (Cα), 36.27 (Cβ).

<sup>15</sup>N ЯМР: δ= 241.2 (N7), 227.7 (N1), 171.6 (N9), 104.5 (CO-NH<sub>2</sub>), 95.8 (C6-NH).

**9-β-D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(Na-L-лизиниламидо)-пурин (18b)**

<sup>1</sup>H ЯМР: δ = 8.26 (с, 1H, H-8), 7.97 и 7.88 (уш.д, 0.18H и д, J = 8.0, 0.72H, C6-NH), 7.61 (уш.сигн., 2H, Cε-NH<sub>2</sub>), 7.46 и 7.39 (2 уш.сигн., 0.80H и 0.20H, CO-NH), 7.12 и 7.07 (2 уш.сигн., 0.78H и 0.22H, CO-NH), 6.17 (д, J = 5.1, 1H, H-1'), 5.67 и 5.65 (уш.сигн., 0.2H, и д, J = 5.5, 0.73H, 2'-OH), 5.52 (д, J = 4.8, 0.91H, 3'-OH), 5.09 и 5.03 (уш.сигн., 0.20H, и т, J = 5.2, 0.75H, 5'-OH), 4.59 (уш.сигн., 0.81H, CαH), 4.22 и 4.18 (уш.сигн., 0.22H и м, 0.78H, H-2'), 4.13 (м, 1H, H-3'), 3.79 (м, 1H, H-4'), 3.69 (м, 1H, H-5'a), 3.65 (м, 1H, H-5'b), 2.81 (м, 2H, Cβ-Ha и Cβ-Hb), 1.85 и 1.74 (2 уш.сигн., 1.78 H и 0.22H, Cε-Ha и Cε-Hb), 1.56 (м, 2H, Cδ-Ha и Cδ-Hb), 1.40 (м, 2H, Cγ-Ha и Cγ-Hb).

<sup>13</sup>C ЯМР δ = 173.17 (CO-NH<sub>2</sub>), 154.56 (C6), 152.63 (C2), 149.68 (C4), 140.43 (C8), 117.77 (C5), 83.9 (C1'), 83.59 (C4'), 75.24 (C2'), 74.38 (C3'), 60.33 (C5'), 53.14 (Cα), 38.37 (Cβ), 30.90 (Cε), 26.33 (Cδ), 22.08 (Cγ).

<sup>15</sup>N ЯМР: δ = 239.7 (N7), 169.8 (N9), 104.4 (CO-NH<sub>2</sub>), 95.9 (C6-NH).

**9-β-D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(Nε-L-лизиниламидо)-пурин (19b)**

<sup>1</sup>H ЯМР: δ = 8.27 и 8.15 (уш.т, 0.74H, J = 5.1, и с., 0.26H, C6-NH), 8.19 (с, 1H, H-8), 7.24 (с, 1H, CO-NH), 6.84 (с, 1H, CO-NH), 6.16 (д, J = 4.6, 1H, H-1'), 5.52 (уш.сигн., 0.88H, 2'-OH), 5.62 (уш.сигн., 1H, 3'-OH), 5.05 (уш.сигн., 0.8H, 5'-OH), 4.17 (уш.сигн., 1H, H-2'), 4.11 (уш.сигн., 1H, H-3'), 3.84 и 3.41 (уш.сигн., 0.4H, и м, 1.6H, Cε-H), 3.78 (м, 1H, H-4'), 3.68 (м, 1H, H-5'a), 3.64 (м, 1H, H-5'b), 3.29 (с., 2H, Cα-NH<sub>2</sub>), 3.06 (уш.т, 1H, Cα-H), 1.58 и 1.38 (м и м, 3H и 3H, Cβ-Ha и Cβ-Hb, Cγ-Ha и Cγ-Hb, Cδ-Ha и Cδ-Hb).

<sup>13</sup>C ЯМР δ = 177.54 (CO-NH<sub>2</sub>), 154.85 (C6), 152.84 (C2), 149.34 (C4), 140.19 (C8), 117.63 (C5), 83.91 (C1'), 83.62 (C4'), 75.49 (C2'), 74.60 (C3'), 60.60 (C5'), 54.49 (Cα), 39.67 (Cβ), 34.89 (Cε), 28.63 (Cδ), 22.71 (Cγ).



$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 239.6$  (N7), 226.4 (N1) 183.0 (C $\alpha$ -NH $_2$ ) 168.8 (N9), 102.8 (CO-NH $_2$ ), 95.3 (C6-NH).

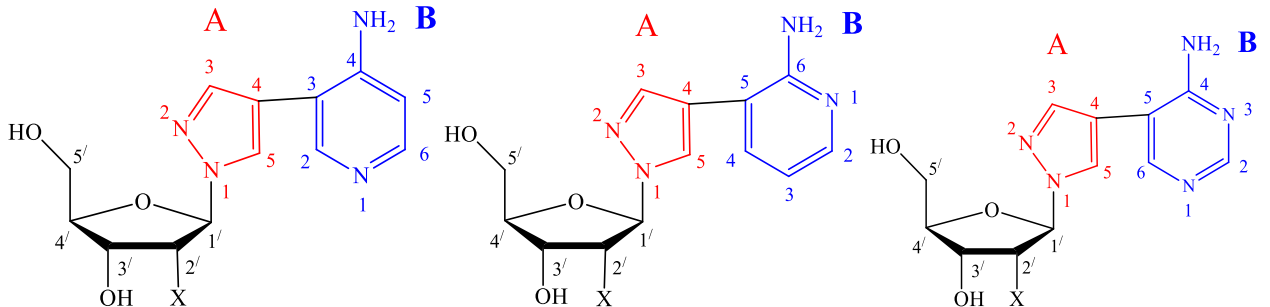
**9- $\beta$ -D-арабинофуранозил-2-хлор-6-(N-(3-амино-3-оксопропил)-)пурин (20b)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.24$  и 8.21 (2 с., 0.18H и 0.82, H-8), 8.14 и 8.04 (уш.т, 0.8H, и м, 0.15H, C6-NH), 7.35 и 7.31(2 с., 0.80H и 0.20H, H-8, CO-NH), 6.84 (с, 1H, CO-NH), 6.16 (уш.д, 1H, H-1'), 5.62 (уш.д., 1H, 2'-OH), 5.52 (уш.д., 1H, 3'-OH), 5.05 (уш.сигн., 1H, 5'-OH), 4.17 (м, 1H, H-2'), 4.12 (м, 1H, H-3'), 4.04 (м, 0.39H, C $\alpha$ H-a) 3.78 (м, 1H, H-4'), 3.69 (м, 1H, H-5'a), 3.65 (м, 1H, H-5'b), 3.63 (м, 1.54H, C $\alpha$ H-b) 2.44. (т,  $J = 7.1$ , 2H, C $\beta$ H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 172.43$  (CO-NH $_2$ ), 154.71(C6), 152.93 (C2), 149.40 (C4), 140.44 (C8), 117.65 (C5), 84.01 (C4'), 83.62 (C1'), 75.48 (C2'), 74.55 (C3'), 60.58 (C5'), 36.57 (C $\alpha$ ), 34.27 (C $\beta$ ).

