

На правах рукописи



Харитоновна Мария Игоревна

Нуклеозиды бензимидазола: синтез и изучение свойств

03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2017

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

академик РАН, доктор химических наук,
профессор, руководитель лаборатории
биотехнологии ИБХ РАН

Мирошников Анатолий Иванович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, руководитель
лаборатории дизайна и синтеза биологически
активных соединений Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки «Институт молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской
академии наук (ИМБ РАН)

Михайлов Сергей Николаевич

кандидат химических наук,
доцент Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский технологический
университет»

Чудинов Михаил Васильевич

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева».

Защита диссертации состоится « 25 » октября 2017 г. в 10 ч 00 мин на заседании
диссертационного совета Д 002.019.01 на базе ИБХ РАН по адресу: 117997, Москва, ул.
Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН по адресу: 117997, Москва, ул.
Миклухо-Маклая, 16/10 и на Интернет-сайте <http://ibch.ru>.

Автореферат разослан « »

2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических
наук

В.А. Олейников

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Нуклеозиды бензимидазола относятся к группе неприродных нуклеозидов, обладающих селективной противовирусной активностью в отношении цитомегаловируса и вируса простого герпеса. К препаратам для лечения инфекций, вызванных этими вирусами (ацикловир, ганцикловир, цидофовир, фоскарнет), со временем часто развивается резистентность, и эффективность терапии снижается. Поэтому является актуальным поиск новых противовирусных средств с отличающимся механизмом действия и обладающих меньшим числом побочных эффектов. Благодаря уникальному механизму действия на мишени, присутствующие только в вирусной клетке, нуклеозиды бензимидазола характеризуются не только избирательной активностью, но и невысокой системной токсичностью.

Получение нуклеозидов на основе как природных пуринов и пиримидинов, так и бензимидазолов, осуществляется чаще всего с помощью многостадийного химического синтеза и требует введения защит в основание и в углеводную часть молекулы, последующего выделения промежуточных продуктов и многоступенчатой очистки целевых соединений. Актуальным является поиск более простого и менее затратного способа получения нуклеозидов бензимидазола. К современным подходам создания гликозидной связи относится реакция трансгликозилирования, осуществляемая генно-инженерными ферментами - нуклеозидфосфорилазами. Реакции ферментативного трансгликозилирования характеризуются регио- и стереоселективностью, позволяют получать целевые нуклеозиды с хорошим выходом, нет необходимости в использовании органических растворителей. Результатом оптимизации и применения такого подхода к синтезу нуклеозидов бензимидазола может стать получение серии новых соединений, представители которых обладают противовирусной активностью.

Цели и задачи исследования

Целью исследования является синтез новых нуклеозидов бензимидазола с помощью ферментов нуклеозидфосфорилаз для создания библиотеки соединений с различными модификациями в гетероциклическом основании и углеводном остатке. Модификации бензимидазола должны проводиться, как в бензольном, так и имидазольном кольцах для того, чтобы по результатам тестирования биологической активности можно было сделать выводы о соотношении "структура - активность" полученных соединений, и скорректировать дальнейшее направление исследований.

Задачи исследования: определение субстратной специфичности пуриನ್ನуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к 4,5,6- и 2,5,6-замещенным бензимидазолам, а также к гетероциклическим основаниям, содержащим в молекуле кроме атома азота, гетероатомы серы или кислорода; оптимизация параметров синтеза нуклеозидов (тип донора углеводной части молекулы, соотношение субстратов, количество ферментов, pH); синтез нескольких серий новых соединений - модифицированных нуклеозидов

бензимидазола - с природными остатками углеводов в молекуле (рибоза и 2-дезоксирибоза), а также нуклеозидов бензимидазола с неприродным углеводным остатком (арабиноза, 2-дезоксид-2-фторарабиноза); изучение биологической активности синтезированных нуклеозидов бензимидазола и их цитотоксичности.

Научная новизна и практическая значимость работы

Определены критерии субстратной специфичности пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к модифицированным бензимидазолам. Получена новая информация о субстратной специфичности пурииннуклеозидфосфорилазы, функционировании активного центра фермента, в том числе за счет проведения исследований на нетипичных для данного фермента субстратах (различных бензоксазолах и бензотиазолах). Разработан и оптимизирован универсальный метод биосинтеза нуклеозидов бензимидазола, который может быть перенесен на соединения данного класса с другими модификациями структуры. Разработанная методика синтеза хорошо воспроизводится, легко масштабируется и может быть внедрена как в лабораторной практике, так и на опытно-промышленных предприятиях биотехнологического профиля для синтеза противовирусных препаратов на основе модифицированных нуклеозидов.

В результате проведенных исследований впервые синтезированы двадцать нуклеозидов бензимидазола с различными заместителями в бензимидазольном кольце и углеводными остатками трех типов (рибоза, 2-дезоксирибоза и 2-дезоксид-2-фторарабиноза) для структурно-функциональных исследований и тестирования биологической активности.

Получены первичные данные *in vitro* о противовирусной и противоопухолевой активности синтезированных нуклеозидов бензимидазола. Определены варианты дальнейшей модификации нуклеозидов для усиления антивирусного эффекта. Среди синтезированных соединений обнаружены несколько активных соединений с достоверной антивирусной активностью в отношении вируса простого герпеса человека первого типа. Одно соединение (2-амино-5,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол) оказалось высокоактивным в отношении указанного типа вируса не только на эталонном штамме, но и на штаммах вируса простого герпеса, устойчивых к действию препаратов, наиболее часто применяемых в лечебной практике (ацикловир, цидофовир и фоскарнет). Эти данные получены впервые, ранее в открытой печати не опубликованы. Наиболее активное соединение является кандидатом для дальнейших доклинических исследований *in vivo* с целью определения возможности его использования в качестве препарата для лечения герпетических инфекций в случаях неэффективности ацикловира. На способ получения активного соединения подана заявка на патент РФ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтез серии 4,6-дифтор-5-замещенных-нуклеозидов бензимидазола рибо- и 2'-дезоксирибо рядов.
2. Синтез серии 2'-дезоксид-2'-фторарабинозидов 5,6-, 4,6- и 4,5,6-замещенных бензимидазолов.

3. Синтез нуклеозидов бензимидазола, модифицированных по C2 положению имидазольного кольца.
4. Исследование субстратной специфичности PNP *E. coli* по отношению к гомологам бензимидазола, у которых один атом азота заменен на гетероатом кислорода или серы.
5. Исследование *in vitro* противовирусной активности модифицированных нуклеозидов бензимидазола и их цитотоксичности на опухолевых клетках человека.

Публикации. По материалам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, и подана 1 заявка на патент РФ.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: II Всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы медицинской науки третьего тысячелетия», 2012, Санкт-Петербург, Россия; 38th FEBS Congress, 2013, Санкт-Петербург, Россия; Уральский научный форум «Современные проблемы органической химии», 2014, Екатеринбург, Россия (диплом за лучший стендовый доклад); EFMC International symposium on medicinal chemistry, 2014, Лиссабон, Португалия; International Congress on Heterocyclic Chemistry "KOST-2015", 2015, Москва, Россия; XII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2016, Париж, Франция; XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2017, Москва, Россия.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 161 странице машинописного текста. Состоит из введения, литературного обзора, результатов и обсуждения, материалов и методов, заключения, списка сокращений, списка литературы, который содержит 185 ссылок, и 32 приложений. Работа содержит 45 рисунков и 28 таблиц.

Основное содержание работы

Нуклеозиды бензимидазола представляют большой интерес для исследователей с точки зрения изучения структурно-функциональных особенностей и избирательной противовирусной активности. Синтез, изучение активности и цитотоксичности нуклеозидов модифицированного бензимидазола является крайне актуальной задачей при создании библиотек новых соединений. Именно благодаря структурному разнообразию синтезируемых нуклеозидов, есть возможность выявления среди них наиболее активных кандидатов, изучения механизмов их действия и получения в результате новых противовирусных препаратов.

1 Синтез модифицированных нуклеозидов бензимидазола с использованием нуклеозидфосфорилаз *E. coli*

Для синтеза модифицированных нуклеозидов в последние годы используется реакция ферментативного трансгликозилирования, осуществляемая нуклеозидфосфорилазами (NPs) *E. coli*. В отличие от химического способа синтеза нуклеозидов,

использование ферментов позволяет проводить реакции в водной среде, исключает необходимость введения защитных групп и многоступенчатую очистку целевых соединений. Реакции стереоспецифичны, характеризуются высокой конверсией оснований в нуклеозиды.

Ранее в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН была синтезирована серия рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов 5-замещенного-6-фтор-бензимидазола (**1**) (Рис. 1). Однако соединения этой серии оказались нецитотоксичными и неактивными в отношении ДНК и РНК вирусов.

