

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

На правах рукописи

Харитоновна Мария Игоревна

Нуклеозиды бензимидазола: синтез и изучение свойств

03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
академик РАН, д.х.н., профессор
Мирошников Анатолий Иванович

Москва - 2017

Оглавление

	Стр.
Введение	4
1 Литературный обзор	6
1.1 Противовирусная и противоопухолевая активность модифицированных нуклеозидов бензимидазола	6
1.2 Механизм действия аналогов нуклеозидов в отношении HCMV и HSV	19
1.3 Способы получения нуклеозидов бензимидазола	23
1.3.1 Химические способы синтеза нуклеозидов бензимидазола	23
1.3.1.1 Синтез β -D-рибозидов бензимидазола по реакции гликозилирования	23
1.3.1.2 Синтез 2'-дезоксирiboаналогов 5,6-дихлорбензимидазола, замещенных по C2 положению основания	29
1.3.1.3 Синтез 2'-арабинозидов бензимидазола	30
1.3.1.4 Синтез фторированных по остатку углевода нуклеозидов бензимидазола	30
1.3.1.5 Синтез 5'-галогенированных производных 2,5,6-трихлорбензимидазола	33
1.3.1.6 Синтез серии β -L-нуклеозидов бензимидазола	35
1.3.2 Ферментативный способ получения модифицированных нуклеозидов	39
1.3.2.1 Синтез нуклеозидов бензимидазола с применением N-дезоксирибозилтрансфераз (NDTs)	39
1.3.2.2 Синтез нуклеозидов бензимидазола с применением нуклеозидфосфорилаз (NPs)	43
2 Результаты и обсуждение	47
2.1 Синтез модифицированных нуклеозидов бензимидазола с использованием нуклеозидфосфорилаз <i>E. coli</i>	48
2.1.1 Синтез серии 4,6-дифтор-5-замещенных-нуклеозидов бензимидазола рибо- и 2'-дезоксирibo рядов	49
2.1.2 Синтез серии 2'-дезоксирibo-2'-фторарабинозидов 5,6-, 4,6- и 4,5,6-замещенных бензимидазолов	68
2.1.3 Синтез нуклеозидов бензимидазола, модифицированных по C2	80

	положению бензимидазольного кольца	
2.2	Исследование субстратной специфичности PNP <i>E. coli</i> по отношению к гомологам бензимидазола, у которых один атом азота заменен на гетероатом кислорода или серы	92
2.3	Определение активности <i>in vitro</i> синтезированных нуклеозидов бензимидазола	98
2.3.1	Исследование активности нуклеозидов бензимидазола серий рибо, 2'-рибо и 2'-фторарабино в отношении HSV-1	98
2.3.2	Исследование активности модифицированных нуклеозидов 5,6-замещенного-2-аминобензимидазола в отношении HSV-1	100
2.3.3	Исследование противовирусной активности новых нуклеозидов бензимидазола в отношении инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита	104
2.3.4	Исследование <i>in vitro</i> цитотоксической активности нуклеозидов бензимидазола на опухолевых клетках лейкемической моноцитарной лимфомы человека U937	108
3	Материалы и методы	110
	Заключение	124
	Список сокращений	126
	Список литературы	128
	Приложения	144-161

Введение

Нуклеозиды ряда бензимидазола относятся к группе неприродных нуклеозидов, обладающих селективной противовирусной, противоопухолевой активностью и характеризующиеся невысокой цитотоксичностью. Известно, что к препаратам, применяемым для терапии вирусных заболеваний человека, часто развивается резистентность. Поэтому постоянно проводится поиск новых противовирусных средств, характеризующихся меньшей частотой возникновения к ним резистентных штаммов вирусов, системной токсичностью и количеством побочных эффектов. Такими препаратами могут стать нуклеозиды бензимидазола, обладающие уникальным механизмом действия и структурой, подходящей для различных модификаций. На настоящий момент времени в США зарегистрирован для применения в клинической практике всего один препарат на основе нуклеозида бензимидазола (Марибавир), он же находится в Европе на клинических испытаниях для профилактики цитомегаловирусных инфекций. Актуальным является поиск новых нуклеозидов бензимидазола и исследование спектра их биологической активности.

Чаще всего нуклеозиды (как аналоги природных соединений - пуринов и пиримидинов, так и бензимидазолов) получают с помощью многостадийного химического синтеза, требующего большого количества времени, затрат дорогостоящих реагентов, стадий выделения промежуточных соединений и разделения смесей изомеров и защищенных форм, а также очистки целевых соединений. Разработка простого и удобного метода синтеза модифицированных нуклеозидов – наиважнейшее требование современной биоиндустрии.

Целью работы является разработка химико-ферментативного синтеза новых модифицированных нуклеозидов бензимидазола с помощью генно-инженерных ферментов нуклеозидфосфорилаз. Использование ферментов на стадии синтеза гликозидной связи позволяет значительно упростить процесс получения и выделения целевых соединений, повысить его эффективность и экологичность.

В настоящей работе исследуется субстратная специфичность ферментов нуклеинового обмена – нуклеозидфосфорилаз по отношению к ряду гетероциклических оснований, в том числе и к нетипичным субстратам для этого класса ферментов. Предлагается эффективный химико-ферментативный подход к получению новых нуклеозидов бензимидазола с различными заместителями в бензимидазольном кольце и углеводными остатками трех типов (рибоза, дезоксирибоза и 2-дезокси-2-фторарабиноза).

