

Берзина Мария Яновна

**Новые аналоги аденозина:
химико-ферментативный подход к получению**

Специальность: 1.4.9 Биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва, 2023 г

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

Научный руководитель: **Константинова Ирина Дмитриевна**, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории Биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений ИБХ РАН

Официальные оппоненты: **Хомутов Алексей Радиевич**, доктор химических наук, ФГБУН Институт Молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений
Есипов Дмитрий Станиславович, кандидат химических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоорганической химии, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (ИОХ РАН)

Защита состоится 20 декабря 2023 г. в 11.00

на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН, <https://www.ibch.ru>

Автореферат разослан _____
(дата)

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



Олейников
Владимир Александрович

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Задача по разработке новых аналогов аденозина, потенциально обладающих антипролиферативной, антибактериальной, противовирусной или агонистической по отношению к аденозиновым рецепторам активностью, до сих пор не решена. Проведенный комплекс химико-ферментативных синтезов позволил синтезировать четыре серии новых C2,N⁶-дизамещенных аналогов аденозина и получить первичные данные скрининга их биологической активности.

Цель работы и основные задачи исследования

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

Экспериментальные работы, выполняемые в рамках настоящей диссертационной работы, сфокусированы на:

- модификации гетероциклического пуринового основания по C2 и N⁶-положениям с получением 2,6-дизамещенных аналогов аденозина с применением методов классического химического синтеза; оптимизации условий синтеза, выделении продуктов и подтверждении структуры физико-химическими методами анализа;
- исследовании субстратной специфичности пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к полученным рибонуклеозидам, оптимизации условий ферментативного синтеза 2'-дезоксирибонуклеозидов, выделении продуктов и подтверждении структуры физико-химическими методами анализа;
- исследовании возможности ферментативного синтеза 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинозидов из полученных рибонуклеозидов;
- проведении ферментативного синтеза новых аналогов аденозина из модифицированных по N⁶-положению или по C2 и N⁶-положению аденинов, выделении продуктов и подтверждении структуры физико-химическими методами анализа;
- определении биологической активности полученных модифицированных аденозиновых рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

Научная новизна исследования заключается в разработке новых химико-ферментативных подходов к синтезу аналогов 2-хлор- и 2-амино-аденозина, замещенных по N⁶ атому остатками амидов хиральных аминокислот, линейных и разветвленных аминок спиртов, 4-замещенными триазол-1-илами. Полученные 4 серии нуклеозидов относятся по типу углеводного остатка к рибозидам, 2'-дезоксирибозидам и 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинозидам. Показано наличие высокой агонистической активности по отношению к аденозиновым A₁ рецепторам у нуклеозидов, имеющих остатки линейных и разветвленных аминок спиртов в N⁶-положении.

Впервые методом спектроскопии ЯМР доказано существование внутримолекулярной водородной связи N⁶CH...N7 в 2-хлор-N⁶-замещенных аналогах аденозина.

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

Личный вклад автора в представленной работе заключался в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертации. Автор разрабатывал методы синтеза новых

аналогов аденозина и методы внесения модификаций, проводил химический и ферментативный синтез, получал вещества в количествах, необходимых для изучения их физико-химических характеристик и биологических исследований, анализировал полученные данные: интерпретировал данные масс-спектров и одномерных и двумерных спектров ЯМР. Также автор участвовал в написании и подготовке к публикации статей и тезисов докладов на научных конференциях по результатам исследования. Работа выполнена в лаборатории Биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений ИБХ РАН. Исследования биологической активности аналогов аденозина проводились в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина и на кафедре Фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета.

Положения, выносимые на защиту

- 1) синтезированные 2-хлорзамещенные рибонуклеозиды с остатками амидов хиральных аминокислот и линейных/разветвленных аминспиртов в N⁶ положении аденозина являются частичными агонистами A₁ аденозиновых рецепторов; активность трех нуклеозидов, имеющих в структуре остатки серинола, аланинола и β-аминоизобутилового спирта, превосходит активность известного селективного агониста аденозиновых рецепторов типа A₁ 2-хлор-N⁶-циклопентиладенозина или близка к ней;
- 2) получены 2'-дезоксирибонуклеозиды N⁶-замещенного 2-хлораденина при помощи ферментативного синтеза из соответствующих рибонуклеозидов;
- 3) для проверки влияния типа заместителя при C2 аденина на агонистическую активность по отношению к аденозиновым рецепторам синтезированы рибозиды 2-Н-пурина и 2-аминопурина, замещенные остатками глицина и глицинглутаминовой кислоты в C6 положении основания;
- 4) показана принципиальная возможность биосинтеза новых аналогов клофарабина – 2'-дезокси-2'-фтор арабинозидов – из 2-хлорзамещенных аденозинов с остатками амидов хиральных аминокислот в N⁶ положении;
- 5) синтезированные C6-1,2,3-триазол-1-илзамещенные пуриновые рибонуклеозиды и 2'-дезоксирибонуклеозиды характеризуются большим стоксовым сдвигом (до 200 нм) в водно-ацетонитрильном растворе;
- 6) проведено исследование аномалии в спектрах ЯМР нуклеозидов 2-хлораденина: с использованием двумерной гетероядерной спектроскопии ЯМР впервые доказано наличие внутримолекулярной водородной связи между N7 атомом пурина и СН протоном заместителя при N⁶ атоме аденина, приводящее к образованию заторможенной структуры нуклеозида.

Апробация результатов и публикации

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 9 всероссийских и международных конференциях в формате устных и стендовых докладов, по теме работы было опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science, глава в книге и получен патент.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 193 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть, заключение, список сокращений и список использованной литературы. Материал проиллюстрирован 54 рисунками, 21 схемой и 19 таблицами. Библиографический указатель включает ссылки на 265 источников.

Основное содержание работы

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

Синтез нуклеозидов N-(пурин-6-ил)аминокислот и их производных представляет научный интерес, так как заместитель в виде аминокислоты по C6 положению пурина влияет на физиологическую и биологическую активность соединения.

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

Химическую модификацию пуриновых гетероциклов целесообразно проводить при помощи нуклеофильного ароматического замещения, которое при использовании в качестве хорошей уходящей группы хлора в шестом положении гетероцикла протекает в мягких условиях. Благодаря наличию электроноакцепторного атома хлора в С2 пуринового гетероцикла упрощается реакция нуклеофильного ароматического замещения по шестому атому углерода. В качестве ключевого интермедиата для синтеза новых пуриновых рибонуклеозидов был выбран защищенный по гидроксильным группам углеводного остатка 2,6-дихлор-9-(2,3,5-три-*O*-ацетил- β -*D*-рибофуранозил)пурин **4**, который получали трехстадийным синтезом из природного гуанозина **1** (Схема 1).

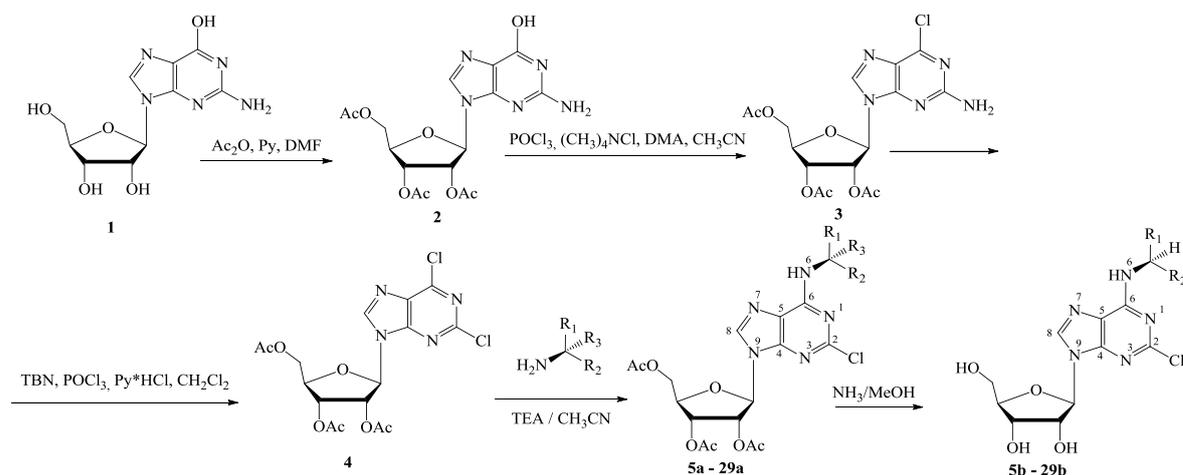


Схема 1 – Общая схема синтеза 2,6-дихлор-9-(2,3,5-три-*O*-ацетил- β -*D*-рибофуранозил)пурина **4** и рибозидов **5a–29a**: нуклеофильное замещение в цикле

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

Также для планируемого изучения агонистической активности по отношению к аденозиновым рецепторам получали производные бета-аланина и аминокислот как линейной структуры (этаноламин, бутаноламин, гексаноламин), так и разветвленной (бета-аминоизобутиловый спирт), а также аминокислот, являющихся восстановленными формами аминокислот (аланинол, валинол, серинол), и их аналогов (циклогексил-аланинол). Дополнительно был проведен синтез известного агониста аденозиновых рецепторов типа A₁ – 2-хлор-N⁶-циклопентил аденозина (ССРА).

Для конъюгирования с нуклеозидом **4** использовались гидрохлориды метиловых эфиров аминокислот, хорошо растворимые в органических растворителях. Исследовались условия проведения реакции нуклеофильного замещения в различных растворителях (ДМФА, ацетонитрил, диоксан, ТГФ). В ДМФА лучше растворялись компоненты реакционных смесей, и реакция протекала быстрее. Однако, при удалении из реакционной смеси более высококипящего ДМФА наблюдалась рацемизация *L*-аминокислот (по данным LC-MS), поэтому предпочтение было отдано ацетонитрилу.

Была синтезирована серия нуклеозидов 2-хлораденозина с остатками хиральных аминокислот, аминокислот и их аналогов в С6 положении гетероциклического основания (Схема 1, Таблица 1). Реакции протекали быстро и селективно. По данным спектров ЯМР, не было обнаружено побочных продуктов замещения хлора в С2 положении пуринового гетероцикла, а также побочных продуктов нуклеофильного замещения по боковым гидроксигруппам аминокислот серина, треонина или аминокислот. В случае образования *D*-аминокислотных производных по данным LC-MS наблюдались бы два близкодущих пика *L*- и *D*-изомеров одинаковой массы, но такого явления зафиксировано не было.

Таблица 1 – Первый этап синтеза: нуклеофильное замещение в цикле

Соед.	Заместитель при С6	R ₁	R ₂	R ₃	Выход, %	
5a	Gly	H	COOCH ₃	H	95	
6a	<i>L</i> -Ala	CH ₃			90	
7a	<i>L</i> -Val	CH(CH ₃)CH ₃			89	
8a	<i>L</i> -Leu	CH ₂ CH(CH ₃) ₂			79	
9a	<i>L</i> -Ile	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃			98	
10a	<i>L</i> -Ser	CH ₂ OH			95	
11a	<i>L</i> -Thr	CH(OH)CH ₃			96	
12a	<i>L</i> -Met	CH ₂ CH ₂ SCH ₃			86	
13a	<i>L</i> -SMe-Cys	CH ₂ SCH ₃			83	
14a	<i>L</i> -Phe	CH ₂ C ₆ H ₅			49	
15a	<i>L</i> -Tyr	CH ₂ C ₆ H ₄ OH			97	
16a	<i>L</i> -Trp	CH ₂ (β-индолил)			90	
17a	<i>L</i> -Lys	(CH ₂) ₄ NH ₂			60	
18a	Этаноламин	CH ₂ OH			H	94
19a	Бутаноламин	(CH ₂) ₃ OH				96
20a	Гексаноламин	(CH ₂) ₅ OH				63
21a	β-Ala	CH ₂ COOCH ₃				88
22a	N ^ε - <i>L</i> -Lys	(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)COOCH ₃ (<i>S</i>)	87			
23a	<i>D</i> -Ser	COOCH ₃	CH ₂ OH	94		
24a	<i>S</i> -Аланинол	CH ₃		70		
25a	<i>S</i> -Валинол	CH(CH ₃) ₂		98		
26a	Циклогексил- <i>S</i> -аланинол	CH ₂ C ₆ H ₁₁		95		
27a	Серинол	CH ₂ OH		96		
28a	ССРА	(CH ₂ CH ₂) ₂		95		
29a	β-NH ₂ -изобутиловый спирт	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	67	

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

1.2. Получение аналогов 2-хлораденозина: аммонолиз ацетильных защит

Для удаления ацетильных защит с остатка рибозы и аммонолиза метиловых эфиров аминокислот полученные триацетаты рибозидов **5a–29a** обрабатывали насыщенным раствором аммиака в метаноле при пониженной температуре (4 °C) (Схема 1), получая нуклеозиды **5b–29b** (Таблица 2).