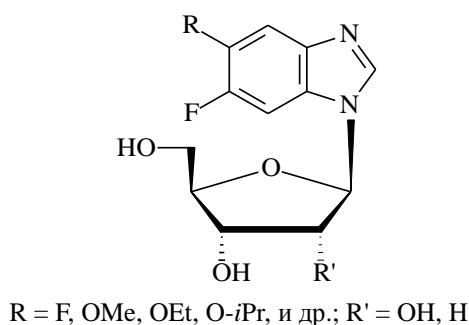


Рис. 1 - Серия 5,6-дизамещенных нуклеозидов бензимидазола (**1**)

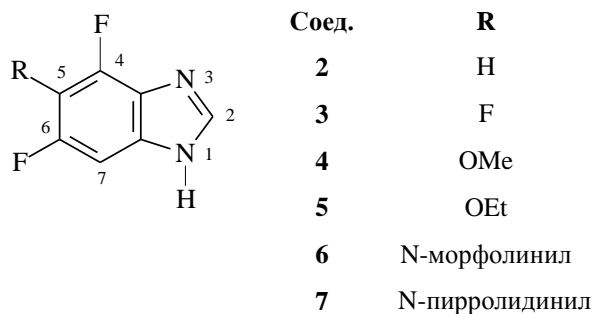
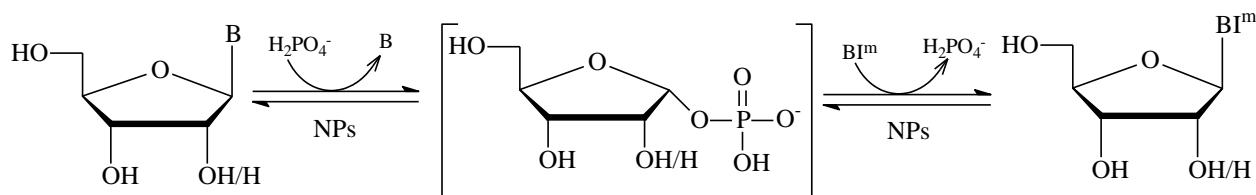


Рис. 2 - 4,5,6-Тризамещенные бензимидазолы, используемые для синтеза нуклеозидов

1.1 Синтез серии 4,6-дифтор-5-замещенных-нуклеозидов бензимидазола рибо- и 2'-дезоксирibo рядов

Известно, что введение дополнительного атома фтора в гетероциклическое основание может повлиять на свойства нуклеозидов, в том числе на их биологическую активность (например, флударабин – С2 фторированный аналог противовирусного препарата видарабина). Мы решили ввести в бензимидазолы серии (**1**) дополнительный атом фтора в С4 положение и синтезировать на их основе новые нуклеозиды, предполагая, что соединения окажутся более активными при таком же низком уровне цитотоксичности. Для этих целей в ИОС УрО РАН (г. Екатеринбург) была получена серия 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов (**2**) - (**7**) (Рис. 2).

На первом этапе синтеза нуклеозидов проводилось изучение субстратно-специфических свойств пурииннуклеозидфосфорилазы (PNP) *E. coli* по отношению к модифицированным бензимидазолам (BI^m) (**2**) - (**7**).



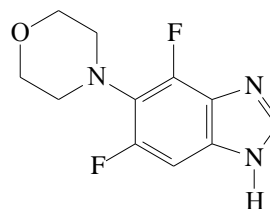
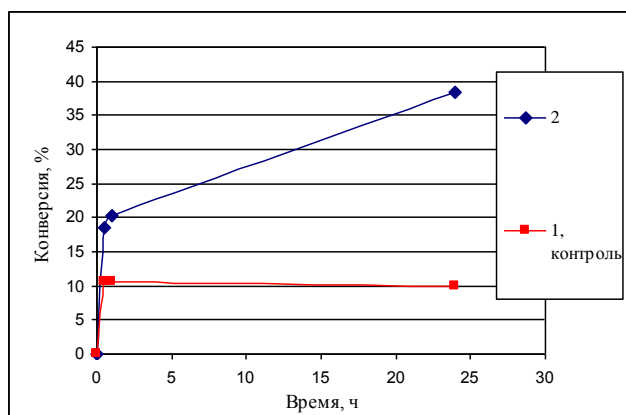
B - природное основание, BI^m - модифицированный бензимидазол, NPs - нуклеозидфосфорилазы

Рис. 3 - Принципиальная схема реакции трансгликозилирования

В реакции трансгликозилирования (схема представлена на рис. 3) с участием неизученных ранее оснований мы ожидали три возможных результата: модифицированное основание могло быть субстратом, ингибитором или ни субстратом, ни ингибитором PNP.

Для изучения субстратной специфичности были приготовлены два типа реакционных смесей: тестовая (с модифицированными основаниями (2) – (7)) и контрольная (без бензимидазолов, содержащая только природный нуклеозид - инозин (Ino)). Оба типа реакционных смесей готовились в калий-фосфатном буфере (pH 7). В каждую реакционную смесь добавляли PNP и термостатировали реакции при 50 °C в течение 2 суток. Заключение о субстратной специфичности делали на основе сравнения количества гипоксантина (Нур) - продукта фосфорилиза инозина - в контрольной и тестовой реакциях, а также по появлению в тестовой реакционной смеси новых нуклеозидов (по данным ВЭЖХ и LC-MS).

Во всех тестовых реакциях были обнаружены новые соединения, при этом скорость образования Нур в тестовых реакциях была выше, чем в контрольных, что говорит о реализации сопряженного процесса – переноса образующегося 1- α -D-рибозилфосфата на модифицированное основание-акцептор. Следовательно, все тестируемые основания - субстраты PNP. Ингибиторов среди 4,5,6-модифицированных оснований обнаружено не было. На рис. 4 приведены данные конверсии Ino в Нур на примере реакции, содержащей основание (6).



(6)

Рис. 4 – Конверсия Ino в Нур (%) в контрольной реакции (1) и тестовой реакции (2)

Тестовые реакции образования рибозидов оснований (2) - (7) проходили в среднем с конверсией 77 %, максимальная конверсия (85 %) наблюдалась для основания (2). Тестовые реакции образования 2'-дезоксирибозидов проводились по той же методике, конверсия составляла в среднем 60 % (донор углеводного остатка - 2'-дезоксиинозин (dIno)).

Следующий этап работ - оптимизация ферментативного способа получения серии модифицированных рибозидов и 2'-дезоксирибозидов (структура соединений представлена на рис. 5). Оптимизацию биосинтеза нуклеозидов проводили по следующим параметрам:

- подбор оптимального донора рибозы или 2'-дезоксирибозы;

- определение оптимального соотношения субстратов (природного нуклеозида к BI^m);
- подбор оптимального количества ферментов - нуклеозидфосфорилаз (NPs).

	Соединение	X	R	Соединение	X	R
	8	OH	H	14	OH	OEt
	9	H		15	H	
	10	OH	F	16	OH	
	11	H		17	H	
	12	OH	OMe	18	OH	
	13	H		19	H	

Рис. 5 - Серия рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов 5-замещенных-4,6-дифторбензимидазолов

Подбор оптимального донора рибозы и 2'-дезоксирибозы осуществлялся по следующей схеме: для каждого модифицированного основания готовилось по три реакционных смеси (1 мл), содержащих каждая один из природных нуклеозидов - уридин (Urd), инозин (Ino), гуанозин (Guo) или их 2'-дезоксиды. Если реакцию трансгликозилирования проводили между пуриновым нуклеозидом и BI^m , в реакционную смесь добавляли один фермент - PNP. В случае использования Urd (dUrd) добавляли два фермента - уридинфосфорилазу (UP) и PNP. Реакции проводились при 50 °С в калий-фосфатном буфере (4 мМ, pH 7), ход реакций контролировали с помощью ВЭЖХ.

Конверсия гетероциклического основания в нуклеозид оказалась выше в случае, когда донором рибозы был Urd (Рис. 6, синтез нуклеозида (**10**) из основания (**3**)).

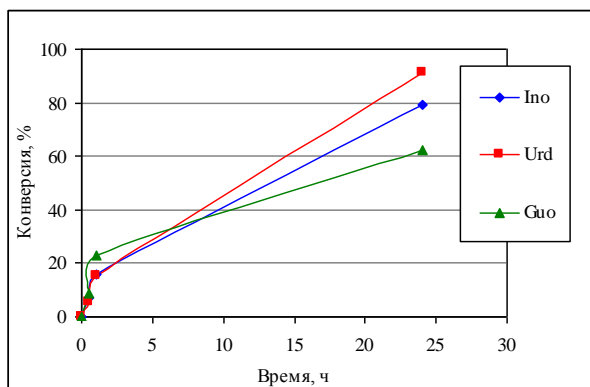


Рис. 6 - Зависимость конверсии основания (**3**) в рибозид (**10**) от типа донора рибофуранозы. Реагенты и условия: донор рибозы (4 мМ), основание (2 мМ), количество PNP или PNP/UP – по 1800 е.а./ммоль субстрата.

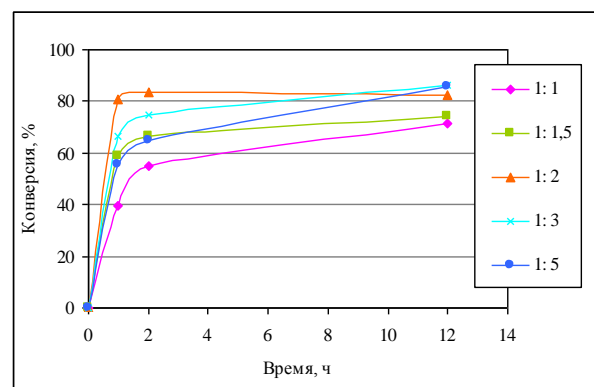


Рис. 7 - Зависимость конверсии основания (**7**) в рибозид (**18**) от соотношения субстратов. Реагенты и условия: основание (2 мМ), Urd (2-10 мМ), количество PNP - 1800 е.а./ммоль основания, UP - от 360 до 1800 е.а./ммоль Urd.

Определение оптимального соотношения субстратов проводилось по похожей методике: готовилось по пять реакционных смесей (1 мл) для каждого BI^m . В каждую реакцию добавлялся Urd (dUrd) в равном отношении к модифицированному основанию, а также в 1.5-, 2-, 3- и 5-ти кратном избытке. Концентрация калий-фосфатного буфера

варьировалась от 2 до 20 мМ. Оказалось, что скорость реакции ферментативного синтеза оптимальна при соотношении природный нуклеозид/ BI^{m} - 2:1, при дальнейшем увеличении количества природного нуклеозида в реакционной смеси степень конверсии основания изменялась незначительно (Рис. 7).

Подбор оптимального количества ферментных препаратов проводился в диапазоне от 90 до 900 е.а./ммоль BI^{m} для PNP и от 60 до 600 е.а./ммоль Urd (dUrd) для UP. В качестве примера на рис. 8 приведены данные реакций, содержащих основание (2). Очень часто в первые часы синтеза рибозидов увеличение количества ферментов приводило к ускорению образования продуктов, а не к увеличению максимальной конверсии (Рис. 8а). Со временем во всех реакциях конверсия основания в нуклеозид достигала примерно одного значения. Поскольку предпочтительнее было сэкономить ферментные препараты, а не сократить время синтеза нуклеозидов, мы решили на этапе наработки рибозидов BI^{m} уменьшить количество PNP и UP в среднем до 45 е.а./ммоль основания и 30 е.а./Urd (dUrd), соответственно.