Комплекс экспериментальных работ в рамках диссертационной работы можно подразделить на следующие основные направления:

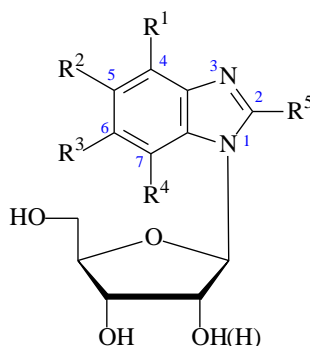
- синтез серии 4,6-дифтор-5-замещенных-нуклеозидов бензимидазола рибо- и 2'-дезоксирибо рядов,
- синтез серии 2'-дезоксидифторарабинозидов 5,6-, 4,6- и 4,5,6-замещенных бензимидазолов,
- синтез нуклеозидов бензимидазола, модифицированных по С2 положению имидазольного кольца,
- исследование субстратной специфичности PNP *E. coli* по отношению к гомологам бензимидазола, у которых один атом азота заменен на гетероатом кислорода или серы,
- определение *in vitro* антивирусной активности модифицированных нуклеозидов бензимидазола и исследование их цитотоксичности на опухолевых клетках человека.

Проведение комплекса работ по синтезу и изучению биологической активности новых модифицированных нуклеозидов позволят провести корреляцию «структура-активность» и разработать направления дальнейших модификаций структуры нуклеозидов бензимидазола для усиления их биологической активности.

1 Литературный обзор

1.1 Противовирусная и противоопухолевая активность нуклеозидов бензимидазола

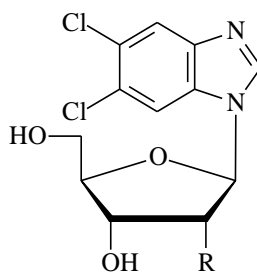
Нуклеозиды, содержащие в структуре в качестве азотистого основания производные бензимидазола (Рисунок 1), относятся к классу модифицированных нуклеозидов и обладают противовирусной и противоопухолевой активностью. Спектр противовирусной активности нуклеозидов бензимидазола (BI) достаточно широкий; наиболее часто соединения такой структуры проявляют антивирусный эффект в отношении простого герпеса 1 и 2 типа (HSV-1 и HSV-2), вируса иммунодефицита человека (HIV) и различных цитомегаловирусов (CMV), в частности, цитомегаловируса человека (HCMV) [1 - 6].



$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, Cl, Br, CH_3, NH_2$ и др.

Рисунок 1 – Общая схема нуклеозидов бензимидазола

В 1954 году *Tam* и соавторы впервые сообщили о синтезе и противовирусной активности ряда галогенированных нуклеозидов бензимидазола. 5,6-Дихлор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (DRB, **1a**) (Рисунок 2) оказался наиболее активным соединением из этой серии против вируса гриппа А и В [7] и других РНК-вирусов [8].



1a: R=OH, (**DRB**)

1b: R=H, (**2'-DRB**)

Рисунок 2 – 5,6-дихлор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (**1a**) и его 2'-дезоксид-аналог (**1b**)

DRB проявлял активность также против ДНК-вирусов (например, вируса коровьей оспы) [8-10]. Исследование антивирусной активности DRB против HCMV и HSV-1, показало низкую активность против обоих вирусов ($IC_{50} = 42$ и $30 \mu M$, соответственно). Однако, противовирусная активность данного соединения была неотделима от высокой

цитотоксичности, что обусловило невозможность использования его в качестве противовирусного лекарственного средства [8, 11]. Именно данные о высокой цитотоксичности препарата по отношению к фибробластам крайней плоти человека и КВ-клеткам (культура клеток эпидермоидной карциномы полости рта человека) [12], впоследствии подтолкнули ученых к поиску у данного соединения противоопухолевой активности. В 2007 году появились данные о его противоопухолевой активности в отношении клеточной линии Нер-2 (карциномы гортани человека) [13].

Первые попытки улучшить противовирусный профиль DRB за счет введения дополнительного атома хлора (**2f**) и брома (**2e**) в 4-положение бензольного кольца, а также получение бром производных бензимидазола (**2a-d**), оказались неудачными [14, 11]. Полученные 5(6)-монобром- (**2a,b**), 5,6-дибром (**2c**), 4,5,6-трибром- (**2d**) и 4-бром-5,6-дихлор- (**2e**) производные DRB (Рисунок 3) показали более слабую противовирусную активность, чем DRB [14, 15].

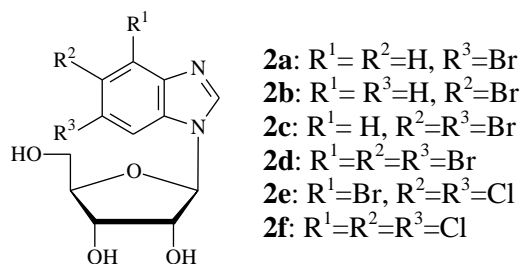


Рисунок 3 – Бром- (**2a-e**) и хлор- (**2f**) производные рибозида бензимидазола

4,5,6-Трихлор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (**2f**) (Рисунок 3), хотя и оказался активным по отношению к вирусу гриппа А и вирусу парагриппа 1, также как DRB обладал значительной цитотоксичностью [11]. Тем не менее, ученые предположили, что введение нескольких галоген-заместителей в бензимидазольное кольцо 1-β-D-рибофуранозилбензимидазола может усилить противовирусную активность соединения [15].

Большая часть аналогов, модифицированных по остатку рибозы, также показали более слабую противовирусную активность, чем DRB [14, 16]. Было обнаружено, что 1-β-D-2'-дезоксирибозид 5,6-дихлорбензимидазола (**1b**, Рисунок 2) ингибирует *in vitro* репликацию как ДНК содержащего вируса (вирус простого герпеса) так и РНК содержащего вируса (полиомавируса) [17]. Ксило- и арабино- производные обладали некоторой активностью против HCMV в концентрациях ниже, чем цитотоксические концентрации. Однако, эти производные не обладали достаточной селективностью и, следовательно, бессмысленно было рассматривать их в качестве потенциальных противовирусных соединений [18].

В 1996 году *Townsend и соавторы* сообщили о синтезе новой серии дизамещенных рибонуклеозидов бензимидазола - потенциальных ингибиторов репликации HCMV и HSV-1. Были синтезированы два изомера: 2,5-дихлор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (**3a**) и 2,6-

дихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**3b**) (Рисунок 4), а также несколько других дизамещенных аналогов (**3c-h**). Исследование соотношения "структура - активность" данных соединений показало, что присутствие атома хлора во втором положении гетероцикла ($R^3=Cl$) является существенным для проявления низкой цитотоксичности, но недостаточным для появления противовирусной активности [19].