Таблица 2 – Второй этап синтеза: аммонолиз ацетильных защит

Соединение	Заместитель при С6 положении	R ₁	R ₂	R ₃	Выход, %	
5b	Gly	H	CONH ₂	H	95	
6b	<i>L</i> -Ala	CH ₃			93	
7b	<i>L</i> -Val	CH(CH ₃)CH ₃			90	
8b	<i>L</i> -Leu	CH ₂ CH(CH ₃) ₂			90	
9b	<i>L</i> -Ile	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃			8	
10b	<i>L</i> -Ser	CH ₂ OH			83	
11b	<i>L</i> -Thr	CH(OH)CH ₃			93	
12b	<i>L</i> -Met	CH ₂ CH ₂ SCH ₃			93	
13b	<i>L</i> -S-Me-Cys	CH ₂ SCH ₃			80	
14b	<i>L</i> -Phe	CH ₂ C ₆ H ₅			66	
15b	<i>L</i> -Tyr	CH ₂ C ₆ H ₄ OH			94	
16b	<i>L</i> -Trp	CH ₂ (β-индолил)			71	
17b	<i>L</i> -Lys	(CH ₂) ₄ NH ₂			53	
18b	Этаноламин	CH ₂ OH			H	53

19b	Бутаноламин	(CH ₂) ₃ OH			87
20b	Гексаноламин	(CH ₂) ₅ OH			79
21b	β-Ala	CH ₂ COOCH ₃			96
22b	N ^ε -Lys	(CH ₂) ₃ CH(NH ₂) CONH ₂ (S)			89
23b	D-Ser	CONH ₂	CH ₂ OH		90
24b	S-Аланинол	CH ₃			95
25b	S-Валинол	CH(CH ₃) ₂			49
26b	Циклогексил-S-аланинол	CH ₂ C ₆ H ₁₁			82
27b	Серинол	CH ₂ OH			93
28b	ССРА	(CH ₂ CH ₂) ₂			63
29b	β-NH ₂ -изобутиловый спирт	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	84

Интересно отметить, что в спектрах ЯМР полученных 2-хлор-N⁶-замещенных производных аденозина была обнаружена вторая форма на уровне 11–33% от основной. Вещества были гомогенны по данным ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Это необычное явление более подробно описано в разделе «Изучение аномалии в спектрах ЯМР аналогов аденозина». Там же приведена теория возникновения второй формы и описаны подтверждающие ее эксперименты.

1.3. Определение цитотоксической активности аналогов аденозина *in vitro*

Были изучены токсикологические характеристики веществ. Исследования проводились на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета. В результате изучения цитотоксичности соединений в МТТ-тесте на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) была рассчитана величина LC₅₀ (концентрация, летальная для 50% клеток) (Таблица 3). Цитотоксическое действие для всех изученных соединений, включая вещество сравнения ССРА **28b**, было выше максимальной изученной концентрации (LC₅₀ >> 100 мкмоль/л), а для производных **15b** и **29b** LC₅₀ составляла 19.7 и 114.4 мкМ, соответственно.

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

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

Цитотоксическая активность полученных рибозидов была также исследована на линии клеток рака толстой кишки человека LS174Т в лаборатории клеточного иммунитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ. В исследование цитотоксической активности были включены производные 2-хлораденозина, содержащие остатки глицина **5b**, L-серина **10b**, L-треонина **11b** и L-тирозина **15b** по С6 положению пурина. Максимально допустимая концентрация тестируемых соединений не превышала 100 мкМ. Результаты проведенных испытаний на клетках линии LS174Т показали, что соединения можно оценить как неактивные, так как значение IC₅₀ для всех соединений близко или превышает 100 мкМ.

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

Поскольку аналоги аденозина могут выступать как селективные агонисты или антагонисты аденозиновых рецепторов (AR) различных типов, ряд соединений был передан на исследование агонистической активности по отношению к аденозиновым рецепторам типа A₁ (A₁AR). Исследования проводились на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета. Эксперименты *in vitro* выполнялись на валидированной экспериментальной модели A₁AR-зависимого изменения ритма сокращений изолированных предсердий мышей, в тканях которых с высокой плотностью экспрессированы A₁AR. Полученные нуклеозиды являются структурными аналогами известного агониста A₁AR 2-хлораденозина **30**, который также был добавлен в исследование. Гуанозин был добавлен в исследование как известный слабый агонист AR. Также исследовались аналоги гуанозина: 6-метоксигуанозин **31**, неларабин (2-амино-9-β-D-арабинофуранозил-6-метоксипурин) **32** и 2-амино-6-хлор-9-β-D-рибофуранозилпурин **33** (Рисунок 1).

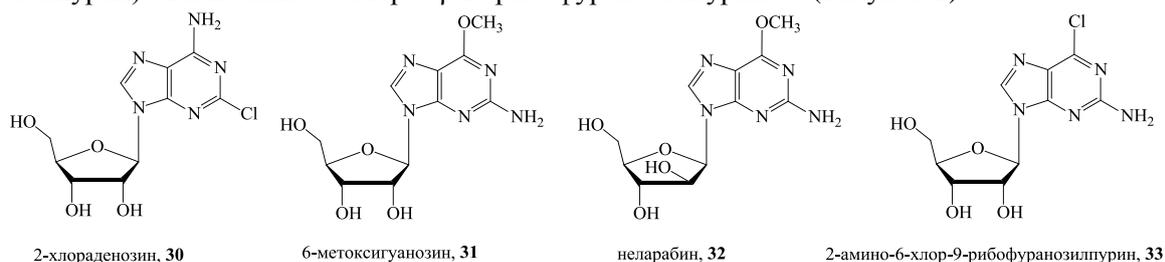


Рисунок 1 – Нуклеозиды, добавленные в биологические испытания в качестве контроля для проверки модели: известный агонист A₁AR **30** и аналоги гуанозина **31–33**

На первом этапе исследования в кювету, содержащую препарат предсердия, вводили аденозин или тестируемые соединения в концентрации 10 мкМ. Наблюдалось изменение хронотропизма изолированных предсердий, работающих в собственном ритме (без стимуляции). Уменьшение частоты сокращения предсердий характерно для стимуляции A₁AR (Таблица 4). Влияние исследуемых соединений проводилось в две серии независимых опытов.

Таблица 4 – Влияние тестируемых соединений на хронотропизм изолированных предсердий мыши в концентрации 10 мкМ (M±SEM) в двух сериях проведенных исследований

Соед.	МНН*/нуклеозид или заместитель при С6	Изменение хронотропизма, %	Соед.	МНН*/нуклеозид или заместитель при С6	Изменение хронотропизма, %
Серия 1			Серия 2		
30	2-Хлораденозин	84.5±1.41	18b	Этаноламин	95.6±4.1
24b	S-Аланинол	83.1±3.65	27b	Серинол	95.2±4.4
29b	β-NH ₂ -изобутиловый спирт	73.2±6.25	28b	ССРА	94.9±3.2
	Аденозин	64.7±2.66	30	2-Хлораденозин	86.9±3.2
10b	L-Ser	37.4±13.25	19b	Бутаноламин	69.0±13.2
7b	L-Val	32.4±6.96	21b	β-Ala	59.5±6.5
31	6-О-метилгуанозин	31.6±2.75	20b	Гексаноламин	53.6±6.6
15b	L-Тур	22.0±4.34	17b	L-Lys	48.6±6.7
23b	D-Ser	17.8±3.12		Аденозин	46.4±6.8
5b	Gly	15.9±2.21	13b	L-SMeCys	46.0±4.2
12b	L-Met	14.9±2.68	8b	L-Leu	25.0±5.0
33	2-Амино-6-хлор-9-β-D-рибофуранозилпурин	10.6±4.11	11b	L-Thr	16.1±3.5
6b	L-Ala	7.8±4.91			
22b	Ne-Lys	6.4±2.06			
32	Неларабин	3.4±1.89			
	Гуанозин	2.4±1.45			

*МНН – международное непатентованное название препаратов

Известные агонисты аденозиновых рецепторов ССРА **28b** и 2-хлораденозин **30** проявили высокую стимулирующую способность, значительно превышающую таковую для аденозина. Производные бета-аланина **21b**, L-лизина **17b** и β-аминоизобутилового спирта **29b** оказывали относительно слабое стимулирующее влияние на аденозиновые A₁ рецепторы. A₁AR-стимулирующая активность других производных амидов аминокислот была заметно ниже и не превышала активность аденозина. Для гуанозина и его производных **31–33** стимулирующая A₁AR активность была значительно ниже, чем у

производных аденозина, что подтверждает адекватность модели, использованной в исследованиях. Для производных восстановленных аналогов аминокислот – аминокспиртов этаноламина **18b** (восстановленная форма глицина) и серинола **27b** (восстановленная форма серина) показана значительная стимулирующая активность, превосходящая активность известного агониста А₁ ССРА **28b**. С увеличением длины неразветвленной цепи аминокспиртового заместителя (этанол **18b** – бутанол **19b** – гексанол **20b**) отмечается снижение активности, однако она все еще превосходит активность аденозина. Введение в молекулу аденозина аминокспиртового заместителя по С6 положению основания увеличивало активность, причем производные представителей восстановленных форм аминокислот, обладающие высокой гидрофильностью, оказались лучшими агонистами аденозиновых рецепторов типа А₁, чем известные агонисты.

Учитывая косвенный характер применяемой тест-системы (измерение хронотропного эффекта изолированных предсердий мыши), для подтверждения стимулирующей активности А₁AR наиболее активных соединений было изучено их действие в присутствии антагониста А₁AR DPCPX. В кювету предварительно вводили селективный антагонист А₁AR DPCPX в концентрации 0.1 мкМ. После трехминутной инкубации добавляли аденозин или испытуемые соединения в концентрации 10 мкМ. Оценивали изменения хронотропизма изолированных препаратов предсердий мышей, работающих в собственном ритме (без стимуляции) (Таблица 5). Стимулирующая А₁AR активность веществ заметно уменьшалась или пропадала. Это свидетельствует о том, что исследуемые вещества проявляли свойства агонистов А₁AR.

Таблица 5 – Влияние исследуемых соединений в концентрации 10 мкМ на хронотропизм изолированных предсердий мыши при предварительном введении антагониста А₁AR DPCPX (0.1 мкМ)

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

По результатам проведённого скрининга были выявлены наиболее активные соединения: производные аланинола **24b**, β-аминоизобутилового спирта **29b**, серинола **27b** и этаноламина **18b**. Для данных соединений и веществ сравнения (2-хлораденозин **30**, ССРА **28b**, аденозин) было проведено дозозависимое исследование активности в концентрациях 0.0001–100 мкмоль/л в двух сериях независимых опытов. Полученные данные представлены (Таблица 6).