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 109.5$  (CO-NH $_2$ ).

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



**1-( $\beta$ -D-рибофуранозил)-4-(4-аминопиридин-3-ил)-пиразол (30)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.23$ , (с, 1H, H-5''), 8.11 (с, 1H, H-2B), 7.93 (д, 1H,  $J = 4.9$ , H-6B), 7.80 (с, 1H, H-3''), 6.64 (д,  $J = 4.9$  1H, H-5B), 5.74 (с, 2H, 6-NH $_2$ ), 5.70 (д,  $J = 4.3$  1H, H-1'), 5.39 (с, 1H, 2'-OH), 5.12 (с, 1H, 3'-OH), 4.88 (с, 1H, 5'-OH), 4.39 (уш.т., 1H, H-2'), 4.16 (уш.т., 1H, H-3'), 3.92 (м, 1H, H-4'), 3.63 (м, 1H, H $_a$ -5'), 3.52 (м, 1H, H $_b$ -5').

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 150.31$  (C4B), 148.51 (C2B), 147.28 (C6B), 137.97 (C3A), 127.31 (C5A), 115.75 (C4A), 112.24 (C3B), 109.01 (C5B), 93.03 (C1'), 84.51 (C4'), 74.03 (C2'), 69.91 (C3'), 61.25 (C5').

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 303.9$  (N2A), 279.6 (N1B), 222.7 (NA), 67.8 (6-NH $_2$ ).

**1-( $\beta$ -D-рибофуранозил)-4-(2-аминопиридин-3-ил)-пиразол (31)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.27$ , (с, 1H, H-5A), 7.90 (дд,  $J = 1.8$ ; 4.9, 1H, H-2B), 7.84 (с., 1H, H-3A), 7.50 (дд,  $J = 1.8$ ; 7.4, 1H, H-4B), 6.63 (дд,  $J = 4.9$ ; 7.3, 1H, H-3B), 5.70 (д,  $J = 4.1$ , 1H, H-1'), 5.62 (с, 2H, 6-NH $_2$ ), 5.38 (с, 1H, 2'-OH), 5.09 (с, 1H, 3'-OH), 4.87 (с, 1H, 5'-OH), 4.39 (м, 1H, H-2'). 4.16 (т,  $J = 4.8$ , 1H, H-3'), 3.92 (дд,  $J = 4.6$ , 1H, H-4'), 3.63 (дд  $J = 3.8$ ; 11.9, 1H, H $_b$ -5'), 3.50 (дд  $J = 4.6$ ; 11.8, 1H, H $_a$ -5').

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 156.12$  (C6B), 145.95 (C2B), 138.40 (C3'), 135.98 (C4B), 127.61 (C5A), 118.08

(C4A), 113.00 (C3B), 111.86 (C5B), 93.38 (C1'), 84.88 (C4'), 74.36 (C2'), 70.29 (C3'), 61,62 (C5').

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 303.54$  (N2A), 270,63 (N1B), 222.20 (N1A), 76.22 (6-NH<sub>2</sub>).

***1- $\beta$ -D-рибофуранозил-4-(4-аминопиримидин-5-ил)-пиразол (32)***

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.32$ , (с, 1H, H-2B), 8.29 (с, 1H, H-5A), 8.18 (с., 1H, H-6B), 7.85 (с, 1H, H-3A), 6.63 (с, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 5.69 (д,  $J = 4.0$  1H, H-1'), 5.39 (с, 1H, 2'-OH), 5.11 (с, 1H, 3'-OH), 4.86 (с, 1H, 5'-OH), 4.39 (м, 1H, H-2'), 4.16 (м, 1H, H-3'), 3.92 (дд,  $J = 5.0$ ; 13.8, 1H, H-4'), 3.63 (м, 1H, Ha-5'), 3.50 (м, 1H, Hb-5').

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 160.13$  (C4B), 156.36 (C2B), 153.24 (C6B), 138.30 (C3A), 127.94 (C5A), 114.52 (C4A), 109.44 (C5B), 93.45 (C1'), 84.90 (C4'), 74.37 (C3'), 70.24 (C2') 61.59 (C5').

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 304.1$  (N2A), 261.4 (N1B), 249.9 (N3B), 223.2 (N1A), 83.2 (6-NH<sub>2</sub>).

***1-( $\beta$ -D-2'-дезоксирибофуранозил)-4-(4-аминопиримидин-3-ил)-пиразол (33)***

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.19$  (с, 1H, H-5A), 8.12 (с, 1H, H-2B), 7.94 (д,  $J = 3.7$ , 1H, H-6B), 7.78 (с., 1H, H-3A), 6.65 (д,  $J = 5.9$ , 1H, H-5B), 6.13 (т,  $J = 6.4$  1H, H-1'), 5.86 (с, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 5.24 (с, 1H, 3'-OH), 4.84 (с, 1H, 5'-OH), 4.39 (м, 1H, H-3'), 3.84 (дд,  $J = 5.7$ ; 14.8, 1H, H-4'), 3.55 (дд,  $J = 5.7$ ; 17.13, 1H, Ha-5'), 3.45 (дд,  $J = 5.4$ ; 17.13, 1H, Hb-5'), 2.66 (м, Hb-2'), 2.26 (м, Ha-2').м.д.