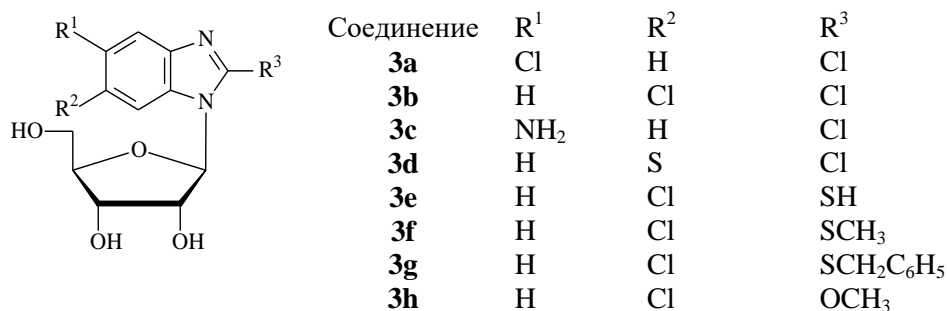


Рисунок 4 – Дизамещенные нуклеозиды бензимидазола (**3**)

Соединения **3c-h** (Рисунок 4) оказались либо неактивными совсем, либо обладали слабой активностью против HCMV, а также неактивными против HSV-1 и нетоксичными.

Дихлорзамещенные рибонуклеозиды бензимидазола **3a** и **3b** также показали слабую активность против HCMV, при этом 2,6-дихлор изомер (**3b**) оказался гораздо активнее, чем 2,5-дихлор изомер (**3a**). Определение активности и цитотоксичности для данных соединений в сравнении с DRB (**1a**) позволило исследователям сделать очень важные выводы. Поскольку одинаково низкая антивирусная активность и цитотоксичность изомеров **3a** и **3b** явно контрастировала с активностью DRB (5,6-дихлор изомер), и поскольку последний ингибировал примерно в одинаковых концентрациях как CMV и HSV-1, так и рост клеток линий HFF (фибробласты крайней плоти человека) и KB (культура клеток эпидермоидной карциномы полости рта человека), это навело исследователей на мысль, что противовирусная активность DRB является результатом не специфической активности, а всего лишь проявлением цитотоксичности. И наоборот: слабая активность дизамещенных аналогов **3a** и **3b** против HCMV, является как раз специфической противовирусной активностью, поскольку исследования проводились в нецитотоксических концентрациях [19].

Сделанные выводы согласовывались с опубликованной информацией о значительной специфической активности против HCMV и низкой цитотоксичности другого аналога DRB - 2,5,6-трихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазола (TCRB, **4**, Рисунок 5). Противовирусная активность TCRB оценивалась изначально также по сравнению с DRB. В результате дополнительных исследований активности нуклеозидов было выявлено, что DRB по сравнению с TCRB имеет совсем незначительную активность против HCMV и HSV-1 при значительной цитотоксичности по отношению к неинфицированной клеточной линии.

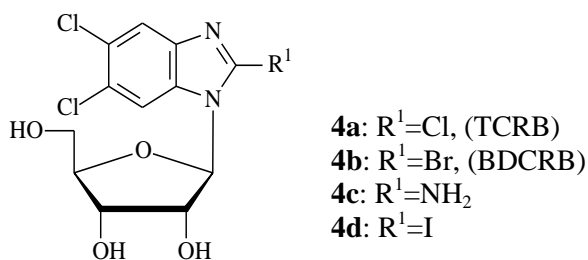


Рисунок 5 – 2-Замещенные-5,6-дихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазолы (**4**)

Был сделан вывод, что для проявления селективной противовирусной активности соединению необходимо иметь заместитель (Cl или Br) во втором положении бензимидазольного кольца. Вторым важным условием является наличие в молекуле остатка рибозы: профиль активности основания (2,5,6-трихлор-бензимидазола) был очень похож на профиль активности DRB, но не TCRB) [12]. Интересно, что изначально TCRB (**4a**) синтезировали в качестве потенциального противоопухолевого лекарственного средства, однако соединение оказалось неактивным и нецитотоксичным [20, 21]. Также соединение показало низкую активность в отношении HSV-1 ($\text{IC}_{50} = 102 \mu\text{M}$). Но в связи с выявленной высокой селективностью против HCMV ($\text{IC}_{50} = 2.9 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{90} = 1.4 \mu\text{M}$) в нецитотоксических концентрациях [12] TCRB был использован для дальнейших модификаций и поиска потенциальных противовирусных соединений. Было синтезировано и оценено на наличие противовирусной активности большое количество его производных. Но только сам TCRB, его 2-бром-гомолог (BDCRB, **4b**, Рисунок 5), а также их 5'-дезоксид-аналоги оказались среди наиболее активных соединений [5]. 2,3,5-Три-*O*-ацетил производные TCRB и BDCRB (**4a**) и (**4b**) проявляли потенциальную активность против HCMV в нетоксических концентрациях. Однако, дополнительные исследования показали, что ацильные группы три-*O*-ацетил производных гидролизуются в клетках сывороточными эстеразами, что говорит о том, что именно рибонуклеозиды TCRB и BDCRB являются активными соединениями. При замене во втором положении бензимидазольного кольца хлора на бром активность соединения BDCRB (**4b**) против HCMV увеличивалась в 4 раза по сравнению с TCRB (**4a**) при том, что заметного увеличения цитотоксичности не наблюдалось. Однако BDCRB также оказался слабо активным в отношении HSV-1 [12].