Таблица 6 – Средняя полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀) и отрицательный десятичный логарифм полумаксимальной эффективной концентрации (pEC₅₀) А₁-стимулирующего действия наиболее активных соединений, тестируемых в концентрациях 0.0001–10 мкмоль/л. Данные веществ, полученные в двух сериях опытов, приведены через косую черту

Соединение (заместитель при С6)	EC ₅₀ , мкмоль/л	pEC ₅₀
24b (<i>S</i> -аланинол)	0.10	6.99
30 (2-хлораденозин)	0.12 / 0.11	6.90 / 6.93
28b (ССРА)	0.19	6.70
27b (серинол)	0.86	6.10
29b (β-NH ₂ -изобутиловый спирт)	1.10	5.96
18b (этанолламин)	3.26	5.50
Аденозин	5.72 / 5.86	5.30 / 5.32

Наибольшую рецепторную активность среди изученных соединений в концентрации 10 мкМ проявляют соединения **27b** и **18b**. По величине EC₅₀ исследованные соединения и вещества сравнения располагаются в следующем порядке: **24b** ≈ 2-хлораденозин **30** ≈ ССРА **28b** > **27b** ≈ **29b** > **18b** > аденозин. Механизм стимулирующего А₁AR действия веществ был подтвержден в опытах с воздействием на предсердия антагониста А₁ аденозиновых рецепторов DPCPX.

2. Химическая модификация пуринового основания: азид-алкиновое циклоприсоединение

Модифицированные пуриновые нуклеозиды представляют большой интерес в качестве флуорофоров и зондов-маяков. Известно, что 2-аминопурин является широко используемым

флуорофором, а триазолил-замещенные производные пуриновых нуклеозидов активно исследуются в качестве новых флуорофоров. Однако до сегодняшнего времени, насколько можно судить по вышедшей литературе, не было осуществлено синтеза соединений, сочетающих в себе две эти функциональные группы, а именно 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)замещенных пуриновых нуклеозидов, и исследования их флуоресцентных свойств.

Были оценены два варианта синтеза целевых соединений **35b**, **36b** (Схема 2). Первый путь включал в себя синтез триазолил-замещенных нуклеозидов **35a**, **36a** при помощи реакции азид-алкинового циклоприсоединения с применением триацетата рибонуклеозида соответствующего азида **34**, чья растворимость позволяла проводить реакцию в органических растворителях, и последующее снятие ацетильных защит. Второй путь синтеза основывался на предварительном снятии ацетильных защит с **3** с получением рибозида 2-амино-6-хлорпурина **33**, замещении атома хлора на азидную группу с получением соединения **38** и проведении клик-реакции в водном растворе. Однако при проведении пробных реакций содержание целевого продукта **36b** в реакционной смеси при использовании второго пути по данным LC-MS составляло всего 7%, а основным продуктом оказался продукт восстановления **38** – нуклеозид 2,6-диаминопурина **39**. Для синтеза был выбран первый вариант.

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

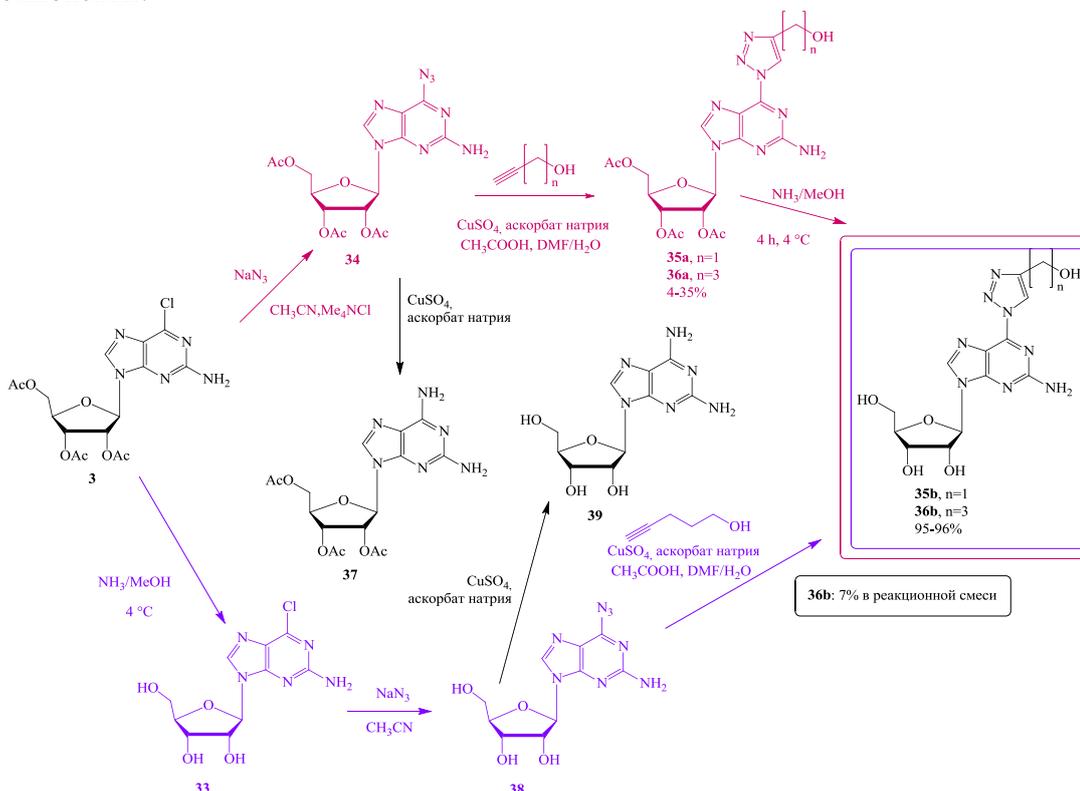


Схема 2 – Синтез 6-(1,2,3-триазол-1-ил)-замещенных производных пуринов

Из литературных источников известно, что азидопурин нестабилен на свету, при нагревании или в присутствии восстанавливающих реагентов, поэтому все реакции проводились при комнатной температуре с защитой реакционной смеси от света (в темной комнате или с укрытием реакционной колбы светонепроницаемыми материалами). Однако присутствие в реакционной смеси аскорбата натрия и солей одновалентной меди, которые являются восстановителями, приводило к частичному восстановлению 6-азидной группы до аминной с образованием триацетата 2,6-диаминопуринрибонуклеозида **37** (данные LC-MS) (Таблица 7), причем с помощью отдельных поставленных опытов было показано, что восстанавливающее действие одновалентной меди проявлялось сильнее.

Таблица 7 – Синтез 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2,3,5-три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил)пуринов

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

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

Удаление ацетильных защит проводилось аммонолизом при обработке соединений **35a** и **36a** насыщенным аммиаком метанолом при пониженной температуре (Схема 2, первый путь). Интересно, что при этом не происходило замещения 1,2,3-триазольной группы, хотя ранее было описано, что в случае 2,6-бис-триазолилзамещенных пуринов С6-триазолил является хорошей уходящей группой. Целевые соединения **35b** и **36b** были выделены с высокими выходами (Таблица 7).

Исследование флуоресценции этих соединений и соответствующих им 2'-дезоксирибонуклеозидов описано ниже (Раздел «Изучение фотофизических свойств триазолил-замещенных пуринов»).

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

Было установлено, что N-(2-аминопурин-6-ил)аминокислоты и дипептиды, а также N-(пурин-6-ил)аминокислоты и дипептиды обладают антимикобактериальной активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. Однако замещенные пурины обладают крайне ограниченной растворимостью в воде, что ограничивает их биодоступность, поэтому такие соединения удобно использовать в форме рибозидов. Замещенные по положению С6 пурины – хорошие субстраты для пуриннуклеозидфосфорилазы (PNP) *E. coli*. Было решено провести рибозилирование при помощи ферментативного синтеза.

За основу была взята серия замещенных по С6 положению аминокислотами или дипептидами пуринов, которые ранее показали антимикробную активность. Эти соединения были любезно предоставлены к.х.н. А.Ю. Вигоровым, с.н.с. лаборатории асимметрического синтеза Института органического синтеза имени И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук.

При помощи ферментативной реакции трансгликозилирования (Схема 3) проводили рибозилирование производных пурина и 2-аминопурина, содержащих при С6 положении остаток глицина в виде кислоты (**40-НС**) или амида (**42-НС**, **43-НС**), или дипептид глицил-глутаминовая кислота (**41-НС**).

Процесс гликозилирования и фосфоролиза гликозидной связи под действием нуклеозидфосфорилаз обратим. В связи с этим необходим тщательный подбор условий синтеза для смещения равновесия в сторону образования целевого гликозида. На это смещение влияют соотношение концентраций модифицированного гетероциклического основания и фосфата углеводного остатка, который образуется из донора углеводного остатка (природного нуклеозида) при фосфоролизе. Поэтому в каждом случае проводили определение оптимального соотношения количеств донора углеводного остатка и модифицированного пурина, а также количества фермента (или ферментов, если донор – пиримидиновый нуклеозид) для достижения оптимальной скорости реакции трансгликозилирования.

При использовании в реакции гетероциклов двух типов (пурина и пиримидина) равновесие смещается в зависимости от соотношения разных нуклеозидфосфорилаз, и реакция будет в большей мере регулироваться одной из них.

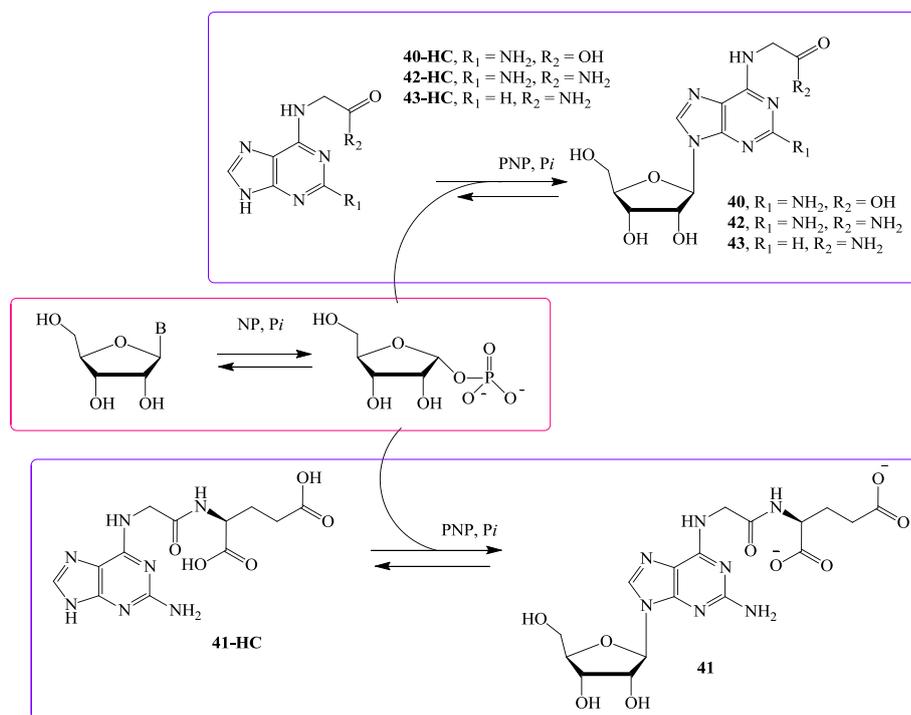


Схема 3 – Гликозилирование 6-замещенных пуринов

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

- проверка субстратной специфичности PNP *E. coli* по отношению к выбранному модифицированному пурину;
- выбор наилучшего донора рибозы;
- подбор оптимального соотношения реагентов;
- подбор оптимального соотношения и количества ферментов.

Прохождение реакции оценивали по конверсии модифицированного пурина в соответствующий рибонуклеозид по данным ВЭЖХ. Оптимизированные условия для синтеза соединений **40–43** приведены в таблице (Таблица 8).

Таблица 8 – Условия реакций трансгликозилирования

Соед.	Заместитель по С2	Заместитель по С6	Донор	Мольный избыток донора по отношению к модифицированному пурину	PNP, ед. акт. на 1 мл реакц. смеси	UP, ед. акт. на 1 мл реакц. смеси*	Конверсия/выход, %
40	NH_2	глицин	уридин	6	0.42	0.25	99/22
41	NH_2	глицилглутаминовая кислота		6	0.42	0.25	98/19
42	NH_2	глицин амид		2	0.70	0.85	99/49
43	H	глицин амид	инозин	7	0.14	–	91/69

*при использовании пиримидинового основания в качестве донора

После определения всех ключевых условий реакции проводили препаративный синтез целевого соединения. Синтез проходил быстро, с высокой конверсией и региоселективно: образовывался исключительно природный N9-изомер (по данным спектров ЯМР). Незаряженные соединения (производные амидов аминокислот) **42** и **43** выделяли при помощи обращенно-фазовой колоночной хроматографии. Очистка заряженных соединений, содержащих свободные кислоты (**40** и **41**), проводилась в два этапа. Целевой продукт вначале выделяли ионообменной хроматографией, а затем очищали обращенно-фазовой хроматографией или перекристаллизацией. Продукты были получены с приемлемыми выходами.