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 151.00$  (C4B), 148.34 (C2B), 147.14 (C6B), 138.18 (C3A), 127.63 (C5A), 115.87 (C3B), 112.68 (C4A), 109.35 (C5B), 89.08 (C1'), 87.70 (C4'), 70.68 (C3'), 61.99 (C5'), 40.15 (C2')..

$^{15}\text{N}$  ЯМР: 302.5 (N2A), 273,5 (N1B), 226.2 (N1A), 68.9 (6-NH<sub>2</sub>).

***1-( $\beta$ -D-2'-дезоксирибофуранозил л)-4-(2-аминопиримидин-3-ил)-пиразол (34)***

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.22$ , (с, 1H, H-5A), 7.89 (д,  $J = 4.0$ , 1H, H-2B), 7.81 (с., 1H, H-3A), 7.49 (д,  $J = 8.0$ , 1H, H-4B), 6.63 (дд,  $J = 4.7$ ; 7.4, 1H, H-3B), 6.13 (т,  $J = 6.6$ , 1H, H-1'), 5.61 (с, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 4.39 (м, 1H, H-3'). 3.84 (дд,  $J = 5.2$ ; 8.8, 1H, H-4'), 3,55 (м, 1H, Ha-5'), 3,45 (м, 1H, Hb-5'), 2,66 (м, 1H, Ha-2'), 2,26 (м, 1H, Hb-2').

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 155.91$  (C6B), 145.73 (C2B), 137.97 (C3'), 135.69 (C4B), 127.24 (C5A), 117.80 (C4A), 112.75 (C3B), 111.62 (C5B), 88.85 (C1'), 87.45 (C4'), 70.46 (C3'), 61.76 (C5'), 41,12 (C2').

$^{15}\text{N}$  ЯМР: 302.9 (N2A), 271.1 (N1B), 225.9 (N1A), 73.2 (6-NH<sub>2</sub>).

***1-( $\beta$ -D-2'-дезоксирибофуранозил)-4-(4-аминопиримидин-5-ил)-пиразол (35)***

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.31$ , (с, 1H, H-2B), 8.24 (с, 1H, H-5A), 8.18 (с., 1H, H-6B), 7.83 (с, 1H, H-3A), 6.63 (с, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 6.12 (т,  $J = 6.4$  1H, H-1'), 5.24 (с, 1H, 5'-OH), 4.82 (с, 1H, 3'-OH), 4.39 (м, 1H, H-3'), 3.84 (дд,  $J = 5.0$ ; 13.4, 1H, H-4'), 3.55 (дд,  $J = 5.5$ ; 16.6, 1H, Ha-5'), 3.45 (дд,  $J = 5.1$ ; 16.5, 1H, Hb-5'), 2.66 (м, 1H, Hb-2'), 2.26 (м, 1H, Ha-2').

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 160.13$  (C4B), 156.33 (C2B), 153.23 (C6B), 138.11 (C3A), 127.83 (C5A), 114.45 (C4A), 109.47 (C5B), 89.14 (C1'), 87.72 (C4'), 70.65 (C3'), 61.96 (C5'), 39.80 (C2').

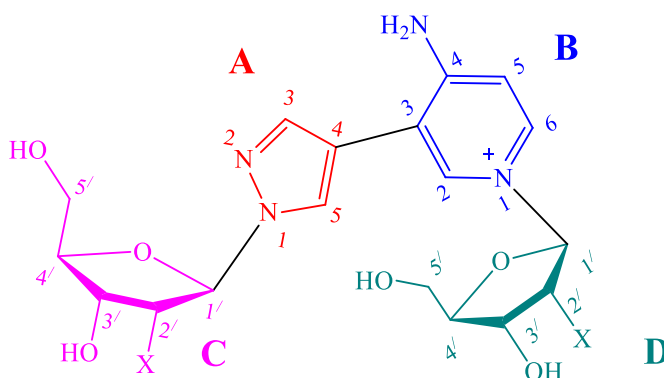
$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 303.3$  (N2A), 261.3 (N1B), 249.5 (N3B), 226.8 (N1A), 82.5 (6-NH<sub>2</sub>).

**1-(β-D-рибофуранозил)-3-(пиразол-4-ил)-4-аминопиридин (39)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 13.34$  (с, 1H, H-1A), 8.55 (уш.сигн., 0.72H, NH), 8.55 (д,  $J = 1.6$ , 1H, H-2B), 8.35 (дд,  $J = 1.5, 7.3$ , 1H, H-6B), 8.13 (уш.сигн., 0.84H, H-5A), 7.80 (уш.сигн., 0.85H, H-3A), 7.42 (уш.сигн., 0.62H, NH), 7.00 (д,  $J = 7.3$ , 1H, H-5B), 5.67 (д,  $J = 5.6$  1H, H-1'), 5.62 (д,  $J = 6.1$ , 1H, 2'-OH), 5.35 (д,  $J = 4.3$ , 1H, 3'-OH), 5.31 (т,  $J = 4.8$ , 1H, 5'-OH), 4.16 (м, 1H, H-2a'), 4.09 (м, 1H, H-3'), 4.08 (м, 1H, H-4'), 3.73 (м, 1H, Ha-5'), 3.66 (м, 1H, Hb-5').

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 157.17$  (C4B), 137.83 (C3A), 137.59 (C2B), 137.59 (C6B), 127.93 (C5A), 114.63 (C3B), 111.05 (C4A), 109.43 (C5B), 97.28 (C1'), 86.99 (C4'), 76.45 (C2'), 70.15 (C3'), 60.62 (C5').

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 179.6$  (N1B), 99.0 (NH<sub>2</sub>).