При исследовании соединений с другими заместителями во 2-ом положении имидазольного кольца, активных соединений обнаружено не было: так 2-йод аналог TCBR (**4d**) показал меньшую активность против HCMV и меньшую селективность (при увеличении активности увеличивалась также и цитотоксичность по отношению к неинфицированным KB-клеткам). 2-Амино производное (**4c**) оказалось более активным по отношению к HCMV, чем 2-И аналог (**4d**), но менее активным, чем 2-Br (**4b**) и 2-Cl (**4a**) производные (Рисунок 5).

Таким образом, из серии дихлор-замещенных рибофуранозидов бензимидазола с заместителем во втором положении противовирусными свойствами, превосходящими ганцикловир (**5**) и фоскарнет (**8**, Рисунок 6) обладали только TCRB и BDRB [12].

Необходимо сделать небольшое отступление и отметить, что в настоящее время существует четыре основных препарата для лечения HCMV: ганцикловир (9-(1,3-дигидрокси-2-пропoxиметил)гуанин, **5**), цидофовир ((S)-1-(3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропил)цитозин (**6**), валганцикловир (валиновый эфир ганцикловира), **7**) - пролекарство, которое метаболизируется в организме до ганцикловира, - и фоскарнет (тринатрий фосфоноформат, **8**) (Рисунок 6) [22]. Первые три из перечисленных препаратов относятся к группе ациклических нуклеозидов. Фоскарнет является ненуклеозидным ингибитором ДНК-полимеразы HSV и, в связи с наличием большого количества побочных эффектов, применяется только при неэффективности нуклеозидных аналогов [23].

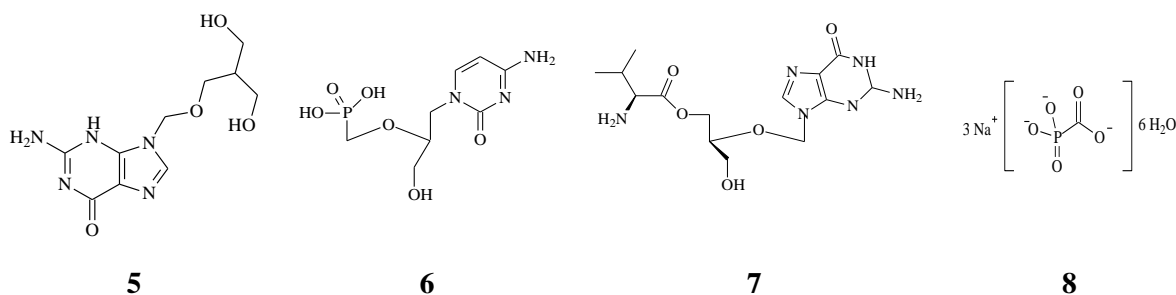


Рисунок 6 – Ганцикловир (**5**), цидофовир (**6**), валганцикловир (**7**), фоскарнет (**8**)

Большинство современных подходов к лечению герпетических инфекций также основано на использовании в качестве лекарственных средств модифицированных нуклеозидов или их депо-форм (пролекарств). Действие клинически одобренных антигерпетических препаратов направлено главным образом на подавление активности основного фермента репликации вируса - ДНК-полимеразы [24]. Основными препаратами для лечения HSV являются антигерпетические препараты второго поколения - ациклические нуклеозиды (ацикловир, валацикловир, пенцикловир, фамцикловир и указанные выше ганцикловир и валганцикловир). Эти препараты имеют достаточно широкий спектр действия и подавляют инфекции, вызываемые HSV-1, HSV-2, вирусом Варицелла-Зостер (VZV), а также HCMV [25, 26]. Именно поэтому при изучении противовирусной активности новых соединений в качестве препаратов сравнения чаще всего используются ганцикловир (**5**) и фоскарнет (**8**).

При исследовании противовирусной активности TCRB и его бром-аналога BDCRB было обнаружено, что соединения обладают уникальным механизмом действия (не влияют на ДНК-полимеразу вируса), причем спектр активности этих соединений очень специфичен и ограничивается только цитомегаловирусами [27 - 29]. TCRB (**4a**) и BDCRB (**4b**) в одинаковой степени активны против цитомегаловируса человека и цитомегаловируса обезьян-резусов и

менее активны против CMV морских свинок [30]. Удивительно, что ни TCRB, ни BDCRB не проявлял определенной активности против других герпесвирусов, включая HSV-1 и HSV-2, Варицелла-Зостер вирус и вирус герпеса человека 6 типа. Соединения также не проявили активности против респираторных вирусов, включая вирус гриппа А, вирус гриппа В, респираторный синцитиальный вирус и аденовирус 5 и 7 штаммов, вируса кори, энтеровирусов (таких как Коказаки вирус А9, Коказаки вирус В1, эховирусы 7 и 9, и полиовирус), вируса иммунодефицита человека (HIV) и папиллома вируса человека [31]. Было установлено, что TCRB и BDCRB не ингибируют синтез РНК, ДНК или синтез белка. Предположительно, эти соединения действуют на уровне цикла репликации вируса, воздействуют на вирусную сборку, ингибируя процесс разделения конкатемерной ДНК на мономерные фрагменты генома [32].

2'-дезоксид-β-D-рибо аналоги TCRB и BDCRB оказались более цитотоксичны и менее активны в отношении HSV-1 и HCMV (по сравнению с ганцикловиром) и сопоставимы по активности с фоскарнетом [33].

Позднее было выявлено, что несмотря на то, что BDCRB (**4b**) проявляет высокую специфическую активность по отношению к HCMV, в качестве лекарственного средства использоваться не может, поскольку быстро метаболизируется в клетке с образованием неактивного и токсичного агликона [2], и дальнейшие его исследования были прекращены. Исследователи продолжили попытки синтезировать различные производные TCRB и BDCRB, модифицированные по гетероциклическому основанию и/или по остатку углевода, для того, чтобы более подробно изучить зависимость "структура-активность".