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

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

Задачей этой части работы была замена остатка рибозы на 2-деоксирибозу в ряду 2-хлор-N⁶-замещенных аденозинов и 2-амино-6-(1,2,3-триазол-1-ил)замещенных пуриновых рибозидов, синтезированных ранее.

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

Процесс трансгликозилирования представляет собой протекание в одной реакционной смеси нескольких обратимых процессов образования и фосфолиза гликозидной связи в доноре углеводного остатка (природном нуклеозиде) и модифицированном нуклеозиде (Схема 4). Прохождение реакции оценивали по конверсии модифицированного рибонуклеозида в 2'-дезоксирибонуклеозид по данным ВЭЖХ.

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

Синтез 2'-дезоксирибозидов осложнен тем, что 1-фосфат 2-деоксирибозы нестабилен и со временем разрушается с образованием неорганического фосфата и 2-деоксирибозы, которая не является субстратом нуклеозидфосфорилаз. Выведение 2-деоксирибозы из сферы реакции смещает равновесие в сторону исходных продуктов. На практике это выражается постепенным снижением содержания целевого продукта в реакционной смеси. Таким образом, при синтезе 2'-дезоксирибонуклеозидов необходимо было определить оптимальное время прохождения синтеза и проводить тщательный контроль с использованием ВЭЖХ, чтобы остановить прохождение реакции после максимума конверсии исходного соединения в продукт, до наступления «отката».

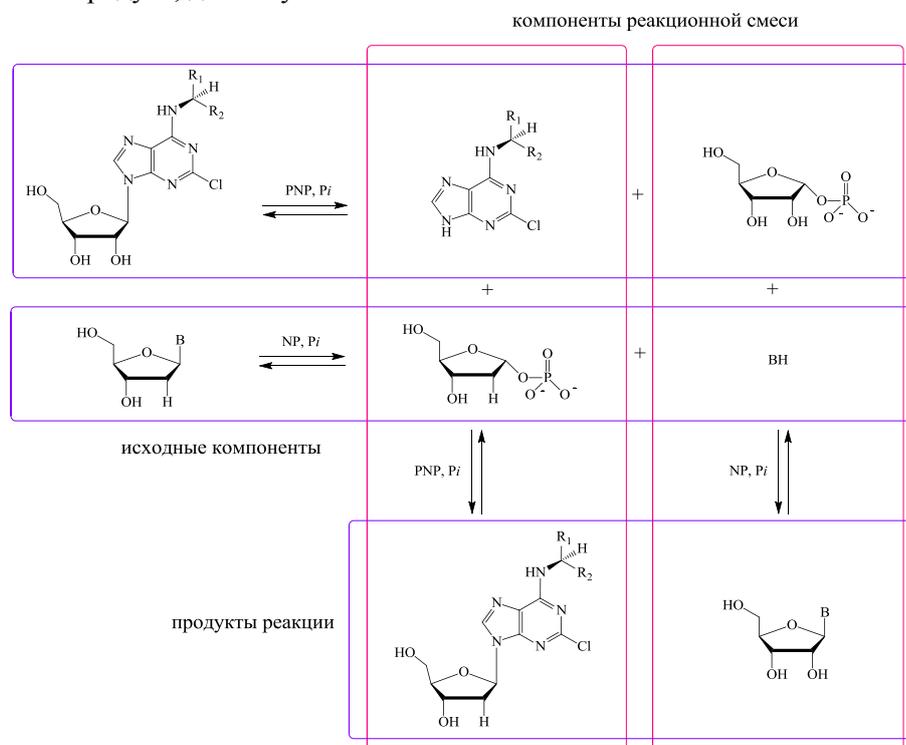


Схема 4 – Реакция трансгликозилирования

После оптимизации всех необходимых параметров осуществлялось масштабирование ферментативного процесса с последующим выделением и очисткой целевого продукта. Оптимальные условия реакций трансгликозилирования приведены в таблице ниже (Таблица 9).

Таблица 9 – Оптимизированные условия реакций трансгликозилирования

Соед.	Заместитель по С6	Донор	Мольный избыток донор / модифицированный пурин рибозид	Количество PNP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси	Количество UP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси*	Конверсия/ выход, %
5c	глицин	2'-дезоксиридин	5	0.42	0.85	88/38
6c	L-аланин		5	0.14	0.51	89/53
7c	L-валин		7	0.14	0.85	97/47
10c	L-серин		6	0.50	0.51	83/45
11c	L-треонин		7	0.28	0.30	82/32
12c	L-метионин		7	0.42	0.51	81/52
15c	L-тирозин	2'-дезоксиденозин	7	0.07	–	78/24
21c	β -Ala	2'-дезоксиридин	5	0.42	0.85	83/73
29c	β -NH ₂ -изобутиловый спирт		5	0.42	0.85	88/37
23c	D-серин		5	0.42	0.85	83/38

*при использовании 2'-дезоксиридина в качестве донора

Продукты реакции трансгликозилирования – 2'-дезоксирибонуклеозиды – были выделены при помощи обращенно-фазовой колоночной хроматографии и получены с высокой чистотой и приемлемыми выходами. В некоторых случаях выделение продукта осложнялось близкой хроматографической подвижностью рибонуклеозида и 2'-дезоксирибонуклеозида, что уменьшало итоговый выход. Структура синтезированных соединений подтверждена данными масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР.

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

Отдельная задача – получение 2'-дезоксирибонуклеозидов 6-триазолил-замещенных 2-аминопуринов при помощи реакции трансгликозилирования. Необходимо было проверить субстратную специфичность таких соединений по отношению к нуклеозидфосфорилазам, которая до этого момента не исследовалась, и провести оптимизацию условий для трансгликозилирования таких объектов. Схема реакции трансгликозилирования приведена на схеме (Схема 5).

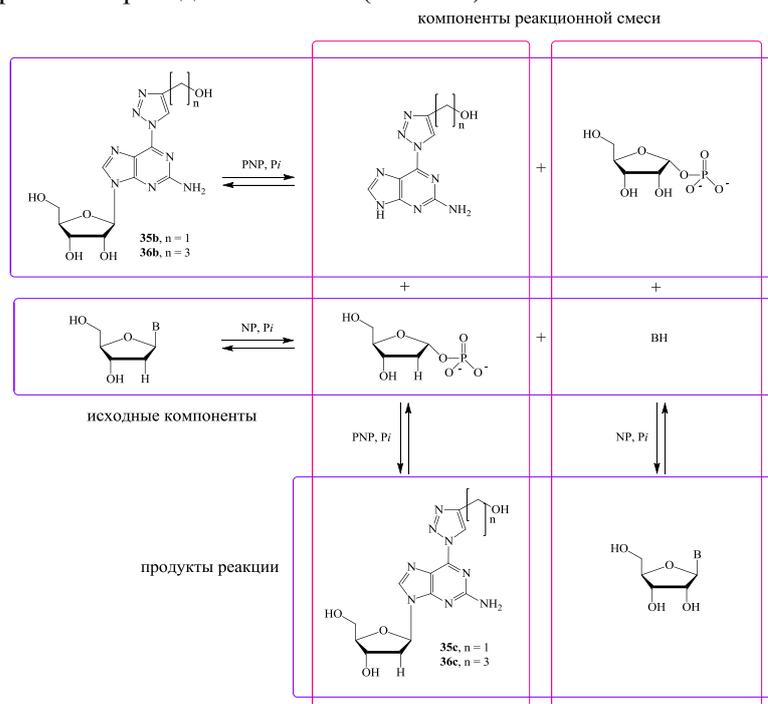


Схема 5 – Ферментативный синтез триазолил-замещенных пуринов

Оказалось, что триазолил-замещенные пурины являются субстратами для PNP (данные LC-MS), что позволило перейти к этапу подбора условий реакции трансгликозилирования. Подбор условий

проводился по тем же алгоритмам, что и для предыдущей серии (Таблица 10). Продукты выделяли при помощи обращенно-фазовой колоночной хроматографии. Получили соединения **35c** и **36c**, которые были охарактеризованы методами масс-спектрометрии, одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР.

Таблица 10 – Оптимизированные условия реакций трансгликозилирования для 2-амино-6-триазолилных производных пурина и выход после выделения

Соед.	Донор	Мольный избыток донор / модифицированный пуридин рибозид	Количество PNP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси	Количество UP, ед. акт. на 1 мл реакционной смеси	Конверсия/ выход, %
35c	2'-дезоксисуридин	10	0.43	0.52	88/46
36c		7	0.28	0.51	79/26

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

5. Изучение фотофизических свойств триазолил-замещенных пуринов

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

Природа углеводного остатка не оказывала значительного влияния на спектр флуоресценции. Максимум спектров эмиссии полученных соединений в 7% растворе ацетонитрила в воде находился при 430 нм, а максимумы возбуждения находились при 225 и 330 нм. Общий вид спектра возбуждения и эмиссии был схожим для всех исследованных соединений (Рисунок 2).

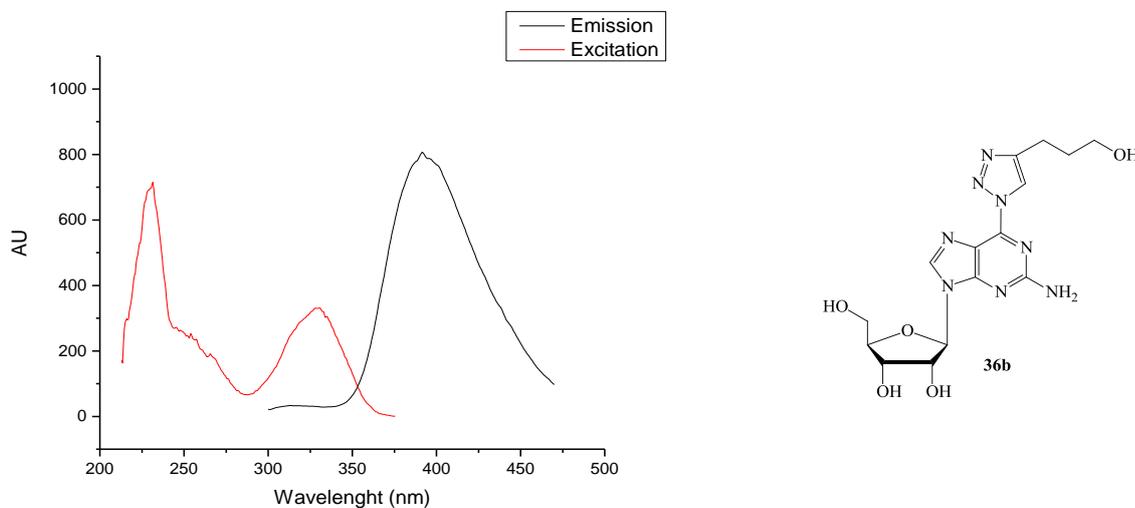


Рисунок 2 – Спектр возбуждения и эмиссии соединения **36b**

В спектрах исследованных соединений был обнаружен большой стоксов сдвиг, рассчитанный как разница между длиной волны, соответствующей более коротковолновому пику возбуждения, и длиной волны, соответствующей максимуму эмиссии (Таблица 11).

В растворах 7% ацетонитрила в воде соединения проявили флуоресценцию с максимумом на длине волны 425–430 нм, причем длина волны максимума флуоресценции не зависела от природы углеводного остатка и заместителя при триазольном фрагменте. В ацетонитрильных растворах максимум эмиссии для большинства соединений смещался до 405–410 нм. Для рибозида **35b** и триацетил-защищенного рибозида 3-гидроксипропил-триазол-замещенного производного **35a** максимум флуоресценции сместился в коротковолновую область (390 нм). Длина волны максимума возбуждения при этом не изменялась и составляла 230 нм.