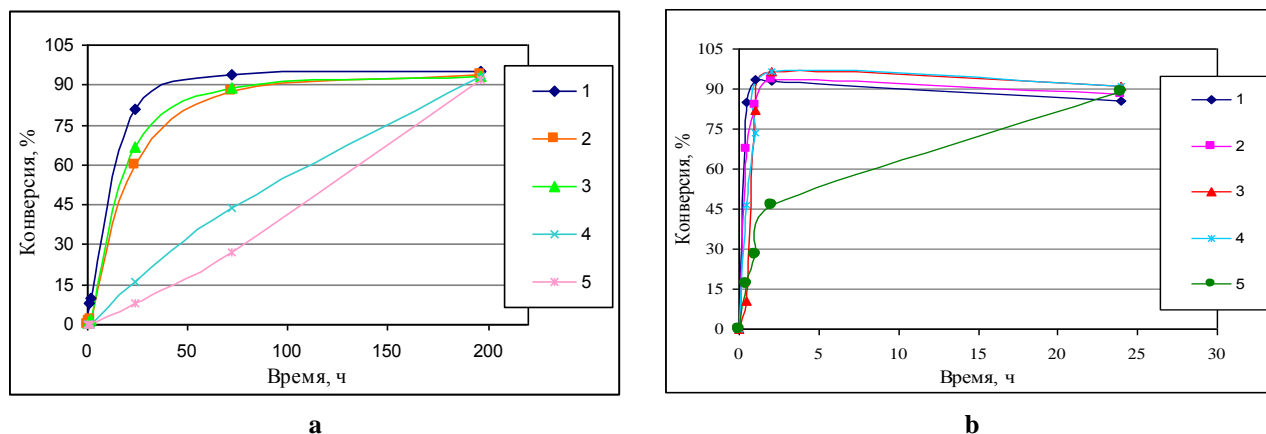


Рис. 8 - Зависимость динамики накопления (а) - рибозида (8) (время синтеза 8 сут) и (б) - 2'-дезоксирибозида (9) (время синтеза 24 ч) от соотношения PNP/UP (е.а./ммоль субстрата): 900/600 (1); 360/240 (2); 360/60 (3); 90/240 (4); 90/60 (5). Реагенты и условия: Urd (dUrd) (6 мМ), основание (4 мМ), KH_2PO_4 (6 мМ), 1 мл.

Синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов, наоборот, не следовало проводить более 3-4 часов, поскольку после достижения максимального значения конверсия снижалась на 10-15 % уже за первые сутки (Рис. 8b). Этот эффект можно объяснить тем, что α -фосфат-2-дезоксирибозы нестабилен в условиях реакции и разрушается до неорганического фосфата и 2-дезоксирибозы, которая выходит из равновесной реакции.

Реакции синтеза нуклеозидов проводились при pH 7, поскольку известно, что оптимальное значение pH реакционной смеси для PNP *E. coli* находится в диапазоне от 6 до 8. Однако, мы провели несколько опытов, подтверждающих, что изменение значений pH, в пределах указанного диапазона практически не влияет на скорость образования рибозидов BI^{m} (Рис. 9). В качестве примера на рис. 9 приведены данные реакции синтеза нуклеозида (8) из основания (2) в диапазоне pH от 4 до 11. Интересно, что реакции трансгликозилирования

проходили даже при значениях рН 4 и 10, хотя и со значительным снижением скорости процесса (Рис. 9б).

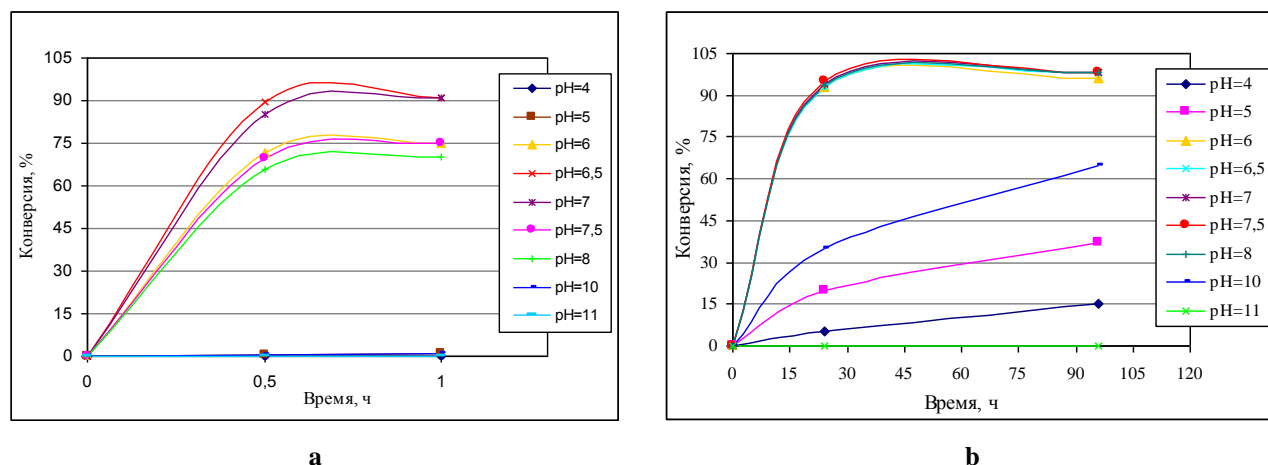


Рис. 9 - Процесс синтеза рибозида (8) в зависимости от рН реакционной смеси (время процесса: **а** - 1 ч, **б** - 96 ч)

Следующий этап после оптимизации условий синтеза - получение нуклеозидов бензимидазола (8) - (19) в количествах, достаточных для исследования активности и цитотоксичности *in vitro*.

Табл. 1 - Экспериментальные данные по ферментативному синтезу β -D-рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов бензимидазола (8) - (19)

Соед.	Объем, мл [мМ KH ₂ PO ₄]	Субстраты			PNP, е.а. (е.а. /ммоль А)	UP, е.а. (е.а. /ммоль Д)	Конверсия, %	Соотношение изомеров (по данным ВЭЖХ)		Выход, % [мг]
		Акцептор, мг (ммоль)	Донор, мг (ммоль)	А/Д				N-1 (а)	N-3 (б)	
8	114 [8]	2 70 (0.46)	Urd 223 (0.91)	1:2	95.2	27 (30)	95.2	87	13	60 [77]
9	114 [5]	2 70 (0.41)	dUrd 156 (0.61)	1:1.5	86.1	73 (120)	86.1	88	12	94 [116]
10	102 [8]	3 70 (0.41)	199 (0.82)	1:2	98.6	98 (120)	98.6	90	9	89 [110]
11	102 [8]	3 70 (0.41)	186 (0.82)	1:2	98.7	197 (240)	98.7	92	8	65 [76]
12	95 [8]	4 70 (0.38)	186 (0.76)	1:2	92.3	23 (30)	92.3	91	9	79 [95]
13	95 [6]	4 70 (0.38)	130 (0.57)	1:1.5	90.5	171 (300)	90.5	94	6	83 [95]
14	88 [6]	4 70 (0.35)	129 (0.53)	1:1.5	96.9	8 (15)	96.9	91	9	70 [82]
15	88 [5]	5 70 (0.35)	100 (0.44)	1:1.3	88.2	158 (360)	88.2	90	10	71 [79]
16	73 [8]	6 70 (0.29)	143 (0.58)	1:2	93.0	17 (30)	93.0	100	-	83 [88]
17	68 [10]	6 65 (0.27)	155 (0.68)	1:2.5	94.3	122 (180)	94.3	100	-	93 [89]
18	157 [4]	7 70 (0.31)	152 (0.63)	1:2	83.8	19 (30)	83.8	100	-	61 [68]
19	157 [4]	7 70 (0.31)	143 (0.63)	1:2	98.7	113 (180)	98.7	89	11	63 [56]

Реакции трансгликозилирования проводили в калий-фосфатном буфере (4-10 мМ, pH 7) при 50 °С (подробные условия ферментативного синтеза указаны в табл. 1). В реакциях было обнаружено образование смеси N1- (**a**) и N3- (**b**) региоизомеров с преобладанием N1-изомера. Только в случае производных морфолина (**16**), (**17**) и рибо-аналога пирролидина (**18**) по данным LC-MS и ЯМР образование N3-региоизомеров обнаружено не было.

Соединения (**10**) и (**11**) были выделены из реакционных смесей кристаллизацией. Остальные продукты были выделены обращенно-фазовой колоночной хроматографией. Конверсия оснований (**2**) - (**7**) в нуклеозиды (**8**) - (**19**) составила от 84 до 99 %. Синтез 2'-дезоксирибозидов завершался в интервале от 0.5 до 3.0 часов, в то время как реакции транскрибозилирования протекали гораздо медленнее: от 1 до 8 дней. Выход целевых нуклеозидов составил от 60 до 94 %, чистота в среднем > 95 % (по ВЭЖХ).

1.2 Синтез серии 2'-дезокси-2'-фторарабинозидов 4,6-, 5,6- и 4,5,6-замещенных бензимидазолов

В продолжение исследований зависимости «структура - активность» в ряду фторированных по основанию нуклеозидов бензимидазола, мы решили заменить природный остаток углевода в молекуле некоторых нуклеозидов на арабинозу и 2'-дезокси-2'-фторарабинозу. Для синтеза было отобрано несколько гетероциклических оснований, содержащих в бензимидазольном кольце только метоксигруппу и атомы фтора, рибозиды или 2'-дезоксирибозиды которых обладали антигерпетической активностью при первичном скрининге (Рис. 10).