**Бис-рибозид (40)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.58$  (д,  $J = 1.7$ , 1H, H-2B), 8.53 (уш.сигн., 0.5H, NH), 8.39 (дд,  $J = 1.7, 7.4$ , 1H, H-6B), 8.29 (с, 1H, H-5A), 7.82 (с, 1H, H-3A), 7.41 (уш.сигн., 0.5H, NH), 6.98 (д,  $J = 7.3$ , 1H, H-5B), 6.15 (т,  $J = 6.3$  1H, H-1'-C), 6.10 (т,  $J = 6.4$ , 1H, H-1'-D), 5.41 (д,  $J = 4.0$ , 1H, 3'-OH-D), 5.28 (д,  $J = 4.3$ , 1H, 3'-OH-C), 5.24 (т,  $J = 4.9$ , 1H, 5'-OH-D), 4.82 (т,  $J = 5.5$ , 1H, 5'-OH-C), 4.40 (м, 1H, H-3'-C), 4.35 (м, 1H, H-3'-D), 3.97 (q,  $J = 3.3; 7.5$ , 1H, H-4'-D), 3.86 (м, 1H, H-4'-C), 3.68 (м, 1H, HC-5'-D), 3.63 (м, 1H, Hb-5'-D), 3.55 (м, 1H, Ha-5'-C), 3.46 (м, 1H, Hb-5'-C), 2.65 (м, 1H, Ha-2'-C), 2.42 (м, 1H, Ha-2'-D), 2.33 (м, 1H, Hb-2'-D), 2.28 (м, 1H, Hb-2'-C).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 156.95$  (C4B), 138.56 (C3A), 138.39 (C2B), 137.63 (C6B), 128.97 (C5A), 113.82 (C3B), 112.15 (C4A), 109.50 (C5B), 94.18 (C1'-D), 89.25 (C1'-C), 88.89 (C4'-D), 87.83 (C4'-C), 70.64 (C3'-D), 69.88 (C3'-C), 61.95 (C5'-C), 60.70 (C5'-D), 41.92 (C2'-D), 39.94 (C2'-C).

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 303.4$  (N2A), 228.0 (N1A), 184.6 (N1B).

**Бис-2'-дезоксирибозид (41)**

$^1\text{H}$  ЯМР:  $\delta = 8.59$  (уш.сигн., 0.46 H, NH), 8.55 (д,  $J = 1.6$ , 1H, H-2B), 8.37 (дд,  $J = 7.6$ , 1H, H-6B), 8.33 (с, 1H, H-5A), 7.84 (с., 1H, H-3A), 7.47(уш.сигн., 0.59H, NH), 7.01 (д,  $J = 7.4$ , 1H, H-5B), 5.73 (д,  $J = 4.0$ , 1H, H-1'-C), 5.67 (д,  $J = 5.5$ , 1H, H-1'-D), 5.64 (уш.сигн., 0.77 H, 2'-OH-D), 5.41(уш.сигн.,1H, 2'-OH-C), 5.37 (уш.сигн., 1 H, 3'-OH-D), 5.33 (уш.сигн., 2 H, 5'-OH-D), 5.16

(уш.сигн., 1 Н, 3'-ОН-C), 4.85 (уш.сигн., 1 Н, 1 Н, 5'-ОН-C), 4.40 (м, 1 Н, Н-2'-C), 4.17 (м, 1 Н, Н-3'-C), 4.16 (м, 1 Н, Н-2'-D), 4.07 (м, 1Н, Н-3'-D), 4.08 (м, 1 Н, Н-4'-D), 3.94 (м, 1 Н, Н-4'-C), 3.73 (м, 1 Н, Ha -5'-D), 3.65 (м, 1 Н, Hb -5'-D), 3.64 (м, 1 Н, Ha -5'-C), 3.51 (м, 1 Н, Hb -5'-C).

$^{13}\text{C}$  ЯМР:  $\delta = 157.26$  (C4B), 138.90 (C3A), 138.2 (C2B), 137.68 (C6B), 129.28 (C5A), 114.06 (C3B), 112.08 (C4A), 109.64 (C5B), 97.14 (C1'-D), 93.66 (C1'-C), 86.95 (C4'-D), 84.98 (C4'-C), 76.33(C2'-D), 74.52 (C2'-C), 70.13 (C3'-D), 70.13 (C3'-C), 61.61 (C5'-C), 60.47 (C5'-D).

$^{15}\text{N}$  ЯМР:  $\delta = 225.1$  (N1A).

### 3.4 Молекулярное моделирование

Структура молекул флексимера, рибозидов и бисгликозида были сгенерированы и выполнена структурная оптимизация с использованием программного обеспечения HyperChem [126]. Алгоритм Алгоритм Полака – Рибьера (conjugate gradient) был использован для оптимизации молекулярной механики (условия завершения: среднеквадратическое значение (RMS) градиент 0.1 ккал/(Å·моль) *in vacuo*).

Исследования проводились на сервере докинга белков-лигандов SwissDock, основанном на EADock DSS [127, 128]. Анализ молекулярных структур и поиск конформаций по связанным данным докинга проводился с использованием программы UCCF Chimera [129]. Взаимодействия связывания белков-лигандов комплексов анализировали с использованием BIOVIA Discovery Studio.

Чтобы подтвердить результат стыковки, использовали метод «выбора позы» для повторной стыковки 7-дезагипоксантина с активным центром (в мономере А) PNP *E. coli* [130]. Значения среднеквадратичного отклонения положений атомов (RMSD), позы стыковки, точности и охвата контактов сравнивали с сокристаллизованной структурой. RMSD координат атомов между двумя молекулами рассчитывали с использованием системы молекулярной графики PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5, Schrodinger, LLC. Полученное значение имеет допустимый диапазон стыковки  $\text{RMSD} < 1.5 \text{ \AA}$  [131].  $\text{RMSD} = 0.453 \text{ \AA}$ .