Таблица 11 – Фотофизические свойства соединений в различных растворителях

Соединение		Растворитель	λ возбуждения, нм	λ эмиссии, нм	$\Delta \lambda$, нм
35a	2-амино-6-(4-(3-гидроксипропил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	225	425	200
		ацетонитрил	230	390	160
35b	2-амино-6-(4-(3-гидроксипропил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9- β -D-рибофуранозилпурин	7% ацетонитрил в воде	230	430	200
		ацетонитрил	230	390	160
35c	2-амино-6-(4-(3-гидроксипропил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2-дезоксид- β -D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	230	425	195
		ацетонитрил	230	405	175
36a	2-амино-6-(4-(3-гидроксиметил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	230	427	197
		ацетонитрил	230	405	175
36b	2-амино-6-(4-(3-гидроксиметил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9- β -D-рибофуранозилпурин	7% ацетонитрил в воде	230	430	200
		ацетонитрил	230	410	180
36c	2-амино-6-(4-(3-гидроксиметил)-1,2,3-триазол-1-ил)-9-(2-дезоксид- β -D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	230	430	200
		ацетонитрил	230	405	175
34	2-амино-6-азидо-9-(2,3,5-три-О-ацетил- β -D-рибофуранозил)пурин	7% ацетонитрил в воде	273	437	164
		ацетонитрил	295	330	35

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

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

Среди препаратов, используемых в клинике, клофарабин (2-хлор-6-амино-9- β -D-(2'-дезоксид-2'-фторарабинофуранозил)пурин) занимает особое место в силу уникальных антипролиферативных свойств. Представлялось интересным разработать подход к химико-ферментативному способу получения новых аналогов 2'-дезоксид-2'-фтор-арабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина. Ранее в лаборатории Биотехнологии ИБХ РАН был разработан способ получения 2-дезоксид-2-фтор- α -D-арабинофуранозил-1-фосфата **44** из 1,3,5-три-О-бензоил-2-дезоксид-2-фтор-арабинофуранозы **45** через смесь аномеров соответствующего 1-бромиды **46** по методу, представленному на схеме (Схема 6). Итоговый продукт содержал смесь α -фосфата **44** и его β -аномера (1:1 в соответствии с данными ¹H спектроскопии ЯМР), а также сложно отделяемую примесь хлорида лития, который мешал работе пуриноклеозидфосфорилазы.

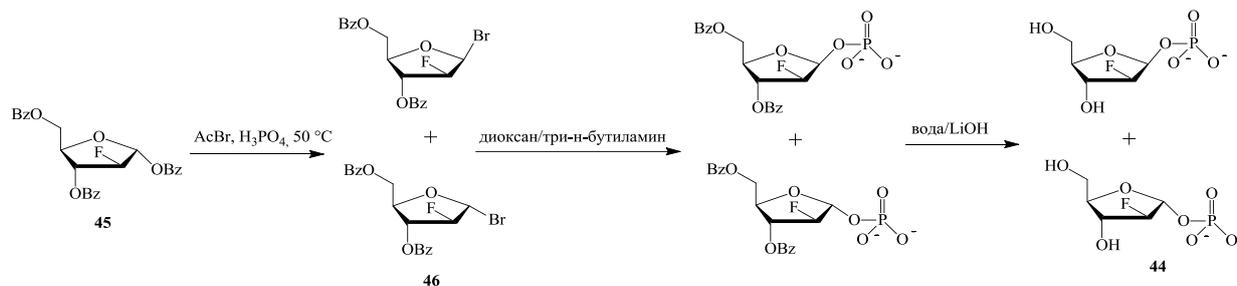


Схема 6 – Химический синтез 2'-дезоксид-2'-фтор- α -D-арабинофуранозил-1-фосфата **44**

Была введена дополнительная стадия кристаллизации фосфата **44** из смеси растворителей вода-метанол-ацетон; она позволила избавиться от сопутствующего хлорида лития. Был получен фосфат **44** в смеси с неактивным β -аномером для проведения пробных ферментативных синтезов 2'-дезоксид-2'-фтор-арабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина.

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

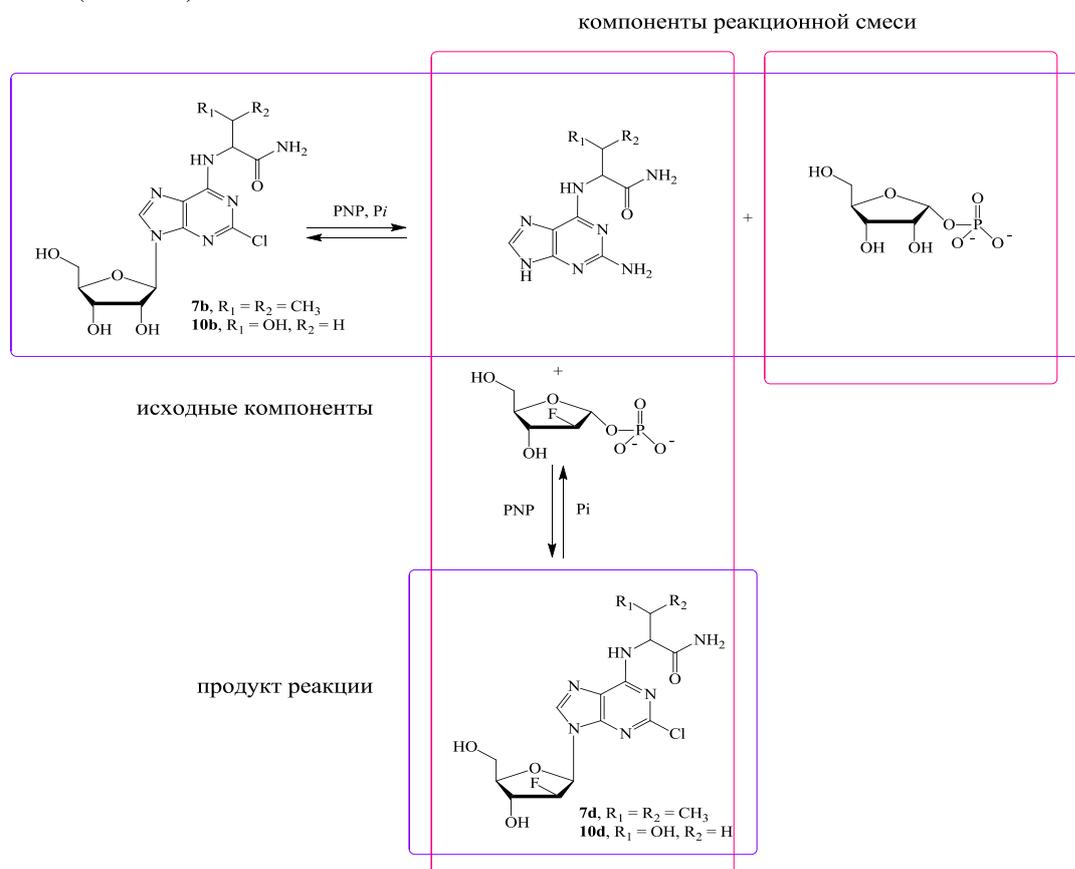


Схема 7 – Ферментативный синтез 2'-дезоксид-2'-фтор-арабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина **7d** и **10d**

Объем реакционной смеси составил 1 мл, концентрация модифицированных нуклеозидов – 1 мМ, концентрация 2'-дезоксид-2'-фтор- α -D-арабинофуранозил-1-фосфата **44** – 10 мМ, температура проведения реакции – 50 °С. В реакцию вводили 14 единиц активности PNP. Время протекания реакции составляло 24 часа. В результате проведения реакций по данным LC-MS было зафиксировано образование продуктов – новых 2'-дезоксид-2'-фторарабинозидов N⁶-замещенных 2-хлорпуринов (Таблица 12).

Реакцию трансгликозилирования можно с успехом использовать для получения 2'-дезоксид-2'-фтор-арабинозидов N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина – новых аналогов клофарбина.

Таблица 12 – Экспериментальные данные конверсии N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина в 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинозиды

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

7. Изучение аномалии в спектрах ЯМР аналогов аденозина

При анализе спектров ЯМР N⁶-замещенных производных 2-хлораденозина было обнаружено, что нуклеозиды существуют в двух формах: дублируется сигнал протона N⁶HСН и протонов ближайшего окружения. Для удобства описания аномалии был введен термин «мини-форма», поскольку содержание этой формы, зарегистрированное при помощи спектров ЯМР, не превышало содержания основной формы и варьировалось от 11 до 33%. Сигнал протона N⁶СН мини-формы был значительно сдвинут в слабое поле, разница в химсдвигах сигналов составляла больше 0.5 м.д. Чем дальше находились протоны от группы N⁶HСН, тем менее выражен был этот эффект. Мини-форма имела тот же набор сигналов, что и основная форма, в спектрах COSY, ¹H, ¹³C-НМВС и ¹H, ¹⁵N-НМВС.

Это явление не зависело от хиральности (проявлялось в спектрах амидов и метиловых эфиров как L-, так и D-аминокислот, S-аминоспиртов, а также соединений, являющимися оптически неактивными) или природы углеводного остатка (рибонуклеозид, 2'-дезоксирибонуклеозид, триацетат рибонуклеозида). Однако такая аномалия не была обнаружена ни в одном из производных бета-аминоизобутилового спирта **29a**, **29b** и **29c**, а также в производных N⁶-замещенного аденозина **43** или 2-аминоаденозина **40–42**. Следует отметить, что по данным ВЭЖХ и LC-MS все продукты были гомогенны.

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

Наиболее разрешенными были спектры валинового производного **7b**, поэтому оно было выбрано для проведения дополнительных экспериментов ЯМР. Для поиска внутримолекулярной водородной связи были повторно записаны одномерные и двумерные спектры ЯМР образца с повышенной концентрацией **7b** (770 мг/мл в DMSO-d₆). Химический сдвиг α-СН протона остатка валина изменился на 0.79 м.д. по данным спектра ¹H ЯМР (Рисунок 3). Химический сдвиг протона СН основной формы **7b** составил 4.54 м.д., а сигнал мини-формы был смещен в слабое поле до 5.33 м.д.

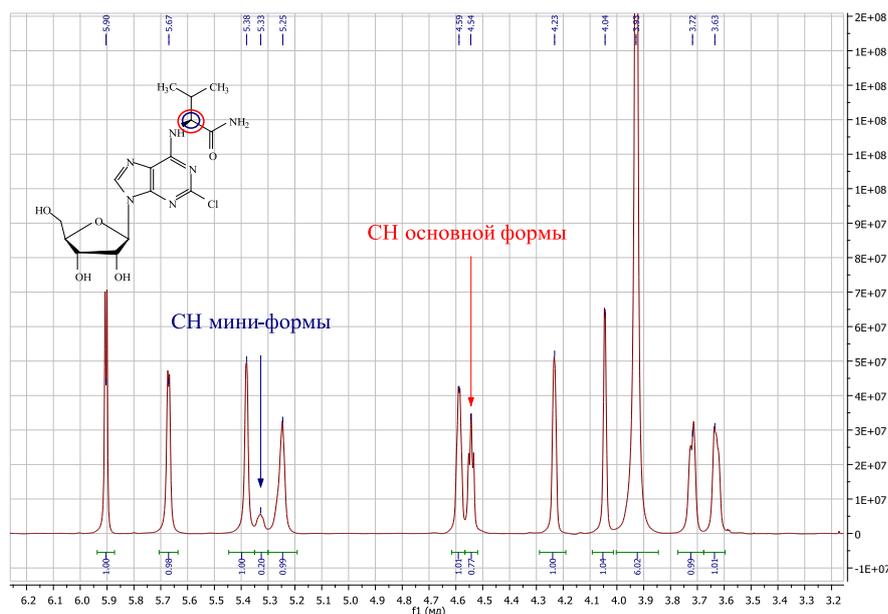


Рисунок 3 – Фрагмент спектра ¹H ЯМР производного валина **7b**

Двойной набор сигналов представлен также для протонов аминной и амидной групп (Рисунок 4). Отдельный набор сигналов мини-формы нуклеозида зарегистрирован и в спектрах ЯМР ¹³C (Рисунок 5).