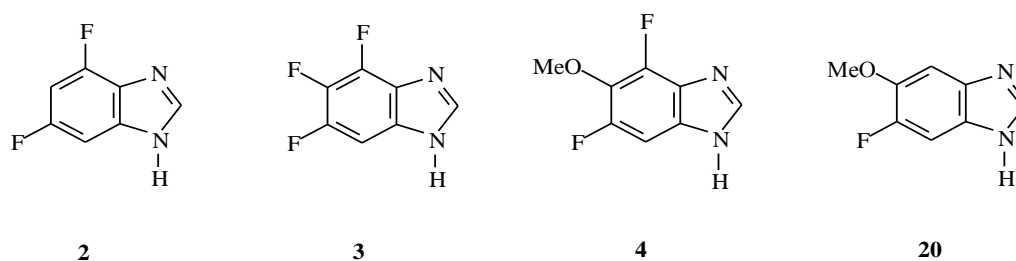
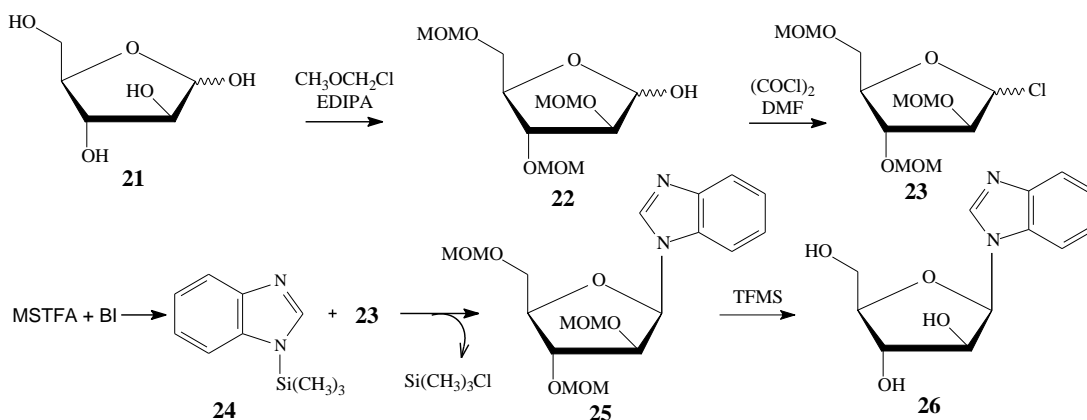


Рис. 10 - Бензимидазолы, отобранные для синтеза арабинозидов и 2'-фторарабинозидов

К сожалению, нам не удалось получить β -D-арабинозиды BI^m (**2**) - (**4**), (**20**) по реакции трансгликозилирования с использованием PNP *E. coli* и 1-(α -D-арабинофуранозил)урацила или 1- α -D-фосфата арабинозы. Это может быть связано с тем, что β -D-арабинозиды BI^m, если и образуются в активном центре PNP, являются ингибиторами фермента. Для того, чтобы установить этот факт и выяснить тип ингибирования PNP, мы синтезировали химически β -D-арабинофуранозид бензимидазола (Ara^{fur}-BI, **26**) по методу, разработанному в нашей лаборатории (Рис. 11). Стандартные методы синтеза нуклеозида (**26**) с использованием ацилированных или бензоилированных

производных арабинозы использовать было нельзя, поскольку в этом случае синтезировались исключительно α -D-арабинозиды бензимидазола.



EDIPA - этил-ди-*i*Pr-амин, MSTFA - N-метил-N-(триметилсилил)-трифторацетамид

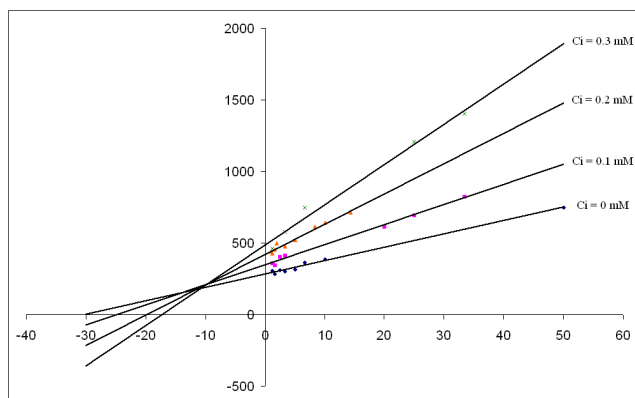
Рис. 11 - Схема синтеза 1-(β-D-арабинофуранозил)бензимидазола (26)

На первом этапе синтеза арабинозу (21) обрабатывали метоксиметилхлоридом (MOM-Cl), в результате чего образовывалась сложная смесь MOM-эфиров, в том числе, MOM-эфир арабинофуранозы со свободной гликозильной OH-группой (22). Дальнейшая обработка эфиров реагентом Вильсмейера (оксалилхлорид/DMF) приводила к образованию смеси 2,3,5-три-*O*-метоксиметил-арабинофуранозил- (23) и пиранозил-хлоридов. В результате последующей реакции с 1-*N*-триметилсилилбензимидазолом (24) и обработки реакционной смеси трифторметансульфокислотой в метаноле были получены β-*D*-арабинопиранозил- и фуранозил- (26) бензимидазолы. β-*D*-Арабинофуранозил бензимидазол (Ara^{fur}-BI, 26) был выделен высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 40 %. Структура соединения (β-*D*-конфигурация) была подтверждена данными ¹H- и двумерной гомо- и гетероядерной ЯМР-спектроскопии: ¹H/¹H-COSY, ¹H/¹³C-HSQC, ¹H/¹³C-NMBC, ¹H/¹⁵N-HSQC, ¹H/¹⁵N-NMBC и [¹H,¹H] NOE спектрами.

Особенность использованного нами метода синтеза заключалась в выборе алкилирующего агента - MOM-Cl, позволяющего получать смесь из двух β-аномеров арабинозилбензимидазола в пиранозной и фуранозной форме (вместо образования смеси из четырех возможных арабинозилнуклезидов). Кроме того, мы обнаружили, что проведение первого этапа синтеза (реакции алкилирования арабинозы (21)) при пониженной температуре в неполярных растворителях (бензол, дихлорметан) приводит к существенному (7:1) преобладанию фуранозного производного (26) по отношению к пиранозному.

При изучении кинетики фосфорилиза инозина с помощью PNP в присутствии Ara^{fur}-BI (26) было показано, что арабинозид является ингибитором PNP смешанного типа, о чем

свидетельствует уменьшение максимальной скорости реакции и увеличение константы Михаэлиса при увеличении концентрации Ara^{fur}-BI (26).



$$V = \frac{V_{\text{MAX}} \cdot S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha \cdot K_i}\right)}$$

Концентрации Ara^{fur}-BI: 0.3; 0.2; 0.1 и 0 мМ. Калий-фосфатный буфер (10 мМ, pH 7), 20 °С, 2 мин, количество PNP - 0.15 мкг/мл, количество Iно - от 0.02 до 1.0 мМ.

Рис. 12 – График Лайнуивера-Берка для фосфоролиза инозина с помощью PNP при разных концентрациях Ara^{fur}-BI (26) и уравнение ингибирования смешанного типа

Константу ингибирования рассчитывали по уравнению ингибирования смешанного типа. Среднее значение K_i составило 0.17 ± 0.04 мМ, а значение α – 2.9 ± 1.0 (график Лайнуивера-Берка (Рис. 12)).

Поскольку мы определили, что арабинозид (26) - ингибитор PNP *E. coli* смешанного типа, его ферментативный синтез с помощью PNP действительно невозможен. Полученные результаты объясняют отсутствие продуктов в ферментативных реакциях синтеза арабинозидов ди- и тризамещенных бензимидазолов.

Совершенно другая ситуация наблюдалась с 2'-дезоксидефторарабинозидами BI^m: тестовые реакции синтеза нуклеозидов (27) - (30) прошли успешно. Было обнаружено, что конверсия модифицированных оснований в 2'-фторарабинозиды колеблется от 24 до 61 % за сутки (Табл. 2). В качестве донора 2'-фторарабинозы использовался 2-дезоксидефтор- α -D-арабинофуранозил-1-фосфат (1-P-FAra), синтезированный в нашей лаборатории.

Табл. 2 - Экспериментальные данные тестовых реакций синтеза 2'-фторарабинозидов (27) - (30)

	R	R'	Основание	Нуклеозид	Конверсия, % (24 ч)
	OMe	H	20	27	38.7
	OMe	F	4	28	61.3
	H	F	2	29	27.3
	F	F	3	30	24.2

Условия ферментативных реакций были оптимизированы по следующим параметрам: определение оптимального соотношения BI^m и 1-P-FAra; подбор оптимального количества фермента - PNP *E. coli*; pH реакционной смеси.

Оптимальная конверсия основания в нуклеозид наблюдалась при соотношении 1-P-FAgа и ВІ^м - 4:1 и 5:1. При дальнейшем увеличении количества 1-P-FAgа в реакционной смеси, конверсия основания в нуклеозид изменялась незначительно (Рис. 13). Данные представлены на примере реакции синтеза нуклеозида (29) из основания (2).

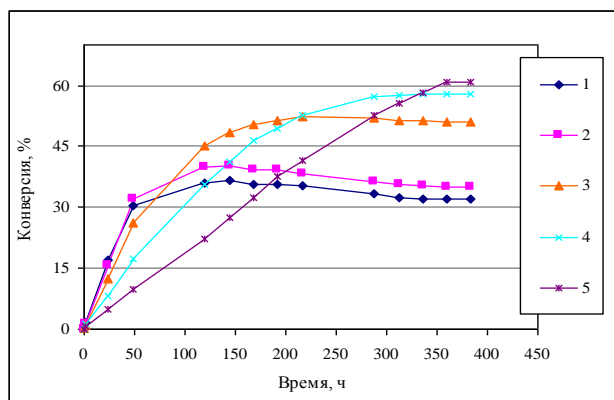


Рис. 13 – Зависимость конверсии основания (2) в нуклеозид (29) от соотношения 1-P-FAgа/основание. Условия реакции: основание (1 мМ) и 1-P-FAgа (X мМ) в 0.5 мл водного раствора (pH 7.0), количество PNP *E. coli* - 14500 е.а., 50 °С, 384 ч. X = (1) 2 мМ; (2) 3 мМ; (3) 4 мМ; (4) 5 мМ; (5) 10 мМ.