В основном модификации нуклеозидов бензимидазола проводились именно по бензимидазольному основанию. Так как TCRB (**4a**) отличался от DRB (**1a**) наличием хлора во втором положении, то исследователи предположили, что наличие заместителя во втором положении является важным условием появления активности у соединений, и решили получить серию производных с различными заместителями именно во 2-ом положении бензимидазольного кольца. Несколько 2-алкилтио- и 2-бензилтио производных DRB было синтезировано из 5,6-дихлор-1-β-D-рибофуранозил-бензимидазол-2-тиона и была проведена оценка их активности в отношении HCMV и/или HSV-1. Результаты исследований показали, что в основном 2-алкилтио производные бензимидазола неактивны против этих вирусов или проявляют слабую активность в концентрациях, близких к токсическим. Наибольший интервал между цитотоксической и эффективной концентрациями наблюдался у 2-бензилтио-производного DRB (**9**, Рисунок 7). Именно на основе этого соединения была синтезирована целая серия бензилтионуклеозидов, однако ни одно соединение не показало более высокую антивирусную активность, чем исходный нуклеозид [31, 33].

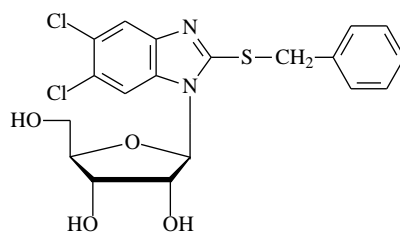
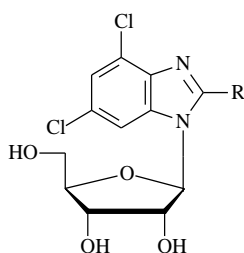
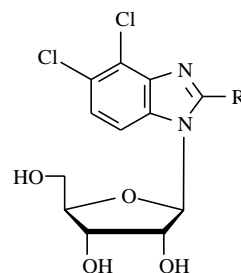


Рисунок 7 - 2-(Бензилтио)-5,6-дихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**9**)

Исследователи варьировали положение хлор-заместителей в бензольном кольце, оставляя стабильным второе положение хлор- или бром- заместителя. Так были синтезированы 4,6-дихлор- и 4,5-дихлор-аналоги TCRB и BDCRB: 2,4,6-трихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**10a**), 2-бром-4,6-дихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**10b**), 2,4,5-трихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**11a**) и 2-бром-4,5-дихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**11b**) (Рисунок 8). Соединения этой серии оказались активными против HCMV в нетоксичных концентрациях. 2-Бром аналоги (**10b** и **11b**) проявили большую активность по сравнению с 2-хлор аналогами (**10a** и **11a**) [34].



10a: R=Cl; **10b:** R=Br

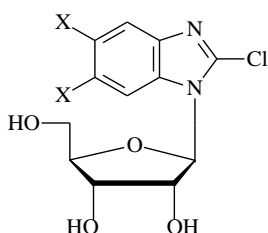


11a: R=Cl; **11b:** R=Br

Рисунок 8 – 4,6-дихлор- и 4,5-дихлор-аналоги TCRB и BDCRB

Ни одно из синтезированных соединений не проявило активности против HSV-1, профиль активности и цитотоксичности против HCMV был аналогичен профилю активности и цитотоксичности TCRB (**4a**) и BDCRB (**4b**). Поэтому, несмотря на то, что соединения данной серии были не настолько эффективны как TCRB и BDCRB, их можно отнести к потенциальным и селективными ингибиторам HCMV [34].

Продолжая исследовать зависимости "структура-активность" аналогов TCRB, исследователи синтезировали 2-хлор-5,6-дифтор- (**12a**), 2-хлор-5,6-дибром (**12b**), 2-хлор-5,6-дидод- (**12c**), 2-хлор-5,6-диметил (**12d**) рибопроизводные бензимидазола (Рисунок 9) [35].



12a: X=F
12b: X=Br
12c: X=I
12d: X=CH₃

Рисунок 9 – 2-Хлор-5,6-дизамещенные-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазолы (**12**)

5,6-Диметил- (**12d**) и 5,6-дифтор- (**12a**) рибонуклеозиды оказались неактивными против HCMV и HSV-1. 5,6-Дибром аналог (**12b**) проявил активность против HCMV, но также проявил и цитотоксичность более высокую, чем TCRB (**4a**). 5,6-Дийод аналог (**12c**) был активен, но одновременно и более токсичен, чем TCRB (**4a**) и чем соединение **12b**. Ряд активности для рибонуклеозидов данной серии можно представить следующим образом: $I \approx Br \approx Cl \gg F > H = CH_3$. Цитотоксичность в ряду галоген-замещенных аналогов TCRB (наиболее активных соединений данной группы) убывает в ряду: $I > Br > Cl$. Полученные результаты подтвердили еще раз, что трихлорпроизводное TCRB является наиболее активным и селективным соединением в ряду нуклеозидов галоген-замещенных бензимидазолов с атомом хлора во втором положении бензимидазольного кольца. Интересно, что размер заместителя в 5- и 6-положении и его электроотрицательность являются критичными факторами, определяющими активность соединений против HCMV и их цитотоксичность [35].

Чтобы улучшить метаболическую стабильность нуклеозидов бензимидазола и повысить активность данного класса соединений против HCMV, был синтезирован ряд L-рибозидных аналогов BDCRB (**4b**). Наиболее активным из них оказался 5,6-дихлор-2-(изопропиламино)-1-(β-L-рибофуранозил)-бензимидазол (Марибавир, **13**), проявляющий также активность в опытах *in vitro* против вируса Эпштейн-Барра [34].