#### 4 Выводы

В результате выполнения серии экспериментальных работ получены следующие основные результаты:

- 4.1. 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'-дезокси-, рибо-, арабинозилрования. Оптимизированы методы ферментативного синтеза производных первой серии и получена серия из одиннадцати новых модифицированных нуклеозидов и углеводными остатками трех типов (рибоза, 2-дезоксирибоза и арабиноза) (**Серия I**). Проведено изучение противовирусной активности шести синтезированных нуклеозидов на моделях вируса простого герпеса 1-го типа (эталонный штамм ВПГ-1/L<sub>2</sub>), а также штамма ВПГ-1/L<sub>2</sub>/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 (ИД<sub>50</sub> = 37.11 мкМ).
- 4.2. 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 арсенолиза исходного рибозида с целью упрощения состава реакционных смесей и выделения целевых нуклеозидов. Исследована противоопухолевая активность (в отношении лейкомиической моноцитарной лимфомы человека линия U937) двенадцати синтезированных нуклеозидов Серии II. Для сериламидного аналога **12b** показано наличие антипролиферативной активности с IC<sub>50</sub> = 16 мкМ, что сопоставимо с активностью препарата сравнения неларабина (IC<sub>50</sub> = 3.3 мкМ).
- 4.3. 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-дезоксирибоза). Впервые наработаны и охарактеризованные минорные соединения, являющиеся региоизомерами реакции трансгликозилрования и продуктами бис-гликозилрования гетероциклического основания 4-(4-аминопиридин-3-ил)-1H-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 противовирусная 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-аминопиримидин-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 литературы**

1. Jordheim L. P. et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases //Nature reviews Drug discovery. – 2013. – Т. 12. – №. 6. – С. 447-464.
2. de Clercq E. Milestones in the discovery of antiviral agents: nucleosides and nucleotides //Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2012. – Т. 2. – №. 6. – С. 535-548.
3. Mikhailopulo I. A., Miroshnikov A. I. New trends in nucleoside biotechnology //Acta Naturae (англоязычная версия). – 2010. – Т. 2. – №. 2 (5). – С. 36-58.
4. Rosemeyer H. The chemodiversity of purine as a constituent of natural products //Chemistry & biodiversity. – 2004. – Т. 1. – №. 3. – С. 361-401.
5. Saenger W. Structure and function of nucleosides and nucleotides //Angewandte Chemie International Edition in English. – 1973. – Т. 12. – №. 8. – С. 591-601.
6. Giuliani A. L., Sarti A. C., Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules //Immunology letters. – 2019. – Т. 205. – С. 16-24.
7. Uddin M. B., Wang Z., Yang C. Dysregulations of functional RNA modifications in cancer, cancer stemness and cancer therapeutics //Theranostics. – 2020. – Т. 10. – №. 7. – С. 3164.
8. S Drenichev M., E Oslovsky V., N Mikhailov S. Cytokinin Nucleosides-Natural compounds with a unique spectrum of biological activities //Current topics in medicinal chemistry. – 2016. – Т. 16. – №. 23. – С. 2562-2576.
9. Raetz C. R. H., Kennedy E. P. Function of cytidine diphosphate-diglyceride and deoxycytidine diphosphate-diglyceride in the biogenesis of membrane lipids in Escherichia coli //Journal of Biological Chemistry. – 1973. – Т. 248. – №. 3. – С. 1098-1105.
10. Galmarini C. M., Mackey J. R., Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies //Leukemia. – 2001. – Т. 15. – №. 6. – С. 875-890.
11. Mackey J. R. et al. Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance //Drug Resistance Updates. – 1998. – Т. 1. – №. 5. – С. 310-324
12. Eriksson S., Wang L. The role of the cellular deoxynucleoside kinases in activation of nucleoside analogs used in chemotherapy //Recent advances in nucleosides: chemistry and chemotherapy. – Elsevier, 2002. – С. 455-475.
13. Lien E. J. et al. Novel and unusual nucleosides as drugs //Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques. – 1997. – С. 195-232.
14. Rautio J. et al. Prodrugs: design and clinical applications //Nature reviews Drug discovery. – 2008. – Т. 7. – №. 3. – С. 255-270.
15. N'Da D. D. Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs //Molecules. – 2014. – Т. 19. – №. 12. – С. 20780-20807.

16. Li F., Maag H., Alfredson T. Prodrugs of nucleoside analogues for improved oral absorption and tissue targeting //Journal of pharmaceutical sciences. – 2008. – T. 97. – №. 3. – C. 1109-1134.
17. Han S. et al. Lipophilic conjugates of drugs: a tool to improve drug pharmacokinetic and therapeutic profiles //Pharmaceutical Research. – 2021. – T. 38. – №. 9. – C. 1497-1518.
18. Zhang Y. et al. Current prodrug strategies for improving oral absorption of nucleoside analogues //Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2014. – T. 9. – №. 2. – C. 65-74.
19. De Clercq E. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years //Reviews in medical virology. – 2009. – T. 19. – №. 5. – C. 287-299.
20. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US). LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury. – National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012.
21. Seley-Radtke K. L., Yates M. K. 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. – T. 154. – C. 66-86.
22. Yates M. K., Seley-Radtke K. L. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold //Antiviral research. – 2019. – T. 162. – C. 5-21.
23. Kotra V. et al. Anti-SARS-CoV-2 Biotherapeutics and Chemotherapeutics: An Insight into Product Specifications and Marketing Dynamics //Progress In Microbes & Molecular Biology. – 2022. – T. 5. – №. 1.
24. Robak T. et al. Purine nucleoside analogs as immunosuppressive and antineoplastic agents: mechanism of action and clinical activity //Current medicinal chemistry. – 2006. – T. 13. – №. 26. – C. 3165-3189.
25. Robak T., Robak P. Purine nucleoside analogs in the treatment of rarer chronic lymphoid leukemias //Current pharmaceutical design. – 2012. – T. 18. – №. 23. – C. 3373-3388.
26. Shelton J. et al. Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs //Chemical reviews. – 2016. – T. 116. – №. 23. – C. 14379-14455.
27. Tokarenko A. Novel modified nucleosides with antiviral or cytostatic activity. – 2021.
28. Pearson D. C. et al. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease: a meta-analysis //Annals of internal medicine. – 1995. – T. 123. – №. 2. – C. 132-142.
29. Galmarini C. M., Mackey J. R., Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment //The lancet oncology. – 2002. – T. 3. – №. 7. – C. 415-424.
30. Secrist III J. A. Nucleosides as anticancer agents: from concept to the clinic //Nucleic Acids Symposium Series. – Oxford University Press, 2005. – T. 49. – №. 1. – C. 15-16.