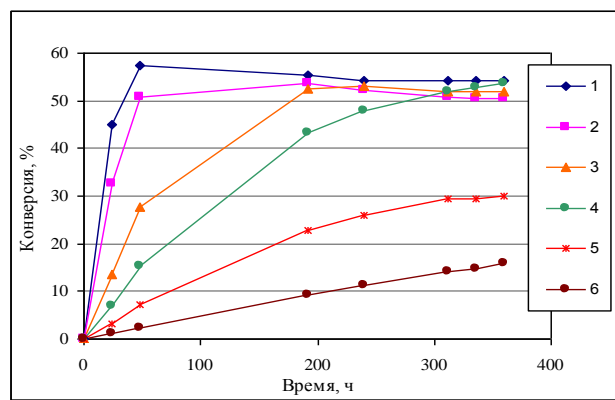


Рис. 14 – Зависимость конверсии основания (2) в нуклеозид (29) от количества PNP. Условия реакции: основание (1 мМ) и 1-P-FAgа (5 мМ) в 0.5 мл водного раствора (pH 7.0), 50 °С, 360 ч, количество PNP *E. coli* (е.а./ммоль основания): 14500 (1); 8700 (2); 2900 (3); 1450 (4); 580 (5); 145 (6).

При оптимизации количества PNP исследовался диапазон от 145 до 14500 е.а./ммоль ВІ^м. Из данных, приведенных на рис. 14, очевидно, что в первые часы синтеза увеличение количества фермента приводило к ускорению образования продуктов. Однако со временем в реакциях 1 - 4 (PNP ≥ 1450 е.а./ммоль ВІ^м) конверсия основания в нуклеозид составила примерно 50 % (Рис. 14, синтез нуклеозида (29)).

В синтезе 2'-фторарабинозидов изменение значений pH в пределах от 6 до 8 практически не влияло на скорость образования нуклеозидов. Однако стоит заметить, что значение pH 10 оказалось критичным для данного ферментативного синтеза: образования 2'-фторарабинозидов в таких условиях не наблюдалось. Интересно, что синтез рибозидов и 2'-дезоксирибозидов (8) - (19) проходил (хотя и со значительным снижением скорости процесса) даже при критических значениях pH 4 и 10.

Несмотря на то, что 2'-фторарабинозиды являются неприродными соединениями и 2'-фторарабиноза является нетипичным субстратом для PNP, после оптимизации условий удалось синтезировать нуклеозиды (27) - (30) с конверсией от 46 до 88 %. Как и в случае синтеза рибозидов и 2'-дезоксирибозидов, в реакциях наблюдалось образование смеси N1 (а) и N3 (b) региоизомеров, с преобладанием N1-изомера. Время синтеза 2'-фторарабинозидов варьировалось от 2 дней для соединения (28) до 26 дней для соединения (29).

После достижения максимальной конверсии реакции останавливали добавлением этанола и целевые соединения (изомеры а) выделяли из реакционных смесей обращенно-

фазовой колоночной хроматографией. Экспериментальные данные синтеза 2'-фтор-арабинозидов бензимидазола представлены в табл. 3.

Табл. 3 – Экспериментальные данные синтеза β -D-2'-дезоксид-2'-фтор-арабинозидов бензимидазола

Соед.	А	Акцептор, мг (ммоль)	Донор (1-P-FAra), мг (ммоль)	Соотнош. А/Д	PNP, е.а. (е.а./ммоль основания)	Конверсия %	Соотнош. изомеров (по данным ВЭЖХ)		Выход, % [мг]
		А	Д				a	b	
27	20	50 (0.30)	176 (0.72)	1:2.5	330 (1100)	88	60	40	42 [38]
28	4	50 (0.27)	133 (0.54)	1:2	250 (925)	63	96	4	55 [47]
29	2	50 (0.32)	395 (1.62)	1:5	660 (2061)	62	98	2	40.5 [38]
30	3	70 (0.41)	170 (0.71)	1:2	786 (1917)	46	96	4	40 [21]

Серия из четырех 2'-фторарабинозидов была синтезирована в количествах, достаточных для исследования активности и цитотоксичности *in vitro*. Выход нуклеозидов составил от 40 до 55 %, чистота > 98 % (по данным ВЭЖХ).

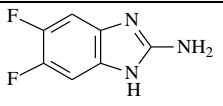
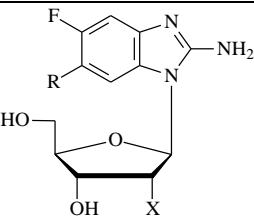
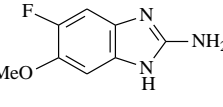
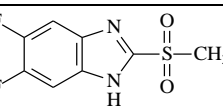
1.3 Синтез нуклеозидов бензимидазола, модифицированных по С2 положению бензимидазольного кольца

Еще одним вариантом модификации структуры нуклеозидов бензимидазола с целью усиления противовирусной активности является введение заместителя во второе положение имидазольного кольца. Однако синтез таких нуклеозидов ограничен структурными особенностями активного центра фермента: известно, что 2-аминобензимидазол является хорошим субстратом для PNP *E. coli*, а использование оснований с 2-изопропиламино- или другими объемными заместителями во 2-ом положении имидазольного кольца невозможно. Ограничение субстратной специфичности PNP подтверждено в отношении гетероциклических оснований пуринового ряда, имеющих объемные заместители в восьмом положении кольца, которое соответствует С2 положению бензимидазола.

Поэтому мы решили изучить возможность использования именно 2-аминопроизводного 5,6-дифторбензимидазола (**37**) для синтеза рибозидов и 2'-дезоксирибозидов, а также проверить субстратную специфичность PNP по отношению к 2-амино-5-фтор-6-метоксибензимидазолу (**38**) и 2-метансульфонил-5,6-дифторбензимидазолу (**42**) (Табл. 4).

Как мы и ожидали, в реакционных смесях с основаниями (**37**) и (**38**) по данным LC-MS были обнаружены новые соединения - рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозиды 2-аминобензимидазолов (**43**) - (**46**) (Табл. 4). В тестовой реакции с основанием (**42**) не наблюдалось образования нового продукта, а фосфоролиз природного нуклеозидов в присутствии модифицированного основания шел с такой же скоростью, что и в контрольной реакции, следовательно, основание (**42**) - ни субстрат, ни ингибитор PNP.

Табл. 4 - Определению субстратной специфичности PNP по отношению к C2-замещенным ВГ^{III}

Основание	Субстрат/не субстрат	Нуклеозид	Конверсия основания в рибозид, %	Конверсия основания в 2'-дезоксирибозид, %
 37	субстрат	 R=F, X=OH (43), X=H (44) R=OMe, X=OH (45), X=H (46)	36.4	50.0
 38	субстрат		20.5	40.0
 42	не субстрат	-	-	-

Ферментативный синтез 2-амино-5,6-дифтор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазола (**43**) был оптимизирован по следующей схеме: выбор донора рибозы, подбор соотношения исходного основания (**37**) и Urd, подбор оптимального количества ферментов - нуклеозидфосфорилаз (PNP и UP) (Рис. 15 - 17). По такому же алгоритму был оптимизирован синтез остальных C-2-замещенных нуклеозидов (**44**) - (**46**).

В результате было установлено, что лучшим донором в реакции рибозилирования является Urd, оптимальное соотношение основания к Urd составляет 1:5, а оптимальное количество ферментов варьируется для PNP от 725 до 2420 е.а./ммоль основания, а для UP - от 64 до 200 е.а./ммоль Urd.

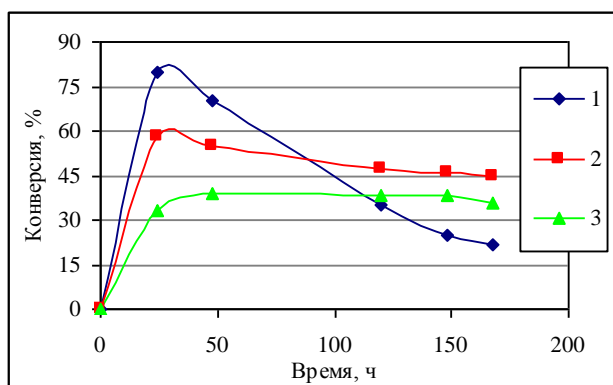


Рис. 15 – Зависимость конверсии основания (**37**) в рибозид (**43**) от типа донора рибофуранозы (1-Urd, 2-Ino, 3-Guo). Реагенты и условия: основание (2 мМ), донор остатка рибозы (4 мМ), буфер (рН 7.0, 4 мМ КН₂РO₄, 1 мл), 2900 е.а. PNP и 900 е.а. UP (только в реакции с Urd), 50 °С, 168 ч.

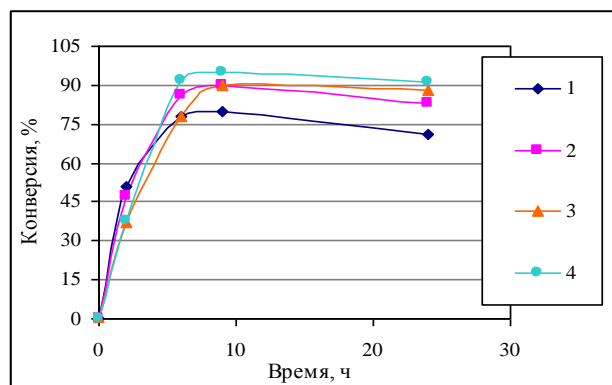


Рис. 16 – Зависимость конверсии основания (**37**) в рибозид (**43**) от соотношения Urd/основание. Реагенты и условия: основание (2 мМ), Urd (X мМ), буфер (рН 7.0, X мМ КН₂РO₄, 1 мл), 3625 е.а. PNP и 1125 е.а. UP, 50 °С, 96 ч. X = (1) 4 мМ, (2) 6 мМ, (3) 10 мМ, (4) 20 мМ.