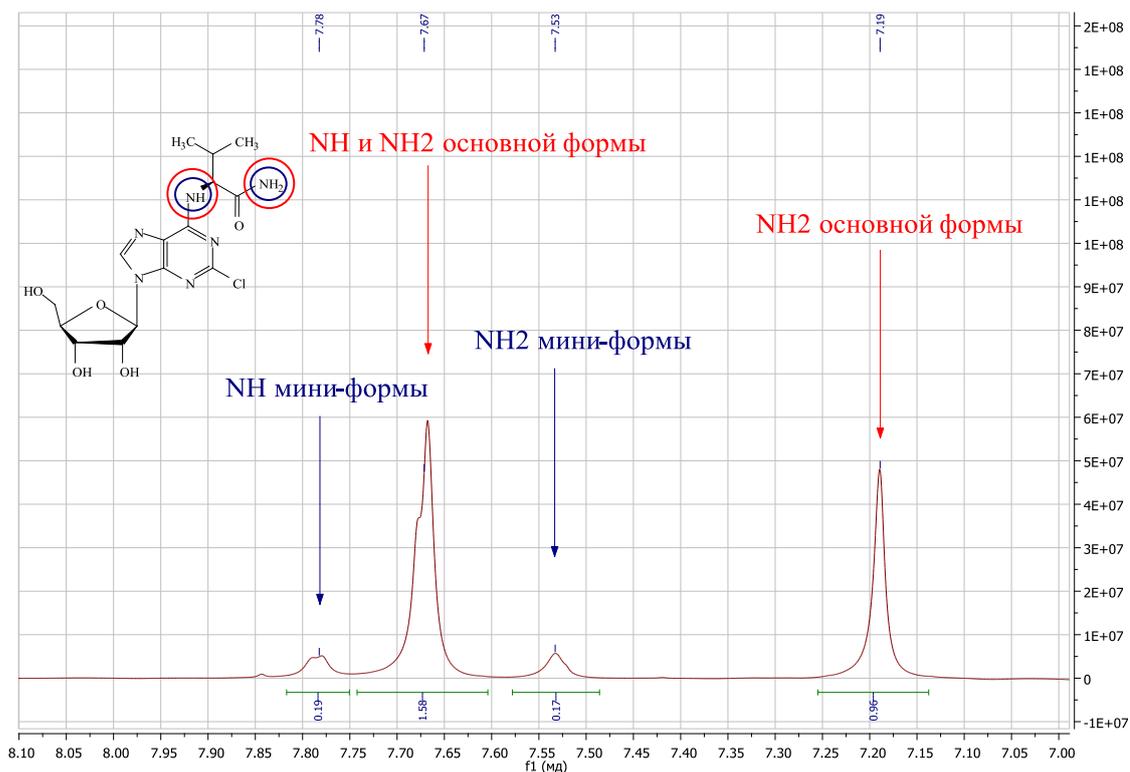


Рисунок 4 – Фрагмент спектра 1H ЯМР производного валина **7b**

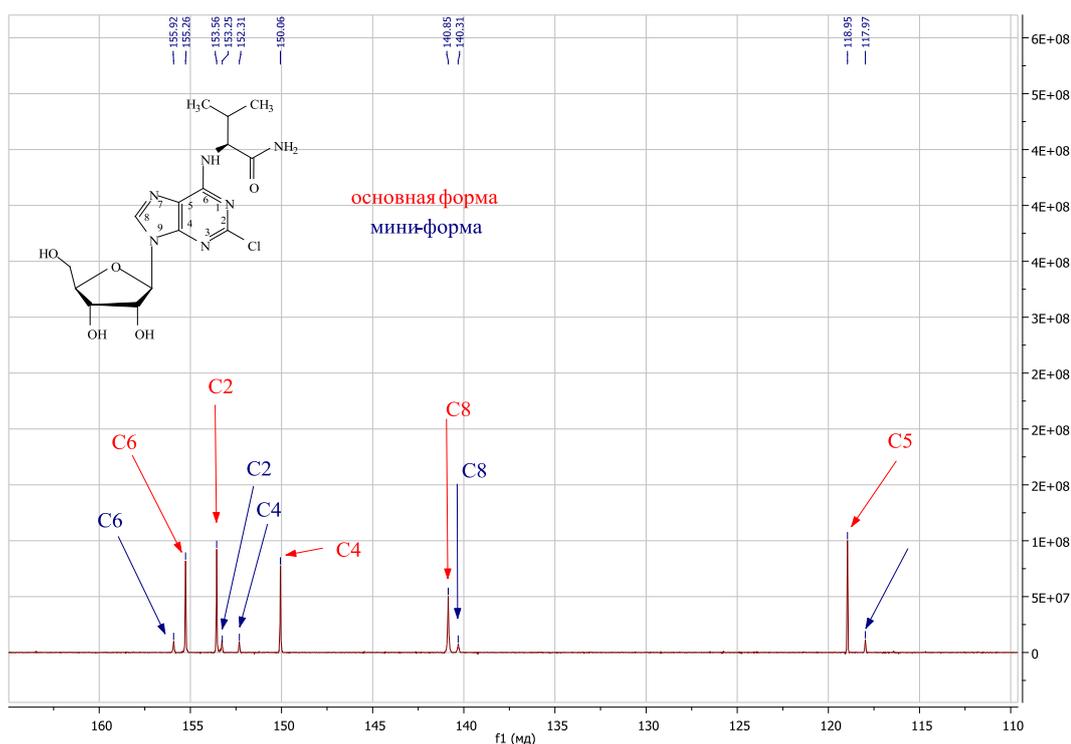


Рисунок 5 – Фрагмент спектра 13C ЯМР производного валина **7b**

Были зарегистрированы спектры ЯМР ^1H при разных температурах и изучено влияние температуры на формирование мини-формы соединения **7b** (Рисунок 6). С повышением температуры от 293 до 313 К сигналы одних и тех же протонов основной и мини-формы уширялись. Такое уширение свидетельствует о процессе химического обмена. Можно утверждать, что в растворе одновременно присутствуют две формы одного и того же вещества, а обмен мини-формы с основной формой происходит во время эксперимента. Сигналы ^1H основной формы и мини-формы не сливаются друг с другом. В опытах при 293–313 К содержание второй формы в спектрах ЯМР не изменялось.

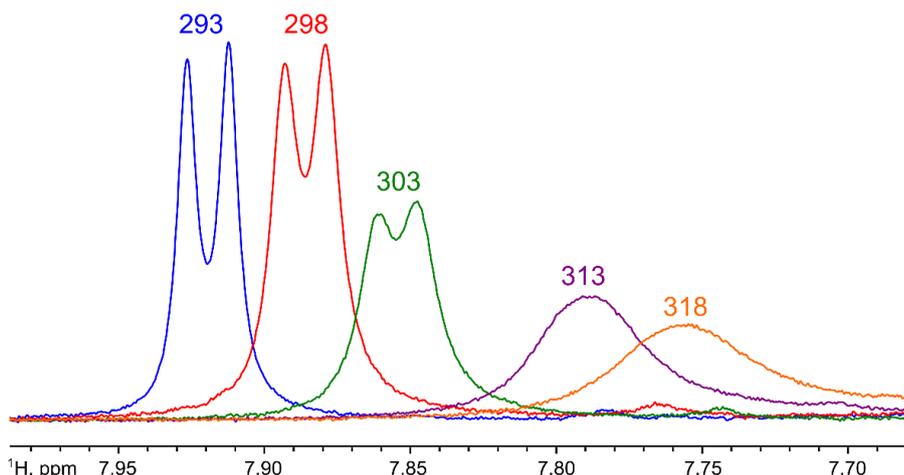


Рисунок 6 – Температурная зависимость формы и химического сдвига сигнала N^6H в 1H ЯМР мини-формы **7b**. Температура приведена в кельвинах

Структура с затрудненным вращением может быть стабилизирована за счет образования внутримолекулярной водородной связи $CH\cdots N7$ (гипотеза Н-связи) или вследствие аминок-иминной таутомерии (данная теория обсуждается в нескольких публикациях) (Рисунок 7).

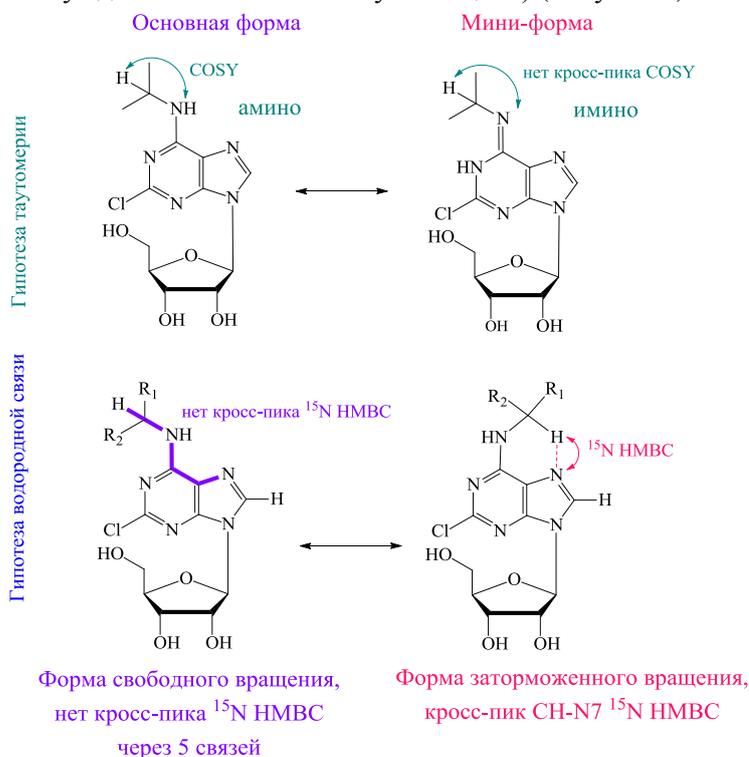


Рисунок 7 – Две гипотезы появления сигналов второй формы в спектрах ЯМР

В спектрах COSY различных 2-хлор- N^6 -замещенных производных аденозина наблюдались кросс-пики между сигналами протонов N^6H и CH в как в основной, так и в мини-форме. Это подтверждает наличие двух отдельных форм N^6HCH , а также наличие NH протона в каждой из них, что заставило нас усомниться в гипотезе таутомерии.

Амино-имино таутомерия должна сильно влиять на химический сдвиг внециклического атома азота N^6 в спектре ^{15}N ЯМР. На основании доступных экспериментальных данных и квантовых расчетов можно ожидать значительных изменений химического сдвига порядка сотни м.д. Однако наши экспериментальные данные выявили изменения химического сдвига азота N^6H между основной и мини-формами в районе 4–20 м.д. Следовательно, гипотеза аминок-имино таутомерии была отброшена как несогласующаяся с экспериментальными данными, полученными в настоящей работе.

Также была рассмотрена гипотеза таутомерии с образованием амидоподобной частичной двойной связи $C6-N^6$ вместо двойной иминосвязи. Несмотря на то, что это объяснило бы устойчивую плоскую заторможенную структуру, в спектрах наших соединений химический сдвиг протона N^6H претерпел бы существенные изменения, однако это не так (Рисунок 4). Примечательно, что в разных соединениях

сигнал протона N^6H демонстрировал сдвиг как в сильное, так и в слабое поле. Поэтому эта гипотеза также была отвергнута.

Образование мини-формы можно объяснить затрудненным вращением, которое возникает не из-за стерических факторов, а из-за наличия стабилизирующей водородной связи. Допустим, в основной форме аминокислотный заместитель свободно вращается вокруг связи N^6-C6 , а в мини-форме структура находится в заторможенном состоянии (Рисунок 8, на примере валинового производного **7b**). Соединения-исключения, для которых мини-формы обнаружено не было – производные бета-аминоизобутилового спирта – не имеют в структуре протона N^6HCH , что наталкивает на мысль о вовлеченности этого протона в образование предполагаемой водородной связи.