31. Elion G. B. The purine path to chemotherapy //Bioscience Reports. – 1989. – T. 9. – C. 509-529.
32. Robak P., Robak T. Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias //Cancer treatment reviews. – 2013. – T. 39. – №. 8. – C. 851-861.
33. Niu G., Tan H. Nucleoside antibiotics: biosynthesis, regulation, and biotechnology //Trends in microbiology. – 2015. – T. 23. – №. 2. – C. 110-119.
34. Isono K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis //The Journal of antibiotics. – 1988. – T. 41. – №. 12. – C. 1711-1739.
35. Thomson J. M., Lamont I. L. Nucleoside analogues as antibacterial agents //Frontiers in microbiology. – 2019. – T. 10. – C. 952.
36. Baer H. P. Cytotoxic nucleosides and parasitic diseases: a new therapeutic approach //Annals of Saudi Medicine. – 1989. – T. 9. – №. 6. – C. 570-575.
37. Yu L. et al. Efficient biosynthesis of nucleoside cytokinin angustmycin A containing an unusual sugar system //Nature Communications. – 2021. – T. 12. – №. 1. – C. 6633.
38. Mittelman A., Evans J. T., Chheda G. B. Cytokinins as chemotherapeutic agents //Annals of the New York Academy of Sciences. – 1975. – T. 255. – №. 1. – C. 225-234.
39. Jacobson K. A. et al. Historical and current adenosine receptor agonists in preclinical and clinical development //Frontiers in cellular neuroscience. – 2019. – C. 124.
40. Chen J. F., Eltzhig H. K., Fredholm B. B. Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges? //Nature reviews Drug discovery. – 2013. – T. 12. – №. 4. – C. 265-286.
41. Périgaud C., Gosselin G., Imbach J. L. Nucleoside analogues as chemotherapeutic agents: a review //Nucleosides & nucleotides. – 1992. – T. 11. – №. 2-4. – C. 903-945.
42. Agrofoglio L. et al. Synthesis of carbocyclic nucleosides //Tetrahedron. – 1994. – T. 50. – №. 36. – C. 10611-10670.
43. Marquez V. E., Lim M. I. Carbocyclic nucleosides //Medicinal Research Reviews. – 1986. – T. 6. – №. 1. – C. 1-40.
44. Gumina G., Song G. Y., Chu C. K. L-Nucleosides as chemotherapeutic agents //FEMS microbiology letters. – 2001. – T. 202. – №. 1. – C. 9-15.
45. Clercq E. D. Three decades of antiviral drugs //Nature Reviews Drug Discovery. – 2007. – T. 6. – №. 12. – C. 941-941.
46. Clercq E. D. The design of drugs for HIV and HCV //Nature reviews Drug discovery. – 2007. – T. 6. – №. 12. – C. 1001-1018.
47. McGaraughty S. et al. Anticonvulsant and antinociceptive actions of novel adenosine kinase inhibitors //Current topics in medicinal chemistry. – 2005. – T. 5. – №. 1. – C. 43-58.
48. Iglesias L. E. et al. Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs //Biotechnology advances. – 2015. – T. 33. – №. 5. – C. 412-434.

49. Chu C. K. Recent advances in nucleosides: chemistry and chemotherapy. – 2002. – C. 91-147.
50. Alexander P., Kucera G., Pardee T. S. Improving nucleoside analogs via lipid conjugation: Is fatter any better? //Critical reviews in oncology/hematology. – 2016. – T. 100. – C. 46-56.
51. Sugawara M. et al. Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2 //Journal of pharmaceutical sciences. – 2000. – T. 89. – №. 6. – C. 781-789.
52. Pradere U. et al. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs //Chemical reviews. – 2014. – T. 114. – №. 18. – C. 9154-9218.
53. Baroud M. et al. The evolution of nucleosidic analogues: self-assembly of prodrugs into nanoparticles for cancer drug delivery //Nanoscale Advances. – 2021. – T. 3. – №. 8. – C. 2157-2179.
54. Vorbrüggen H., Ruh-Pohlenz C. Handbook of nucleoside synthesis. – John Wiley & Sons, 2001. – T. 60.
55. Kaspar F. et al. Route efficiency assessment and review of the synthesis of  $\beta$ -nucleosides via N-glycosylation of nucleobases //Green Chemistry. – 2021. – T. 23. – №. 1. – C. 37-50.
56. Iwamura H., Miyakado M., Hashizume T. Synthesis of guanine nucleosides by fusion, and a mechanistic aspect of the reaction //Carbohydrate Research. – 1973. – T. 27. – №. 1. – C. 149-156
57. Diekmann E., Friedrich K., Fritz H. G. Didesoxy-Ribonucleoside durch Schmelzkondensation //Journal für Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung. – 1993. – T. 335. – №. 5. – C. 415-424.
58. Lehmkuhl F. A., Witkowski J. T., Robins R. K. Synthesis of 1, 2, 3-triazole nucleosides via the acid catalyzed fusion procedure //Journal of Heterocyclic Chemistry. – 1972. – T. 9. – №. 6. – C. 1195-1201.
59. Witkowski J. T. et al. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides //Journal of medicinal chemistry. – 1972. – T. 15. – №. 11. – C. 1150-1154.
60. Fischer E., Fischer E., Helferich B. Synthetische glucoside der purine. – Springer Berlin Heidelberg, 1922. – C. 137-162.
61. Davoll J., Lowy B. A. A New Synthesis of Purine Nucleosides. The Synthesis of Adenosine, Guanosine and 2,6-Diamino-9- $\beta$ -D-ribofuranosylpurine //Journal of the American Chemical Society. – 1951. – T. 73. – №. 4. – C. 1650-1655.
62. Kazimierczuk Z. et al. Synthesis of 2'-deoxytubercidin, 2'-deoxyadenosine, and related 2'-deoxynucleosides via a novel direct stereospecific sodium salt glycosylation procedure //Journal of the American Chemical Society. – 1984. – T. 106. – №. 21. – C. 6379-6382.
63. Niedballa U., Vorbrüggen H. A general synthesis of pyrimidine nucleosides //Angewandte Chemie International Edition in English. – 1970. – T. 9. – №. 6. – C. 461-462.