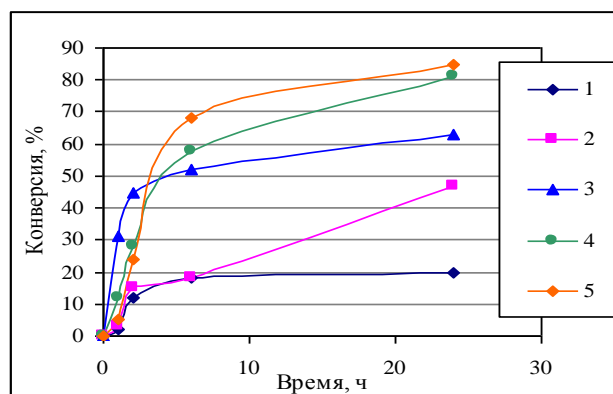


Рис. 17 – Зависимость конверсии основания (**37**) в рибозид (**43**) от количества NPs. Реагенты и условия: основание (2 мМ), Urd (10 мМ), буфер (рН 7.0, 10 мМ KH_2PO_4 , 1 мл), X е.а./ммоль основания PNP и Y е.а./ммоль Urd UP, 50 °С, 24 ч. X/Y: 145/90 (**1**); 145/450 (**2**); 725/450 (**3**); 1450/90 (**4**), 2420/200 (**5**).

В реакции синтеза 2'-дезоксирибозида (**44**) лучшим донором оказался 2'-дезоксиинозин (dIno), соотношение основание/dIno составило 1:3, а количество PNP - 215 е.а./ммоль основания. В реакции синтеза 2'-дезоксирибозида (**46**) лучшим донором оказался 2'-дезоксиуридин (dUrd), соотношение основание/dUrd составило 1:7, количество PNP - 363 е.а./ммоль основания, количество UP - 32 е.а./ммоль dUrd.

Реакции наработки проводились в калий-фосфатном буфере (рН 7) при 50 °С (подробные условия представлены в табл. 5). Время синтеза нуклеозидов варьировалось от 8 часов для 2'-дезоксирибозида (**46**) до 20 дней для рибозида (**45**). Выход нуклеозидов (**43**) и (**44**) составил 87 и 35 %, а нуклеозидов (**45**) и (**46**) - 55 и 35 %, чистота синтезированных соединений превышала 98 % (по данным ВЭЖХ).

Арабинозиды 2-амино-5,6-дифторбензимидазола (**37**) и 2-амино-5-фтор-6-метоксибензимидазола (**38**) с помощью реакции ферментативного трансгликозилирования синтезировать не удалось. Реакции с 1-фосфат-2-деокси-2-фтор- α -D-арабинозой протекали с очень низкой конверсией: 9 % - для основания (**37**) и 2 % - для основания (**38**). Наличие в реакционной смеси 2'-фторарабинозидов было подтверждено данными LC-MS.

Табл. 5 – Экспериментальные данные синтеза β -D-нуклеозидов 2-амино-5,6-замещенных бензимидазолов (**43**) - (**46**)

Соед.	Акцептор (А), г (ммоль)	Донор (Д), г (ммоль)	Соотнош. А/Д	PNP/UP, е.а. (е.а./ммоль субстрата)	Конверсия, %	Соотнош. изомеров (по данным ВЭЖХ)		Выход, % [мг]
						N-1 (a)	N-3 (b)	
43	37 0.30 (1.77)	Urd 2.17 (8.86)	1:2.5	4280/1770 (2418/200)	95	-	-	87 [620]
44	37 0.10 (0.6)	dIno 0.40 (1.78)	1:2	130/- (217/-)	50	-	-	35 [40]
45	38 0.05 (0.28)	Urd 0.47 (1.92)	1:7	203/123 (725/64)	82	55	45	55 [47]
46	38 0.05(0.28)	dUrd 0.40 (1.93)	1:7	102/62 (364/32)	56	25	75	35 [29]

Все синтезированные нуклеозиды бензимидазола были полностью охарактеризованы данными УФ-, масс- и ЯМР (^1H , ^{13}C и ^{15}N) спектров, включая $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ и $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ 2D: COSY, HSQC, HMBC и NOE спектры.

Из нуклеозида (**43**) мы попробовали синтезировать химически 2-изопропиламино-5,6-дифтор-1-(β -D-рибофуранозил)бензимидазол (**49**) - 5,6-дифтор-аналог марибавира (2-изопропиламино-5,6-дихлор-1-(β -L-рибофуранозил)бензимидазола) - единственного на данный момент нуклеозида B1^{m} с клинически доказанной эффективностью. После обработки нуклеозида (**43**) изопропилбромидом в диметилформамиде (DMF) в присутствии диизопропилэтиламина (DIEA) при 100 °C в реакционной смеси был обнаружен нуклеозид (**54**) (содержание 57 % по данным LC-MS). При замене DMF на ацетонитрил содержание целевого нуклеозида (**49**) в реакционной смеси составило всего 0.3 % (по данным LC-MS) (Рис. 18).

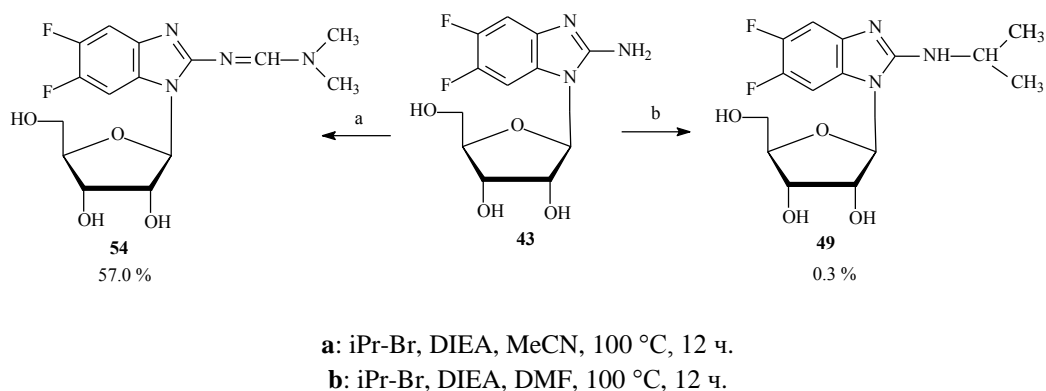


Рис. 18 - Конверсия нуклеозида (**43**) в 2-замещенные рибозиды (**49**) и (**54**)

Мы пробовали использовать в качестве основания вместо DIEA 1,5-диазабицикло[5.4.0]ундец-5-ен. Однако, при температуре 60 °C нуклеозид (**49**) не образовывался, а увеличение температуры до 100 °C приводило к разрушению гликозидной связи нуклеозида (**43**).

Очевидно, что такой подход нельзя использовать для получения рибозида (**49**), но его можно применять для синтеза нуклеозида (**54**), который, возможно, будет обладать интересным профилем противовирусной активности.

2 Исследование субстратной специфичности PNP *E. coli* по отношению к гомологам бензимидазола, у которых один атом азота заменен на гетероатом кислорода или серы

Известно, что PNP *E. coli* обладает широкой субстратной специфичностью: воспринимает в качестве субстратов различные структурные аналоги пуринов, в том числе 8-аза-7-дезаза-пурины, а также бензимидазол и 2-аминобензимидазол, которые являются очень хорошими субстратами для фермента (конверсия в рибозиды до 80 %). Нам стало интересно проверить субстратную специфичность PNP по отношению к основаниям, содержащим в

пятичленном кольце кроме азота гетероатомы серы или кислорода (**59**), (**61**), (**63**) - (**64**), и их 2-аминопроизводным (**60**), (**62**) (Рис. 19).

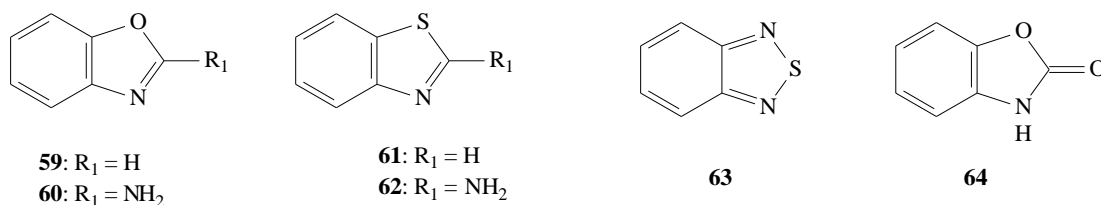


Рис. 19 - Основания, содержащие в пятичленном кольце атомы азота, серы или кислорода (**59**) - (**64**)

Для определения субстратной специфичности PNP готовились тестовые реакции, содержащие модифицированные основания (**59**) - (**64**) и один из доноров углевода (Ino, Urd, dUrd или тимидин (Thd)) и контрольные реакции, содержащие бензимидазол (**58**) или 2-аминобензимидазол (**50**) и Ino (dUrd). Реакции проводились по стандартной схеме (Рис. 20) в калий-фосфатном буфере (pH 7) при 50 °С, с добавлением ферментов (только PNP - в реакции с Ino, PNP и TP - в реакции с Thd, PNP и UP - в реакции с Urd (dUrd)).

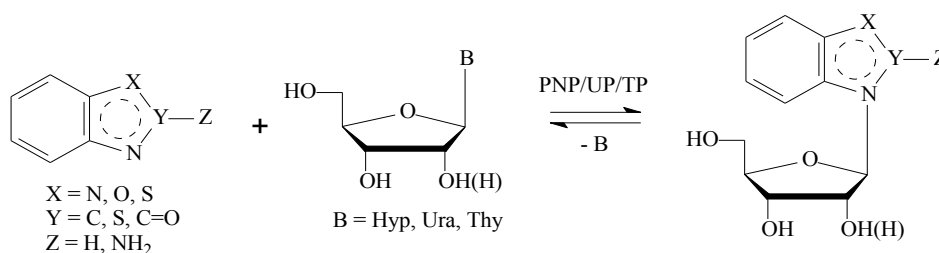


Рис. 20 – Общая схема реакции трансгликозилирования бензимидазола и его гомологов

Результаты реакций показали, что бензоксазол (**59**) и бензотиазол (**61**) не являются субстратами для PNP, в реакциях с основаниями (**63**), (**64**) продукты также не были обнаружены (по ВЭЖХ и LC-MS). Бензоксазол (**59**) при длительной экспозиции в водной среде (без добавления PNP) разрушался с образованием *o*-аминофенола. Только в реакции с 2-амино-1,3-бензоксазолом (**60**) был получен нуклеозид, в то время как в реакции с другим аминопроизводным - 2-амино-1,3-бензотиазолом (**62**), - продуктов обнаружено не было.