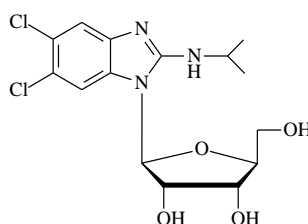


Рисунок 10 – 5,6-Дихлор-2-(изопропиламино)-1-(β-L-рибофуранозил)-бензимидазол
(Марибавир, **13**)

Марибавир - L-рибозид бензимидазола с селективной активностью против HCMV, механизм действия которого кардинально отличается от механизма BDCRB (Марибавир влияет на синтез вирусной ДНК, но не ингибирует вирусную ДНК-полимеразу). Исследования противовирусной активности данного нуклеозида показали, что Марибавир также ингибирует *in vitro* репликацию вируса Эпштейна-Барра. Однако препарат не был активен по отношению к HSV-1 и HSV -2, вирусу ветряной оспы, а также HIV и вирусу гепатита В [36]. В настоящее время Марибавир (**13**) применяется в США как орфанный препарат для профилактики CMV инфекции после трансплантации костного мозга [37]. А в Европе ведутся дополнительные клинические исследования Марибавира (**13**) в качестве препарата для профилактики и лечения HCMV у пациентов, резистентных к терапии другими препаратами, а также уточняется

оптимальная лекарственная форма препарата и его возможные комбинации с антацидами и/или антибиотиками для повышения эффективности биодоступности при приеме внутрь [38].

Поскольку активные соединения были найдены как среди β -D- так и среди β -L-рибонуклеозидов, исследователям было интересно сравнить активность в ряду β -D- и β -L-2'-дезоксирибонуклеозидов бензимидазола, для чего было синтезировано несколько соединений с различными заместителями в бензимидазольном кольце (Рисунок 11, соединения (14) - (20)). Далее была проведена обширная работа по выявлению среди этих соединений активности против широкого спектра вирусов: вирусов рода *Flavivirus*, вируса иммунодефицита человека (HIV-1), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV) и респираторно-синцитиальный вируса человека (human RSV) [39].

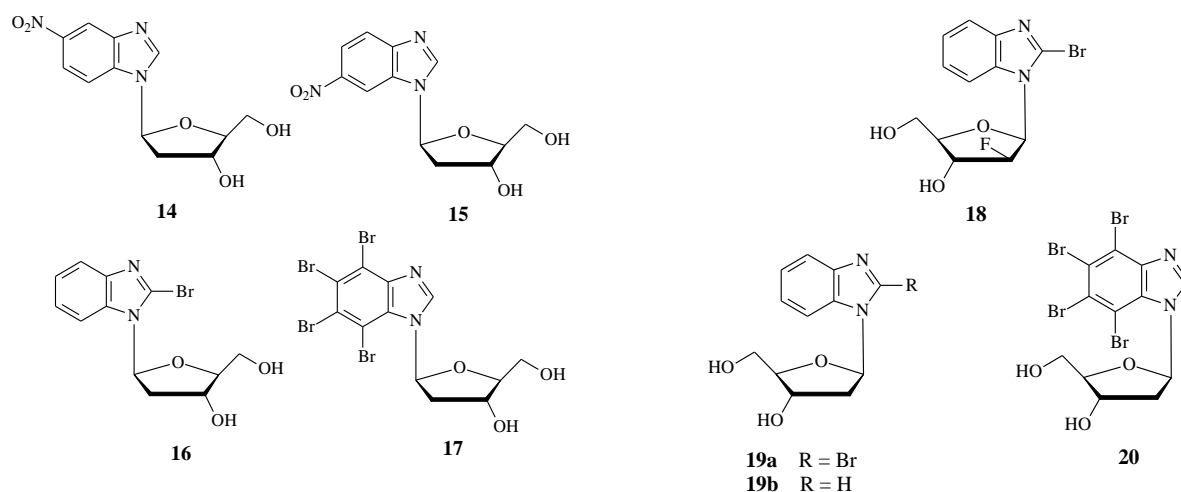
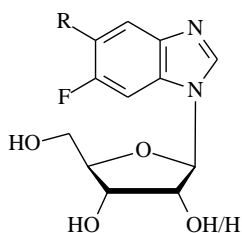


Рисунок 11 – Замещенные β -L- (14-17) и β -D-2'-дезоксирибонуклеозиды (18)-(20)

4,5,6,7-Тетрабромированный бензимидазол β -L-2'-дезоксирибонуклеозид (17), так же как его β -D-энантиомер (20), показали одинаковую активность против тестируемых ssRNA+ вирусов. Однако, эти соединения были также цитотоксичны в пределах того же диапазона концентраций. К сожалению, остальные L- и D-нуклеозиды бензимидазола не показали ни противовирусной активности ни цитотоксичности. L-нуклеозид (17) показал некоторую активность против вируса гепатита В (ДНК-вирус) при высокой цитотоксичности. Соединения (14) - (16) и (18) не проявили активности против HBV. Против респираторно-синцитиального вируса (RSV, ssRNA-) активных соединений выявлено не было ни среди L-, ни среди D-нуклеозидов [39].

Среди синтезированных позднее β -D-рибозидов и 2'-дезоксирибонуклеозидов фторированного бензимидазола с различными заместителями в бензимидазольном кольце (21, Рисунок 12) также не оказалось активных соединений в отношении широкого спектра ДНК и РНК вирусов, в том числе HIV, HSV-1, HSV-2, HCMV, Коказаки вируса, респираторного синцитиального вируса и вирусов гриппа А и В. Одновременно соединения обладали низкой цитотоксичностью [40].



21: R = F, OMe, OEt, Oi-Pr, морфолино, N-метилпиперазино

Рисунок 12 – Серия рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов 6-фторбензимидазолов (**21**)

Тем временем, в рамках исследования, направленного на получение аналогов BDCRB со стабильной гликозидной связью было найдено, наконец, два активных соединения: 2-бром-4,5,6-трихлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил) бензимидазол (BTCRB, **22**) и 2,4,5,6-тетрахлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил) бензимидазол (Cl₄RB, **23**) [41] (Рисунок 13).