64. Vorbrueggen H. Adventures in silicon-organic chemistry //Accounts of chemical research. – 1995. – T. 28. – №. 12. – C. 509-520.
65. Vorbrüggen H., Bennua B. New simplified nucleoside synthesis //Tetrahedron Letters. – 1978. – T. 19. – №. 15. – C. 1339-1342.
66. Framski G. et al. A reinvestigated mechanism of ribosylation of adenine under silylating conditions //Tetrahedron. – 2006. – T. 62. – №. 43. – C. 10123-10129.
67. Vorbrüggen H., Krolukiewicz K., Bennua B. Nucleoside syntheses, XXIII) Nucleoside synthesis with trimethylsilyl triflate and perchlorate as catalysts //Chemische Berichte. – 1981. – T. 114. – №. 4. – C. 1234-1255.
68. Zou R. et al. Synthesis and antiviral evaluation of certain disubstituted benzimidazole ribonucleosides //Journal of medicinal chemistry. – 1996. – T. 39. – №. 18. – C. 3477-3482.
69. Laponi M. J. et al. New developments in nucleoside analogues biosynthesis: A review //Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2016. – T. 133. – C. 218-233.
70. Fresco-Taboada A. et al. New insights on nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases: a versatile biocatalyst for one-pot one-step synthesis of nucleoside analogs //Applied microbiology and biotechnology. – 2013. – T. 97. – C. 3773-3785.
71. MikhAllopulo I. A., MIroshnikov A. I. Some recent findings in the biotechnology of biologically important nucleosides //Biotechnologia Acta. – 2013. – T. 6. – №. 4. – C. 063-077.
72. Cosgrove S. C., Miller G. J. Advances in biocatalytic and chemoenzymatic synthesis of nucleoside analogues //Expert Opinion on Drug Discovery. – 2022. – T. 17. – №. 4. – C. 355-364.
73. Cosgrove S. C., Miller G. J. Advances in biocatalytic and chemoenzymatic synthesis of nucleoside analogues //Expert Opinion on Drug Discovery. – 2022. – T. 17. – №. 4. – C. 355-364.
74. Fresco-Taboada A. et al. Development of an immobilized biocatalyst based on Bacillus psychrosaccharolyticus NDT for the preparative synthesis of trifluridine and decytabine //Catalysis Today. – 2016. – T. 259. – C. 197-204.
75. Armstrong S. R. et al. Crystal structures of nucleoside 2-deoxyribosyltransferase in native and ligand-bound forms reveal architecture of the active site //Structure. – 1996. – T. 4. – №. 1. – C. 97-107.
76. Li J. et al. Establishment of a high throughput-screening system for nucleoside deoxyribosyltransferase II mutant enzymes with altered substrate specificity //Journal of bioscience and bioengineering. – 2019. – T. 128. – №. 1. – C. 22-27.
77. Cruz G. et al. Rational design of a thermostable 2'-deoxyribosyltransferase for nelarabine production by prediction of disulfide bond engineering sites //International journal of molecular

- sciences. – 2022. – T. 23. – №. 19. – C. 11806.
78. Патент № CN101092441A Method for synthesizing nelarabine. 2007.
  79. Shen C. et al. Practical synthesis of fludarabine and nelarabine //Synthesis. – 2020. – T. 52. – №. 03. – C. 417-423.
  80. Chinchilla R., Nájera C. The Sonogashira reaction: a booming methodology in synthetic organic chemistry //Chemical reviews. – 2007. – T. 107. – №. 3. – C. 874-922.
  81. Патент № EP0294114B1. Antiviral compounds. 2008.
  82. Konstantinova I. D. et al. A chemo-enzymatic synthesis of  $\beta$ -D-arabinofuranosyl purine nucleosides //Synthesis. – 2011. – C. 1555-1560.
  83. MacDonald D. L. A new route to glycosyl phosphates //The Journal of Organic Chemistry. – 1962. – T. 27. – №. 3. – C. 1107-1109.
  84. Kobayashi M. The arabinofuranoside method, a convenient substitute of the fucofuranoside method for determining the absolute configuration of the secondary alcohols //Tetrahedron. – 2002. – T. 58. – №. 46. – C. 9365-9371.
  85. Amritkar V. et al. Engineering Staphylococcal Protein A for high-throughput affinity purification of monoclonal antibodies //Biotechnology Advances. – 2020. – T. 44. – C. 107632.
  86. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects //Pharmacology & therapeutics. – 2000. – T. 88. – №. 3. – C. 349-425.
  87. Krenitsky T. A. et al. Imidazo [4,5-c] pyridines (3-deazapurines) and their nucleosides as immunosuppressive and antiinflammatory agents //Journal of medicinal chemistry. – 1986. – T. 29. – №. 1. – C. 138-143.
  88. Roivainen J. et al. An enzymatic transglycosylation of purine bases //Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. – 2007. – T. 26. – №. 8-9. – C. 905-909.
  89. Mikhailopulo I. A. Biotechnology of nucleic acid constituents-State of the art and perspectives //Current Organic Chemistry. – 2007. – T. 11. – №. 4. – C. 317-335.
  90. Stachelska-Wierzchowska A. et al. Enzymatic synthesis of highly fluorescent 8-Azapurine ribosides Using a purine nucleoside phosphorylase reverse reaction: Variable ribosylation sites //Molecules. – 2013. – T. 18. – №. 10. – C. 12587-12598.
  91. Kharitonova M. I. et al. Chemoenzymatic Synthesis and Antiherpes Activity of 5-Substituted 4, 6-Difluorobenzimidazoles Ribo-and 2'-Deoxyribonucleosides //Synthesis. – 2015. – C. 394-406.
  92. Kharitonova M. I. et al. Chemoenzymatic synthesis of modified 2'-deoxy-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosyl benzimidazoles and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1 //Synthesis. – 2017. – T. 49. – №. 05. – C. 1043-1052.
  93. Fateev I. V. et al. Recognition of artificial nucleobases by E. coli purine nucleoside