После оптимизации синтеза рибозида 2-амино-1,3-бензоксазола (**60**), его получения, выделения из реакционной смеси и расшифровки ЯМР спектров, было обнаружено, что у продукта образование гликозидной связи прошло не по N1-атому бензоксазола, а через 2-аминогруппу и, кроме того, вместо рибофуранозида 2-аминобензоксазола (**69**) образовалось пиранозное производное (**71**). В случае синтеза 2'-дезоксирибозида 2-амино-1,3-бензоксазола наблюдалась аналогичная ситуация - образовывался пиранозид по 2-аминогруппе (**72**) (Рис. 21). По всей вероятности в водных растворах происходила настолько быстрая перегруппировка фуранозидов (**69**) и (**70**) в пиранозиды (**71**) и (**72**), что присутствие фуранозидов в реакционных смесях обнаружить мы не смогли.

Нуклеозиды (**71**) и (**72**) были выделены из реакционных смесей обращенно-фазовой колоночной хроматографией с выходами 25 и 8 % и чистотой 94 % (по данным ВЭЖХ).

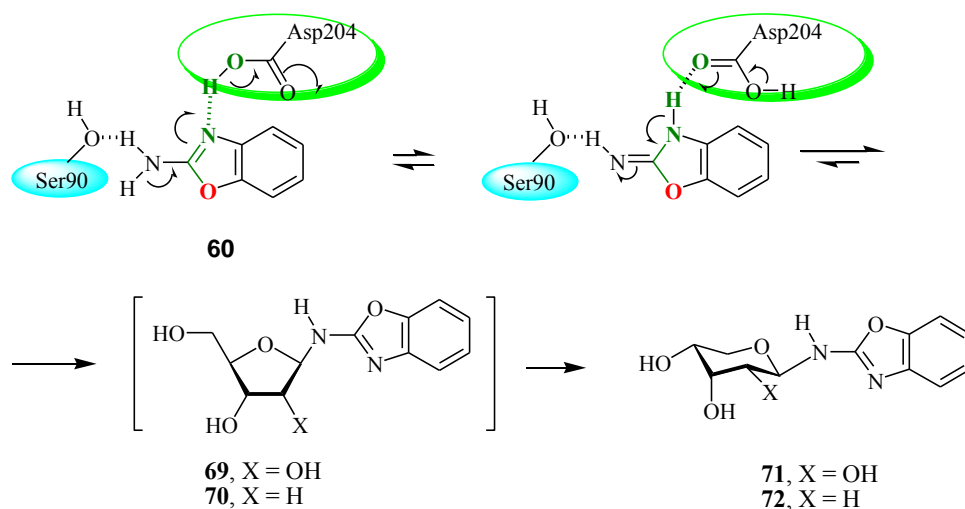


Рис. 21 – Предполагаемый механизм образования водородных связей между 2-амино-1,3-бензоксазолом (**60**) и аминокислотами активного центра PNP *E. coli*, приводящий к образованию продуктов гликозилирования (**71**) и (**72**)

Таким образом, исследование субстратной специфичности PNP по отношению к гомологам бензимидазола, у которых один атом азота заменен на гетероатом кислорода или серы, показало, что для проявления ферментом акцепторных свойств необходимо наличие второго атома азота в пятичленном цикле ароматической системы: ни бензоксазолы, ни бензтиазолы не являются субстратами PNP.

3 Тестирование активности *in vitro* синтезированных нуклеозидов бензимидазола

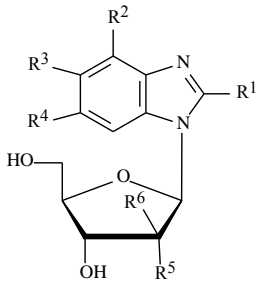
3.1 Исследование активности нуклеозидов бензимидазола серий рибо-, 2'-дезоксирибо- и 2'-фторарабино- в отношении HSV-1

Противовирусная активность нуклеозидов (**8**) - (**19**) и (**27**) - (**30**) и их цитотоксичность была исследована по отношению к эталонному штамму вируса простого герпеса 1-го типа (HSV-1/L₂) в культуре клеток Vero Еб. Синтезированные нуклеозиды характеризовались низкой цитотоксичностью (CD₅₀ у преобладающего числа нуклеозидов > 1000 мкг/мл, Табл. 6), наиболее токсичными соединениями оказались 2'-фторарабинозиды (**27**) и (**28**), а также 2'-дезоксирибозид пиррольного производного (**19**).

Строгую корреляцию между структурой соединений и их активностью установить не удалось. Некая закономерность наблюдалась только при рассмотрении нуклеозидов с объемными заместителями в 5 положении бензимидазольного кольца: нуклеозиды морфолинового производного оказались абсолютно неактивны и нецитотоксичны, а нуклеозиды производных с пирролидино- и этокси- заместителями по 5 положению проявили

минимальную активность.

Табл. 6 – Определение противовирусной активности и цитотоксичности нуклеозидов бензимидазола на модели вируса HSV-1/L₂ в культуре клеток *Vero E6*

	Соед.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	CD ₅₀ , мкг/мл	EC ₅₀ , мкг/мл	ХТИ
	1	H	H	OMe	F	OH	H	>1000	>1000	0
27	27	H	H	OMe	F	H	H	>1000	>1000	0
	27	H	H	OMe	F	H	F	250	31	8
8	8	H	F	H	F	OH	H	750	500	1.5
	9	H	F	H	F	H	H	710	>500	0
29	29	H	F	H	F	H	F	>1000	125	8
	10	H	F	F	F	OH	H	550	60	9
11	11	H	F	F	F	H	H	650	>500	0
	30	H	F	F	F	H	F	760	125	6
12	12	H	F	OMe	F	OH	H	>1000	>1000	0
	13	H	F	OMe	F	H	H	750	190	4
28	28	H	F	OMe	F	H	F	490	>500	0
	14	H	F	OEt	F	OH	H	730	375	2
15	15	H	F	OEt	F	H	H	740	500	1.5
	16	H	F	N-морфолин	F	OH	H	>1000	>1000	0
17	17	H	F	N-морфолин	F	H	H	>1000	>1000	0
	18	H	F	N-пиррол	F	OH	H	>1000	1000	>1
19	19	H	F	N-пиррол	F	H	H	500	250	2
	43	NH ₂	H	F	F	OH	H	>1000	31	32
44	44	NH ₂	H	F	F	H	H	>1000	250	>4
	45	NH ₂	H	OMe	F	OH	H	>750	750	0
	46	NH ₂	H	OMe	F	H	H	>750	750	0

В ряду 5-метокси-4,6-дифтор-производных наибольшую активность проявил 2'-дезоксирибозид (**13**), в то время как 2'-дезоксидефторарабинозид (**28**) не оказывал влияние на развитие вируса. 2'-Дезокси-2'-фторарабинозид 5-метокси-6-фтор-бензимидазола (**27**) проявил достоверную селективную активность в нетоксичных концентрациях (химиотерапевтический индекс (ХТИ) = 8), при том, что данный нуклеозид является самым цитотоксичным соединением из исследованных нуклеозидов. Среди нуклеозидов ди- и трифторированного бензимидазола активными оказались 2'-фторарабинозиды (**29**) и (**30**) и рибозид (**10**). Причем 2'-фторарабинозид дифторированного бензимидазола (**29**) характеризовался низкой цитотоксичностью (CD₅₀ > 1000 мкг/мл) при ХТИ > 8.

Таким образом было получено пять соединений (β-D-фуранозидов бензимидазола), проявляющих достоверную активность против HSV-1: 4,5,6-трифтор-1-рибозид (**10**), 5-метокси-6-фтор-1-2'-дезоксидефторарабинозид (**27**) и 4,6-дифтор-1-2'-дезоксидефторарабинозид (**29**) с ХТИ > 8, а также 4,5,6-трифтор-1-2'-дезоксидефторарабинозид (**30**) (ХТИ = 6) и 5-метокси-4,6-фтор-1-2'-дезоксирибозид (**13**) (ХТИ = 4).

3.2 Исследование активности модифицированных нуклеозидов 5,6-замещенного-2-аминобензимидазола в отношении HSV-1

Противовирусная активность нуклеозидов (**43**) - (**46**) была исследована по отношению к эталонному штамму вируса простого герпеса 1-го типа (HSV-1/L₂).

Нуклеозиды показали низкую цитотоксичность в культуре клеток Vero E6. Соединения (44) - (46) оказались неактивными в исследуемых условиях. Рибозид (43) показал значительную селективную активность на модели эталонного штамма HSV-1/L₂ (ХТИ > 32, Табл. 6), значительно превосходящую активность остальных нуклеозидов (в том числе серии рибо, 2'-дезоксирибо и 2'-фторарабино). Рибозид (43) был исследован более подробно в отношении пяти штаммов HSV-1, резистентных к действию ацикловира (АЦВ), цидофовира (ЦДВ) и фоскарнета (тринатриевой соли фосфономуравьиной кислоты, ФМК).

Было выявлено, что селективность противогерпесвирусного действия рибозида (43) превосходит активность рибавирина и что соединение (43) проявляет активность по отношению к штаммам вируса, устойчивым к ФМК (по рекомендациям ВОЗ - препарат выбора в случаях неэффективности лекарственных средств первого ряда: АЦВ, валацикловира, фамцикловира). Следовательно, рибозид (43) сравним по активности с ФМК. Также было установлено, что рибозид (43) эффективно ингибирует репродукцию всех включенных в исследование вариантов HSV-1, в том числе АЦВ-резистентных штаммов. Кроме того, были получены принципиально новые сведения о том, что выраженность противовирусного эффекта у рибозида (43) не зависит от функциональной активности тимидинкиназы вируса. Мутации в гене ДНК-полимеразы, связанные с лекарственной резистентностью к АЦВ, ФМК или ЦДВ, также не влияют на выраженность противовирусной активности. Таким образом, 2-амино-5,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (43) эффективно преодолевает барьер лекарственной резистентности к АЦВ на модели герпетической инфекции, что указывает на возможную перспективность его использования в качестве препарата выбора для лечения герпетических инфекций в случаях неэффективности АЦВ.