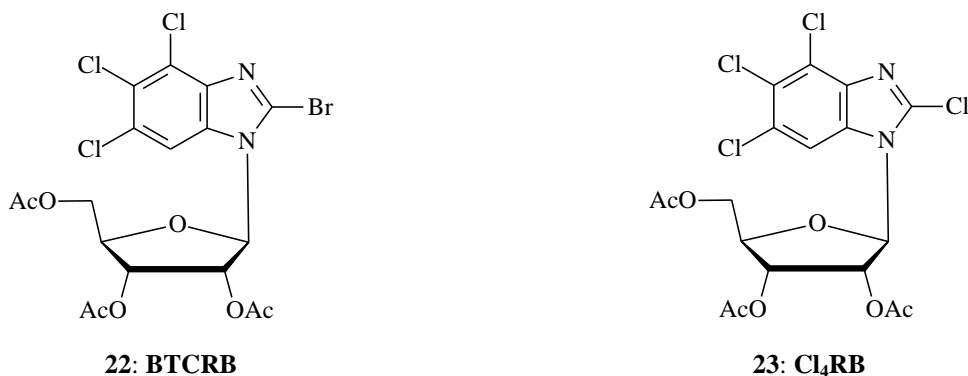


Рисунок 13 - 2-бром-4,5,6-трихлор- (**22**) и 2,4,5,6-тетрахлор- (**23**) 1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил) бензимидазолы

Синтезированные нуклеозиды (**22**) и (**23**) были активны в отношении HCMV, а механизм их действия был очень похож на механизм противовирусной активности BDCRB (**4b**, Рисунок 5). Интересно, что оба соединения ингибировали два вида клинических изолятов вируса: 1) чувствительный к ганцикловиру (GCV), и 2) GCV-устойчивый. Эффективность соединений при действии на первый вид изолята вируса, как у BTCRB (**22**) и Cl₄RB (**23**), так и у BDCRB (**4b**) (контроль) была одинаковая, EC₅₀ для трех соединений составляла 0.35 μM. При действии на второй вид изолята самым эффективным оказалось соединение Cl₄RB (**23**) (EC₅₀ = 0.15 μM), эффективность BTCRB (**22**) была на одном уровне с BDCRB (**4b**) (EC₅₀ = 0.5 μM). Кроме того, соединения были активны в отношении цитомегаловируса крыс (RCMV) и Варицелла-Зостер вируса. У BTCRB (**22**) наблюдалась некоторая активность в отношении HSV-1 [41, 42].

В рамках исследования зависимости "структура-активность" было синтезировано большое количество нуклеозидов бензимидазола с модификациями по углеводному остатку. Townsend и соавторы синтезировали серию из девяти 5'-модифицированных аналогов (**22**, Рисунок 13) TCRB и протестировали ее против двух типов вируса герпеса (HCMV и HSV-1).

Соединения показали значительную активность против HCMV, но низкую активность против HSV -1.

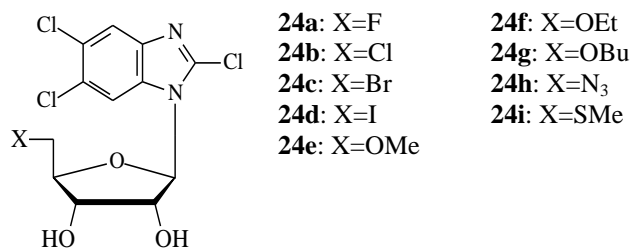


Рисунок 14 – Серия 5'-производных TCRB (**24**)

Профиль противовирусной активности некоторых соединений был похож на профиль активности TCRB, причем активность была хорошо отделима от цитотоксичности. 5'-Галогенированные производные (**24a-d**) проявили более выраженную активность против HCMV, чем остальные 5'-производные и даже немного более высокую, чем сам TCRB [43]. Изменение активности в ряду производных с различными 5'-заместителями практически не наблюдалось, несмотря на различия в электроотрицательности и размере заместителей. Активность в ряду соединений с алкокси-заместителями (**24e-g**) уменьшалась с увеличением размера алкильной группы от метила до бутила. Наличие азидо- и тиометил- заместителей явно не влияло на активность соединений, в связи с чем активность таких соединений в отношении HCMV была сравнима с TCRB. Все соединения с 5'-заместителями оказались более цитотоксичными, чем TCRB. Однако цитотоксичность у всех соединений была отделима от антивирусной активности. Наибольшая селективность наблюдалась у фтор-производного (**24a**). Был сделан вывод, что при поиске соединений с активностью против HCMV, допускаются модификации в 5'-положении TCRB, поскольку заместители в этом положении не уменьшают активность соединения против данного вируса [44].

В ряду 2'-β-*D*-дезоксирибозидов кроме 2'-дезоксi-TCRB и 2'-дезоксi-BDCRB были синтезированы 2-амино (**25a**) и 2-изопропиламино (**25b**) производные, которые проявили активность в отношении HCMV. Однако, соединения оказались менее активными, чем TCRB. Следовательно, можно сделать важный вывод о том, что 2'-дезоксi-β-*D*-рибозиды бензимидазола менее активны против HCMV, чем β-*D*-рибозиды [33].



25a: 2-Амино-5,6-дихлор-1-(β-*D*-2'-дезоксирiboфуранозил)бензимидазол

25b: 5,6-Дихлор-2-изопропиламино-1-(β-*D*-2'-дезоксирiboфуранозил)бензимидазол

Рисунок 15 – 2'-β-*D*-дезоксирибозиды, 2-амино/изопропиламино-производные 5,6-дихлорбензимидазола

Еще одна интересная модификация – нуклеозиды с атомом фтора в углеводном остатке, в рамках исследования [44, 45] было синтезировано пять фторированных нуклеозидов 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-рибо- (**26a-c**), 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-арабино- (**26d**), 3'-дезоксидеокси-3'-фтор-ксило- (**26e**) β -D-фуранозидов бензимидазола (Рисунок 15).