- phosphorylase versus its Ser90Ala mutant in the synthesis of base-modified nucleosides //Chemistry–A European Journal. – 2015. – T. 21. – №. 38. – C. 13401-13419.
94. Ye W. et al. Ethenoguanines undergo glycosylation by nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases at non-natural sites //PLoS One. – 2014. – T. 9. – №. 12. – C. e115082.
  95. Vichier Guerre S. et al. An expedient synthesis of flexible nucleosides through enzymatic glycosylation of proximal and distal fleximer bases //ChemBioChem. – 2020. – T. 21. – №. 10. – C. 1412-1417.
  96. Vichier-Guerre S. et al. An expedient synthesis of flexible nucleosides via a regiocontrolled enzymatic glycosylation of functionalized imidazoles //Organic & Biomolecular Chemistry. – 2017. – T. 15. – №. 38. – C. 8193-8203.
  97. Krenitsky T. A., Koszalka G. W., Tuttle J. V. Purine nucleoside synthesis: an efficient method employing nucleoside phosphorylases //Biochemistry. – 1981. – T. 20. – №. 12. – C. 3615-3621.
  98. Mao C. et al. 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.
  99. Koellner G. et al. Crystal structure of the ternary complex of E. coli purine nucleoside phosphorylase with formycin B, a structural analogue of the substrate inosine, and phosphate (sulphate) at 2.1 Å resolution //Journal of molecular biology. – 1998. – T. 280. – №. 1. – C. 153-166.
  100. dos Santos D. M. et al. Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase complexed with acyclovir //Biochemical and biophysical research communications. – 2003. – T. 308. – №. 3. – C. 553-559.
  101. Timofeev V. I. et al. Crystal structure of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase in complex with 7-deazahypoxanthine //Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications. – 2018. – T. 74. – №. 6. – C. 355-362.
  102. Bennett E. M. et al. Structural basis for substrate specificity of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase //Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278. – №. 47. – C. 47110-47118.
  103. Timofeev V. I. et al. Crystal structure of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase complexed with acyclovir //Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications. – 2018. – T. 74. – №. 7. – C. 402-409.
  104. Hassan A. E. A. 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.
  105. Oslovsky V. E. et al. Chemoenzymatic synthesis of cytokinins from nucleosides: Ribose as a

- blocking group //Organic & Biomolecular Chemistry. – 2018. – T. 16. – №. 12. – C. 2156-2163.
106. Matyugina E. S., Kochetkov S. N., Khandazhinskaya A. L. Synthesis and biological activity of aza and deaza analogues of purine nucleosides //Russian Chemical Reviews. – 2021. – T. 90. – №. 11. – C. 1454.
107. Konstantinova I. D. 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.
108. Smirnova O. S. et al. Biotechnological process for the preparation of an antiviral drug ribavirin analogues substituted on the amide group //FEBS JOURNAL. – 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA : WILEY-BLACKWELL, 2013. – T. 280. – C. 369-369.
109. Smirnova O. S. et al. Chemo-enzymatic synthesis of 5-substituted ribavirin analogs: Unexpected cooperative effect in the interaction of 5-alkyloxymethyl 1, 2, 4-triazol-3-carboxamides with E. coli purine nucleoside phosphorylase active site //Sustainable Chemistry and Pharmacy. – 2022. – T. 30. – C. 100881.
110. Konstantinova I. D. et al. Ribavirin: Biotechnological synthesis and effect on the reproduction of Vaccinia virus //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2004. – T. 30. – C. 553-560.
111. Mikhailopulo I. A. et al. Benzimidazoles in the reaction of enzymatic transglycosylation //Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. – 1995. – T. 14. – №. 3-5. – C. 477-480.
112. Konstantinova I. D. et al. Chemo-enzymatic synthesis and biological evaluation of 5,6-disubstituted benzimidazole ribo- and 2'-deoxyribonucleosides //Synthesis. – 2012. – C. 272-280.
113. Kharitonova M. I. et al. Chemoenzymatic Synthesis and Antiherpes Activity of 5-Substituted 4,6-Difluorobenzimidazoles Ribo- and 2'-Deoxyribonucleosides //Synthesis. – 2015. – C. 394-406.
114. Kharitonova M. I. 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.
115. Kharitonova M. I. 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.
116. Vichier Guerre S. et al. An expedient synthesis of flexible nucleosides through enzymatic glycosylation of proximal and distal fleximer bases //ChemBioChem. – 2020. – T. 21. – №. 10. – C. 1412-1417.
117. Chudinov M. V. Nucleoside analogs with fleximer nucleobase //Chemistry of heterocyclic compounds. – 2020. – T. 56. – C. 636-643.

118. Denisova A. O. et al. The Chemoenzymatic Synthesis of 2-Chloro- and 2-Fluorocordycepsins // *Synthesis*. – 2017. – T. 49. – №. 21. – C. 4853-4860.
119. Fateev I. V. 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.
120. Wempen I., Fox J. J. [11] Synthesis of nucleoside derivatives by conversion from preformed nucleosides // *Methods in Enzymology*. – Academic Press, 1967. – T. 12. – C. 76-93.
121. Schramm V. L. [13] Enzymatic transition-state analysis and transition-state analogs // *Methods in enzymology*. – Academic Press, 1999. – T. 308. – C. 301-355.
122. Kline P. C., Schramm V. L. Purine nucleoside phosphorylase. Catalytic mechanism and transition-state analysis of the arsenolysis reaction // *Biochemistry*. – 1993. – T. 32. – №. 48. – C. 13212-13219.
123. Schramm V. L. Enzymatic transition state theory and transition state analogue design // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – T. 282. – №. 39. – C. 28297-28300.
124. Konstantinova I. D., Fateev I. V., Miroshnikov A. I. The arsenolysis reaction in the biotechnological method of synthesis of modified purine  $\beta$ -D-arabinonucleosides // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2016. – T. 42. – C. 372-380.
125. Shirahama H. et al. Tautomerism of clitidine, a pyridine nucleoside from the poisonous mushroom *Clitocybe acromelalga* // *Heterocycles*. – 1998. – T. 2. – №. 47. – C. 661-664.
126. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling // *Biotechniques*. – 1993. – T. 14. – №. 6. – C. 1010-1013.
127. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS // *Journal of computational chemistry*. – 2011. – T. 32. – №. 10. – C. 2149-2159.
128. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS // *Nucleic acids research*. – 2011. – T. 39. – №. suppl\_2. – C. W270-W277.
129. Pettersen E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis // *Journal of computational chemistry*. – 2004. – T. 25. – №. 13. – C. 1605-1612.
130. Esipov R. S. et al. 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.
131. Hevener K. E. et al. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase // *Journal of chemical information and modeling*. – 2009. – T. 49. – №. 2. – C. 444-460.