Затрудненная структура может быть обусловлена образованием внутримолекулярной водородной связи между протоном N^6CH и атомом пурина N7 при *анти*-положении заместителя при N^6 по отношению к атому N1 пуринового гетероцикла с образованием стабильного шестичленного цикла. Изменение химических сдвигов атомов, затронутых образованием затрудненной структуры, показано на рисунке (Рисунок 8).

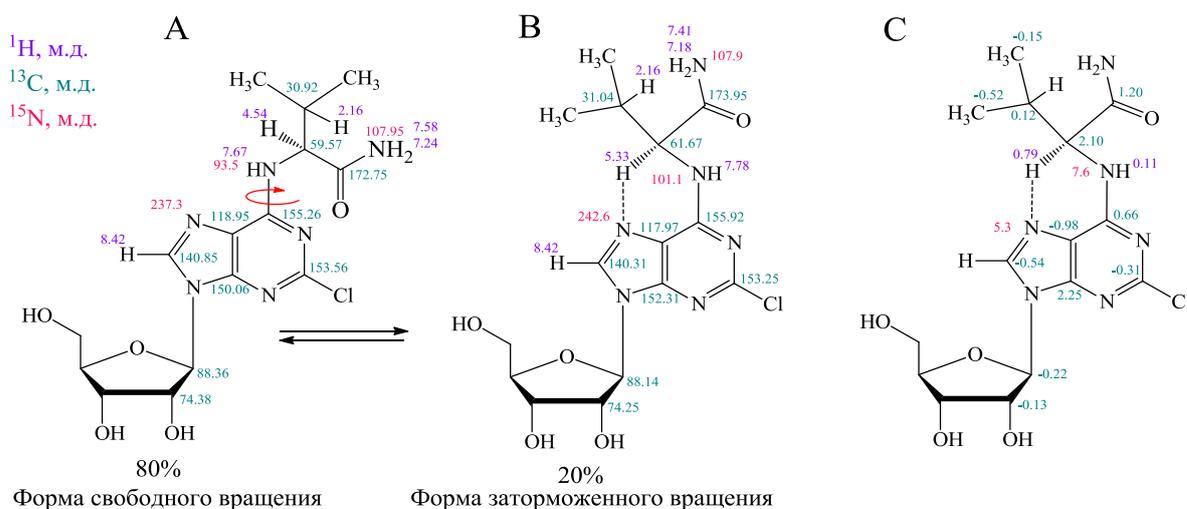


Рисунок 8 – Химические сдвиги основного компонента (А) и мини-формы с водородной связью $N^6CH \cdots N7$ (В) соединения **7b** и различия между ними (С). Показаны только химические сдвиги, которые различаются между формами

Ранее не сообщалось об использовании эксперимента ЯМР $^1H, ^{15}N$ -НМВС для обнаружения водородной связи $C-H \cdots N7$. Такое взаимодействие должно проявиться как кросс-пик между протоном N^6CH и азотом N7 пуринового гетероцикла в спектре $^1H, ^{15}N$ -НМВС, зарегистрированном при высокой концентрации вещества.

Нами был получен спектр $^1H, ^{15}N$ -НМВС при повышенной концентрации вещества **7b** (770 мг/мл в ДМСО- d_6). В этом спектре был обнаружен кросс-пик между сигналами пуринового атома N7 и протона N^6CH мини-формы (Рисунок 11), что указывает на наличие дальнего взаимодействия (Рисунок 8, Рисунок 7). Аналогичный кросс-пик для основной формы отсутствовал, несмотря на большую концентрацию основной формы по сравнению с мини-формой (Рисунок 11).

Эксперимент ЯМР $^1H, ^{15}N$ -НМВС выявил еще один кросс-пик, возникший из-за дальних спин-спиновых взаимодействий ядер 1H и ^{15}N . В спектре отчетливо наблюдался кросс-пик водородной связи между 5'-ОН рибозы и N3 пурина (Рисунок 11, кросс-пик [5.26; 221.56]). Подтверждение пространственного сближения и возникновения водородной связи позволяют с точностью утверждать, что такие типы связи можно обнаружить в двумерном спектре $^1H, ^{15}N$ -НМВС, если в анализируемом образце вещество находится в высокой концентрации.

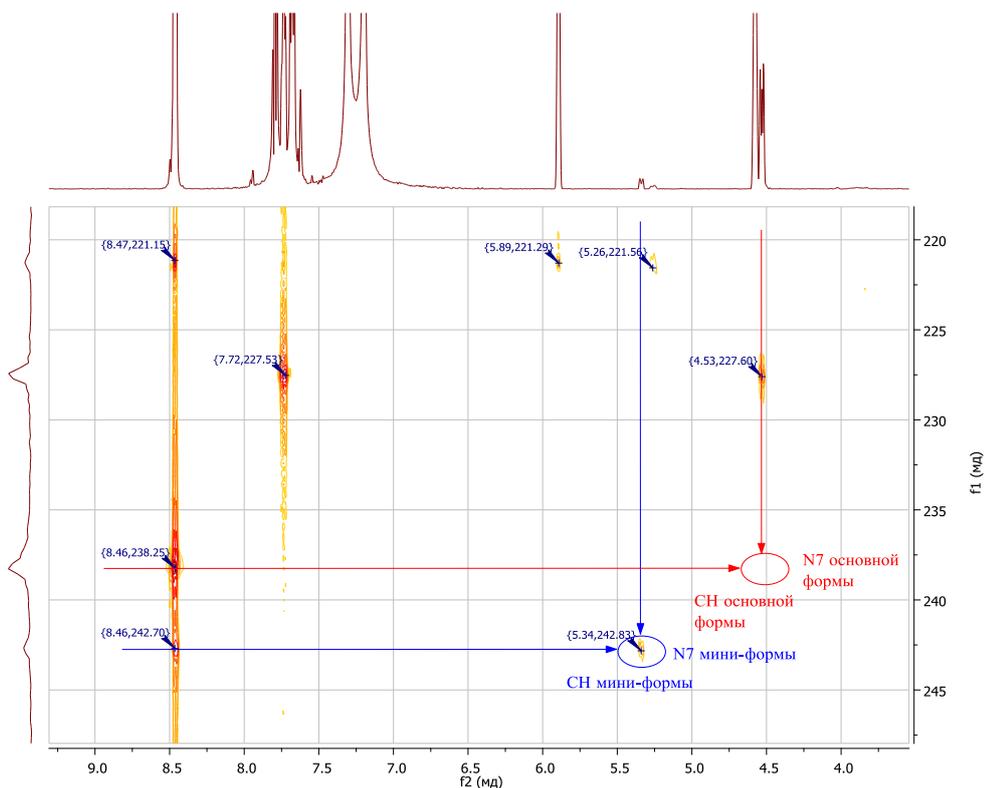


Рисунок 9 – Фрагмент спектра ^1H , ^{15}N -НМВС производного валина **7b** (293 К)

Чтобы экспериментально подтвердить теорию возникновения такой водородной связи, были синтезированы два модельных нуклеозида, не способных образовывать водородную связь $\text{N}^6\text{CH}\cdots\text{N7}$ из-за отсутствия протона N^6CH (N^6 -*трет*-бутил-2-хлораденозин **47**) или отсутствия азота N7 в гетероцикле (8-аза-7-дезазапуриновое производное **48**) (Рисунок 10).

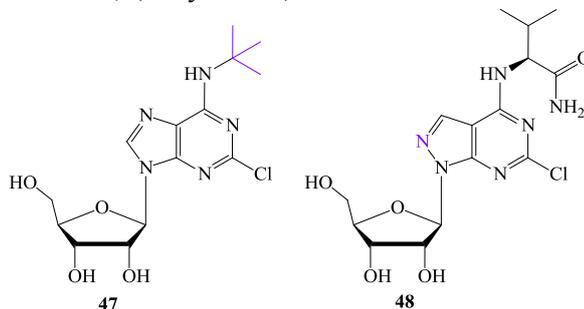


Рисунок 10 – Структуры нуклеозидов, неспособных к образованию внутримолекулярной водородной связи $\text{N}^6\text{CH}\cdots\text{N7}$

Синтез N^6 -*трет*-бутил-2-хлораденозина **47** проводили по описанному ранее двухэтапному методу получения 2-хлор- N^6 -замещенных производных аденозина (Схема 8). Реакцию нуклеофильного замещения проводили в ацетонитриле в присутствии триэтиламина в качестве основания. Для удаления ацетильных защитных групп с полученного нуклеозида триацетат **49** обрабатывали насыщенным раствором аммиака в метаноле при 4 °С с получением соответствующего нуклеозида **47**.

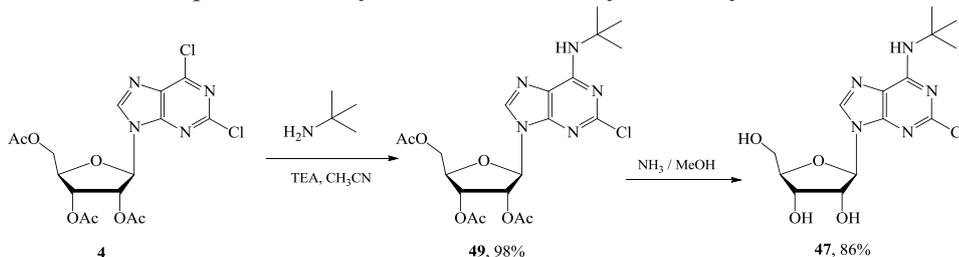


Схема 8 – Синтез 2-хлор- N^6 -*трет*-бутил-аденозина **47**

Синтез 8-аза-7-дезазапуринового производного **48** был проведен А.Р. Башориным под руководством И.В. Фатеева в лаборатории Биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений ИБХ РАН. Нуклеозиды были охарактеризованы спектрами ЯМР ^1H , ^{13}C , COSY, ^1H , ^{13}C -

HSQC, ^1H , ^{13}C -HMBC, ^1H , ^{15}N -HSQC и ^1H , ^{15}N -HMBC. Сигналов второй формы нуклеозидов в спектрах ЯМР не наблюдалось (Рисунок 11, Рисунок 12), что дает основание утверждать, что заторможенные структуры нуклеозидов **47** и **48** не формировались.

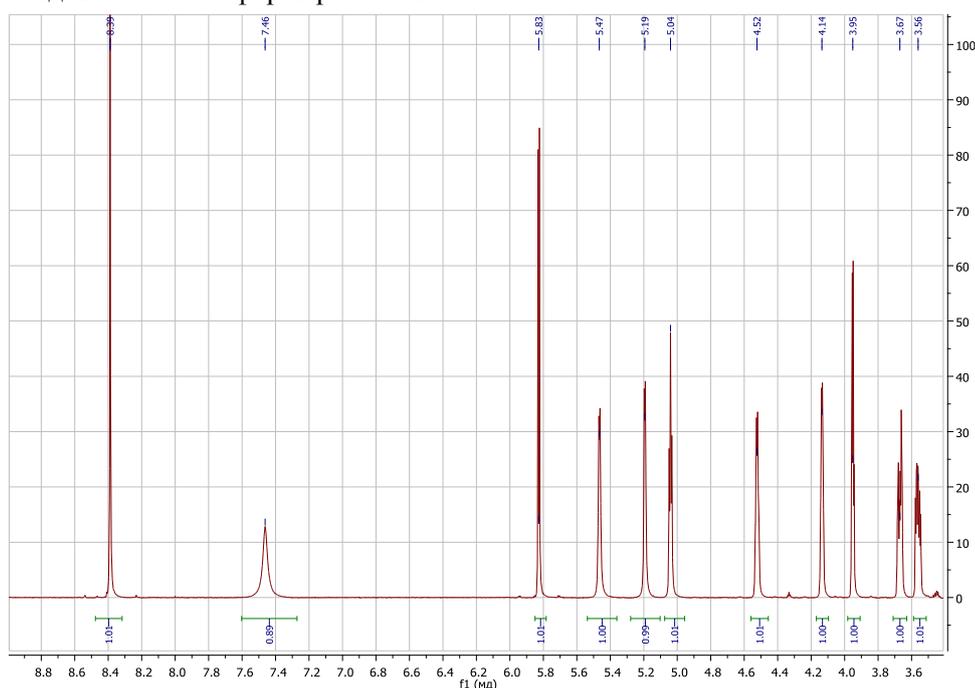


Рисунок 11 – Фрагмент спектра ^1H ЯМР 2-хлор- N^6 -*трет*-бутил-аденозина **47** (303 К)

Таким образом, набор полученных экспериментальных данных однозначно свидетельствует о наличии впервые обнаруженной необычной водородной связи $\text{N}^6\text{CH}\cdots\text{N}7$ в 2-хлор- N^6 -замещенных аналогах аденозина. Показано, что сигналы второй формы не наблюдаются в спектрах ЯМР соединений, не имеющих или пуринового атома $\text{N}7$, или протона N^6CH заместителя. Основная форма соответствует свободному вращению вокруг связи $\text{C}6-\text{N}^6$, а мини-форма появляется из-за конформации заторможенного вращения, в которой заместитель при N^6 находится в *анти*-положении по отношению к атому $\text{N}1$ пуринового гетероцикла.