3.3 Исследование противовирусной активности новых нуклеозидов бензимидазола в отношении инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита

Противовирусная активность нуклеозидов бензимидазола (8) - (19) и (27) - (30) была исследована на экспериментальной модели инфекции, вызванной штаммом Абсеттаров вируса клещевого энцефалита (КЭ) в культуре клеток Vero-V. Было выявлено, что ни одно из соединений не обладает цитотоксичностью в диапазоне исследуемых концентраций. По данным первичного скрининга для более подробного изучения противовирусной активности были отобраны нуклеозиды (9), (10), (13), (16) и (17). Было выявлено, что четыре нуклеозида (10), (13), (16), (17) обладают способностью защищать культуры клеток Vero-V от литического действия вируса КЭ, причем максимальной противовирусной активностью характеризуется 5-морфолино-4,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (16). Противовирусные свойства нуклеозидов преимущественно проявлялись при обработке клеток за 24 часа до заражения вирусом и в момент инфицирования, следовательно

нуклеозиды бензимидазола представляют интерес для дальнейшего изучения в качестве перспективных соединений для профилактики клещевого энцефалита.

3.4 Исследование *in vitro* цитотоксической активности нуклеозидов бензимидазола на опухолевых клетках лейкемической моноцитарной лимфомы человека U937

Для исследования противоопухолевой активности на клетках лейкемической моноцитарной лимфомы человека линии U937 было отобрано на основании данных первичного скрининга противовирусной активности пять нуклеозидов бензимидазола (10), (27) - (30), максимально токсичных для культуры клеток. Соединение считали активным, если его концентрация, вызывающая ингибирование роста клеток на 50 %, была меньше или равна таковой для стандарта сравнения - неларабина. К сожалению, изученные нуклеозиды не проявили противоопухолевой активности в соответствии с заданными критериями.

Заключение

В результате проведенных исследований были:

1. Определены критерии субстратной специфичности пуриннуклеозидфосфорилазы (PNP) *E. coli* по отношению к модифицированным бензимидазолам. Показано, что:

- 4,6-дизамещенные и 4,5,6-тризамещенные бензимидазолы являются субстратами нуклеозидфосфорилаз в реакциях рибозилирования и 2'-дезоксирибозилирования; конверсия основания в нуклеозиды составляет от 83 до 99 %;
- оптимизация ферментативного синтеза 2'-дезоксидефторарабинозидов позволила достичь в среднем конверсии замещенных бензимидазолов в нуклеозиды около 65 %, при том, что оба субстрата реакции (1- α -фосфат-2'-дезоксидефторарабинозы и основание) структурно отличаются от природных субстратов PNP;
- C2-амино-5,6-дизамещенные бензимидазолы являются субстратами PNP, однако конверсия оснований в 2'-дезоксирибозиды не превышает 56 %, а конверсия в рибозиды составляет 82 и 95 %;
- активный центр PNP акцептирует бензимидазолы как с небольшими по объему заместителями (фтор, метокси, этокси), так и с объемными (морфолин, пиррол) в C5 (или C6) положениях бензольного кольца;
- в результате ферментативной реакции синтеза нуклеозидов бензимидазола образуется смесь N1-N3 региоизомеров: в случае с морфолин- и пиррол- содержащими основаниями образуется всего 1-3 % N3-изомера в результате гликозилирования, что свидетельствует об ограниченности степени толерантности активного центра PNP к заместителям в C6 положении бензимидазола (проекция C2-положения пуринов);
- невозможность синтеза арабинозидов бензимидазола по реакции трансгликозилирования может быть связана с образованием в активном центре PNP

арабинозидов, являющихся ингибиторами смешанного типа данного фермента (доказано на примере 1-(β -D-арабинофуранозил)бензимидазола, $K_i 0.17 \pm 0.04$ мМ);

- исследование субстратной специфичности PNP по отношению к гомологам бензимидазола, у которых один атом азота заменен на гетероатом кислорода или серы, показало, что для проявления ферментом акцепторных свойств необходимо наличие второго атома азота в пятичленном цикле ароматической системы: ни бензоксазолы, ни бензтиазолы не являются субстратами PNP;

- PNP *E. coli* способна осуществлять неспецифические реакции гликозилирования по 2-амино-группе бензоксазола, причем в результате реакции сначала синтезируется β -D-фуранозид, который затем изомеризуется в β -D-пиранозид 2-аминобензоксазола.

2. Оптимизированы методы биосинтеза и получена серия новых нуклеозидов с различными заместителями в бензимидазольном кольце и углеводными остатками трех типов (рибоза, 2-дезоксирибоза и 2-дезоксидефторарабиноза) для тестирования биологической активности:

- 4,6-дифтор-5-замещенные-нуклеозиды бензимидазола рибо- и 2'-дезоксириборядов (12 соединений с выходами от 60 до 94 % и чистотой в среднем > 95 %);

- 2'-дезоксидефторарабинозиды 5,6-, 4,6- и 4,5,6-замещенного бензимидазол (4 соединения с выходом от 40 до 55 % и чистотой > 98 %);

- 2-амино-5,6-дизамещенные нуклеозиды бензимидазола рибо- и 2-дезоксириборядов (4 соединения с выходом от 35 до 87 % и чистотой > 98 %).

3. Проведено изучение противовирусной активности всех синтезированных нуклеозидов на моделях вируса простого герпеса 1-го типа (HSV-1, эталонный штамм L_2) и вируса клещевого энцефалита (штамм Абсеттаров). Показано, что рибозид 2-амино-5,6-дифторбензимидазола в нецитотоксичных концентрациях проявляет выраженный селективный противовирусный эффект в отношении HSV-1 (ХТИ = 32), в том числе в отношении штаммов с лекарственной резистентностью. Получены принципиально новые результаты: выраженность противовирусного эффекта нуклеозида не зависит от функциональной активности тимидинкиназы вируса простого герпеса. Установленный результат предполагает наличие иного неизвестного механизма действия данного нуклеозида бензимидазола.

4. Исследование противоопухолевой активности (в отношении лейкемической моноцитарной лимфомы человека линии U937) пяти синтезированных нуклеозидов, обладавших в противовирусных исследованиях максимальной цитотоксичностью, не выявило значимого влияния нуклеозидов на выживаемость клеток. В пределах изученных концентраций исследованные соединения не обладали противоопухолевой активностью.

Список опубликованных научных работ

- Статьи:** 1. Fateev I.V., Kharitonova M.I., Antonov K.V., Konstantinova I.D., Stepanenko V.N., Esipov R.S., Seela F., Temburnikar K.W., Seley-Radtke K.L., Stepchenko V.A., Sokolov Y.A., Miroshnikov A.I., Mikhailopulo I.A. Recognition of Artificial Nucleobases by E. coli Purine Nucleoside Phosphorylase vs its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base Modified Nucleosides. // Chem. Eur. J. 2015. V. 21. P. 13401-13419.
2. Kharitonova M.I., Fateev I.V., Kayushin A.L., Konstantinova I.D., Kotovskaya S.K., Andronova V.L., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. Chemoenzymatic Synthesis and Antiherpes Activity of 5-Substituted 4,6-Difluorobenzimidazoles Ribo- and 2'-Deoxyribonucleosides. // Synthesis 2016. V. 48 (03). P. 394-406.
3. 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. P. 1043-1052.
4. Kharitonova M.I., Denisova A.O., Andronova V.L., Kayushin A.L., Konstantinova I.D., Kotovskaya S.K., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. New modified 2-aminobenzimidazole nucleosides: Synthesis and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1. // Bioorg. Med. Chem. Let. 2017. V. 27 (11). P. 2484-2487.
- Тезисы:** 1. Харитонов М.И., Константинова И.Д., Фатеев И.В., Мирошников А.И. Модифицированные нуклеозиды на основе 4,5,6-замещённых бензимидазолов. // Материалы II всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы медицинской науки третьего тысячелетия». Санкт-Петербург. 2012. Медицинский академический журнал. Приложение. С. 138-139.
2. Fateev I.V., Antonov K.V., Konstantinova I.D., Kharitonova M.I., Seela F., Esipov R.S., Miroshnikov A.I. and Mikhailopulo I.A. The chemo-enzymatic synthesis of clofarabine and related nucleosides: the role of electronic and stereochemical factors of substrates in reactions catalyzed by E. coli nucleoside phosphorylases. // 38th FEBS Congress, Saint Petersburg. 2013. FEBS Journal, Special Issue: 38th FEBS Congress, V. 280 (Suppl. 1), p. 363.
3. Kharitonova M.I., Fateev I.V., Konstantinova I.D. and Miroshnikov A.I. Modified 4,5,6-trisubstituted benzimidazole nucleosides. // 38th FEBS Congress, Saint Petersburg. 2013. FEBS Journal, Special Issue: 38th FEBS Congress, V. 280 (Suppl. 1), p. 362-363.
4. Харитонов М.И., Константинова И.Д., Котовская С.К., Баскакова З.М., Чарушин В.Н.. Модифицированные нуклеозиды на основе замещённых по 5 положению 4,6-дифторбензимидазолов // Уральский научный форум «Современные проблемы органической химии». Екатеринбург, 2014. С. 216.
5. Kharitonova M.I., Konstantinova I.D., Kotovskaya S.K., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. Modified Fluorinated Benzimidazole Nucleosides as Potent Antiviral Drugs // EFMC International symposium on medicinal chemistry. Lisbon. 2014. P.358.
6. Kotovskaya S.K., Kharitonova M.I., Konstantinova I.D., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. Chemo-enzymatic synthesis of ribo- and 2'-deoxyribo-nucleosides derived from 5-substituted 4,6-difluorobenzimidazoles // International Congress on Heterocyclic Chemistry "KOST-2015", Moscow. 2015. Book of abstracts, p. 311.
7. Matyugina E., Kharitonova M., Kochetkov S., Khandazhinskaya A., Seley-Radtke K. Design, synthesis and biological evaluation of novel flex-bases. XII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Paris (France). 2016. Abstract book, p. 153-154.
8. Степанов М.Р., Харитонов М.И. Ферментативный синтез новых модифицированных нуклеозидов 2-аминобензимидазола // Тезисы XXIX Зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва. 2017. С.150.