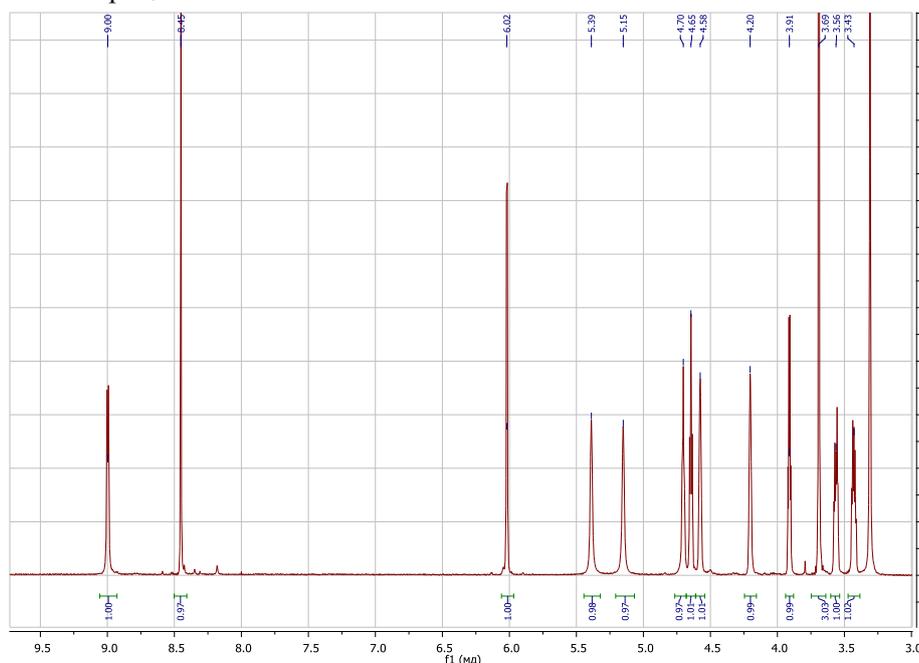


Рисунок 12 – Фрагмент спектра ^1H ЯМР нуклеозида 8-аза-7-дезапуринового производного **48** (303 К)

Фактором стабилизации *анти*-положения заместителя при $\text{C}6$ является образование нового типа внутримолекулярной водородной связи между CH протоном заместителя и $\text{N}7$ атомом пурина. Появление сигналов второй формы в спектрах ЯМР N^6 -замещенных нуклеозидов 2-хлораденозина впервые было объяснено образованием внутримолекулярной водородной связи между протоном

заместителя N⁶CH и атомом азота N7 пуринового основания. Наличие этой водородной связи было подтверждено при помощи данных двумерного гетероядерного спектра ¹H, ¹⁵N-НМВС.

Заключение

В результате выполнения комплекса экспериментальных работ можно сделать следующие выводы:

- показано, что химически синтезированные двадцать четыре 2-хлорзамещенных рибонуклеозида с остатками амидов хиральных аминокислот и линейными/разветвленными аминспиртами в N⁶ положении аденозина не проявляют цитотоксичности в опытах с клетками линий HepG2 и LS174T, при этом являются частичными агонистами A₁ аденозиновых рецепторов; активность трех нуклеозидов, имеющих в структуре остатки серинола, аланинола и β-аминоизобутилового спирта, превосходит активность известного селективного агониста аденозиновых рецепторов типа A₁ 2-хлор-N⁶-циклопентиладенозина или близка к ней;
- исследованы фотофизические свойства полученных химическим синтезом C6-1,2,3-триазол-1-илзамещенных пуриновых рибонуклеозидов (4 соединения) и полученных при помощи реакции трансгликозилирования соответствующих 2'-дезоксирибозидов (2 соединения); показано, что все соединения проявляли большой стоксов сдвиг (до 200 нм) в водно-ацетонитрильном растворе;
- осуществлен ферментативный синтез рибозидов 2-Н-пурина (1 соединение) и 2-аминопурина (3 соединения), замещенных остатками глицина и глицинглутаминовой кислоты в C6 положении основания для тестирования в качестве агонистов аденозиновых рецепторов;
- при помощи ферментативного синтеза из соответствующих рибонуклеозидов получены 2'-дезоксирибонуклеозиды 2-хлорзамещенных аденинов, содержащих в N⁶ положении остатки амидов хиральных аминокислот и линейных/разветвленных аминспиртов (10 соединений);
- показана принципиальная возможность биосинтеза новых аналогов клофарабина – 2'-дезоксидеокси-2'-фтор арабинозидов – из рибозидов 2-хлорзамещенных аденозинов с остатками амидов хиральных аминокислот в N⁶ положении;
- проведено исследование аномалии в спектрах ЯМР нуклеозидов 2-хлораденина: с использованием двумерной гетероядерной спектроскопии ЯМР впервые доказано наличие внутримолекулярной водородной связи между N7 атомом пурина и СН протоном заместителя при N⁶ атоме аденина, приводящее к образованию заторможенной структуры нуклеозида.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

- 1) Берзина М. Я., Eletsкая B.Z., Kayushin A.L., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Fateev I.V., Zhavoronkova O.N., Bashorin A.R., Arnautova A.O., Smirnova O.S., Antonov K.V., Paramonov A.S., Dubinnyi M.A., Esipov R.S., Miroshnikov A.I., Konstantinova, I.D. *Intramolecular Hydrogen Bonding in N⁶-Substituted 2-Chloroadenosines: Evidence from NMR Spectroscopy* //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 11. – P. 9697. DOI: 10.3390/ijms24119697 **IF_{wos} 6.208 (Q1)**
- 2) Берзина М. Я., Eletsкая B.Z., Kayushin A.L., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Fateev I.V., Paramonov A.S., Kostromina M.A., Zayats E.A., Abramchik Yu.A., Maltsev D.V., Naumenko L.V., Taran A.S., Yakovlev D.S., Spasov A.A., Miroshnikov A.I., Esipov R.S., Konstantinova I.D. *Synthesis of 2-chloropurine ribosides with chiral amino acid amides at C6 and their evaluation as A₁ adenosine receptor agonists* //Bioorganic Chemistry. – 2022. – V. 126. – P. 105878. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.105878 **IF_{wos} 5.275 (Q1)**
- 3) Fateev, I.V.; Kostromina, M.A.; Abramchik, Y.A.; Eletsкая, B.Z.; Mikheeva, O.O.; Lukoshin, D.D.; Zayats, E.A.; Берзина, М. Я.; Dorofeeva, E.V.; Paramonov, A.S.; Kayushin, A.L.; Konstantinova, I.D.; Esipov, R.S. *Multi-enzymatic cascades in the synthesis of modified nucleosides: Comparison of the thermophilic and mesophilic pathways* //Biomolecules. – 2021. – V. 11. – №. 4. – P. 586. DOI: 10.3390/biom11040586 **IF_{wos} 4.879 (Q2)**.

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

Патент РФ № RU 2563257 C1 от 20.09.2015. Бюл. №26. Константинова И.Д., Елецкая Б.З., Дорощева Е.В., Фатеев И.В., Берзина М.Я., Лутонина О.И., Мирошников А.И. *Способ получения 9-(бета-D-арабинофуранозил)-6-(N^α-L-сериламидо)-2-хлорпурина.*

Глава A convenient approach to the biosynthesis of C2,C6-disubstituted purine nucleosides using E. coli purine nucleoside phosphorylase and arsenolysis **в книге** Applied Biocatalysis: The Chemist's Enzyme Toolkit, Fourth Edition, 2020, Publisher Wiley-VCH, pages 211-214; Konstantinova I.D., Kayushin A.L., Arnautova A.O., Antonov K.V., Yeletskaya B.Z., Berzina M.Ya., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Fateev I.V., Esipov R.S., Miroshnikov A.I.

Тезисы докладов на конференциях:

1. Берзина М.Я., Елецкая Б.З. “Синтез и свойства новых нуклеозидов, модифицированных по 2 и 6 положениям пуринового основания”. // Материалы ХХІХ Зимней молодежной научной школы «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ». Москва, 7–10 февраля 2017 г.
2. Юфряков В.С., Берзина М.Я. “Синтез и изучение свойств новых 2,6-дизамещенных пуриновых нуклеозидов”. // Материалы ХХХ Зимней молодежной научной школы "ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ". Москва, 12–15 февраля 2018 г.
3. Берзина М.Я., Елецкая Б.З., Юфряков В.С. «ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И СВОЙСТВА 2-ХЛОРПУРИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ РИБО-, 2'-ДЕЗОКСИРИБО И АРАБИНО-РЯДОВ». // Материалы ХХ Научной молодежной конференции «Проблемы и достижения современной химии». Одесса, 27–28 сентября 2018 г.
4. Берзина М.Я., Елецкая Б.З. «НОВЫЕ ПУРИНОВЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ: ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ПОДХОД». // Материалы VIII Молодежной конференции ИОХ РАН. Москва, 22–23 мая 2019 г.
5. Берзина М.Я., Елецкая Б.З., Константинова И.Д., Мирошников А.И., Яковлев Д.С., Султанова К.Т., Агацарская Я.В., Мальцев Д.В., Науменко Л.В., Таран А.В. «НОВЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ 2-ХЛОРАДЕНОЗИНА В КАЧЕСТВЕ АГОНИСТОВ АДЕНОЗИНОВЫХ А1 РЕЦЕПТОРОВ». // Материалы 5-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021». Волгоград, 16–19 мая 2022.
6. Елецкая Б.З., Берзина М.Я., Миронов А.Ф., Жаворонкова О.Н., Гаврилов Л.А., Константинова И.Д., Мелихова Т.Д. «Получение нуклеозид-пептидных конъюгатов методом ферментативной транспептидации для направленной химиотерапии». // Материалы всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика». Новосибирск, 24–28 июля 2022 г.
7. Жаворонкова О.Н., Елецкая Б.З., Гроза Н.В., Берзина М.Я. «СИНТЕЗ НОВЫХ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ – АНАЛОГОВ АГОНИСТОВ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ» // Материалы ХХХV Зимней молодежной научной школы "ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ". Москва, 7–10 февраля 2023 г.
8. Maria Ya. Berzina, Alexey L. Kayushin, Elena V. Dorofeeva, Olga I. Lutonina, Irina D. Konstantinova. «NEW ADENOSINE ANALOGS: CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS». // Abstracts ICPS 2023. Conference: Actual problems of the Chemistry of Natural Compounds. Tashkent, March 15–16, 2023
9. Olga N. Zhavoronkova, Maria Ya. Berzina, Irina D. Konstantinova. «SYNTHESIS OF NEW PURINE NUCLEOSIDES – ANALOGUES OF ADENOSINE RECEPTOR AGONISTS». // Abstracts ICPS 2023. Conference: Actual problems of the Chemistry of Natural Compounds. Tashkent, March 15–16, 2023