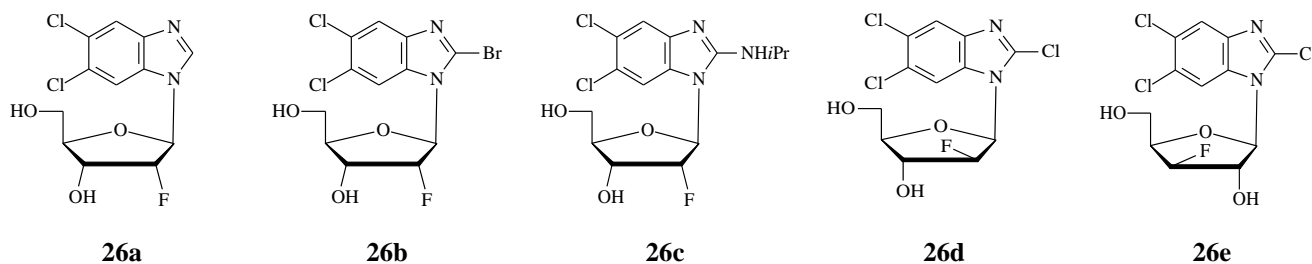


Рисунок 16 – Нуклеозиды бензимидазола, содержащие атом фтора в углеводном остатке

Все нуклеозиды в серии оказались неактивными против HSV-1, но 2'-фторарабинозный (**26d**) и 3'-фторксилозный (**26e**) аналоги TCRB, также как и 2'-фторрибозидный аналог BDCRB (**26b**) проявляли некоторую активность против HCMV. Однако активность этих соединений была ниже активности TCRB и BDCRB и, кроме того, эти аналоги оказались более токсичными, что сделало дальнейшее исследование этих фтор-замещенных нуклеозидов неоправданным [46]. Два других соединения (**26a**, **26c**) - 2'-фторрибо- аналоги DRB и Марибавира - оказались неактивными против HCMV. Удивляет отсутствие активности у этих соединений, поскольку соединение (**26a**) является прямым 2'-фтор-рибофуранозным аналогом 2'-дезоксидеокси-DRB [7], который, как известно, проявляет и активность, и токсичность. Промежуточные продукты с тритильными и бензоильными защитными группами по гидроксилам углеводного остатка (3',5'-ди-O-Tr-TCRB, 2,3,5-три-O-Tr-TCRB и 2-фтор-3,5-ди-Bz-арабинопроизводное TCRB), полученные во время синтеза целевых фторированных нуклеозидов, также обладали некоторой активностью в отношении HSV-1, и были полностью неактивны в отношении HCMV[47].

Как было указано выше, изначально все 2-замещенные рибонуклеозиды бензимидазола, которые синтезировали *Townsend и соавторы*, в частности 2,5,6-трихлор-1-(β -D-рибофуранозил)бензимидазол (TCRB, **4a**), изначально рассматривались как потенциальные противоопухолевые агенты [20]. Но соединения показали низкую цитотоксичность и недостаточную активность в противоопухолевых тестах [21]. Как потенциальные противоопухолевые агенты позднее были протестированы 5'-модифицированные производные (**24**) TCRB, которые проявили гораздо более высокую цитотоксичность на клетках фибробластах крайней плоти человека, чем на KB-клетках. Поскольку эти соединения проявляли также высокую противовирусную активность, исследователи сделали вывод, что модификации по 5'-положению не влияют неблагоприятно на активность соединений против HCMV, но уменьшают токсическое влияние на клетки человека [44].

В 2006 году снова были предприняты попытки получить аналоги нуклеозидов бензимидазола, которые обладали бы противоопухолевой активностью. Была синтезирована серия нуклеозидов 2-замещенного-4(5)-метилбензимидазола (**27a-i**) [48] - структурных аналогов эффективного противоопухолевого соединения 8-хлораденозина [49]. Однако, информации об эффективности их использования в качестве цитостатиков в открытой печати не появилось.

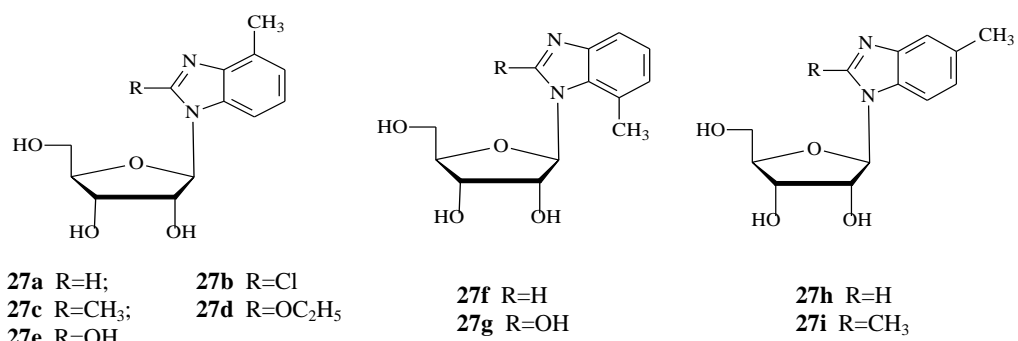


Рисунок 17 – Нуклеозиды 2-замещенного-4(5)-метилбензимидазола с различными заместителями во втором положении (**27**)

А год спустя были проведены дополнительные исследования по поиску противоопухолевой активности 5,6-дихлор-1-β-*D*-рибофуранозил-бензимидазола (DRB) на клетках рака гортани человека (Нер-2 клеточной линии) [13]. Эти исследования показали, что DRB ингибирует пролиферацию Нер-2 клеток с течением времени в дозозависимых концентрациях. Исследования *in vitro* показали, что DRB начинает ингибировать инвазию Нер-2 клеток в концентрации 5 μМ, причем с увеличением концентрации DRB ингибирующий эффект возрастал.

Таким образом, нуклеозиды бензимидазола представляют значительный интерес для исследователей, хотя механизм их антивирусного и противоопухолевого действия до конца не выяснен. Кроме того, препараты на их основе могут стать незаменимыми в медицинской практике при сложных случаях вирусных инфекций, когда течение заболевания приобретает рецидивирующий характер, а результатом длительного применения стандартных лекарственных средств является возникновение резистентных штаммов вирусов. Эти обстоятельства делают актуальным поиск новых противовирусных препаратов с альтернативным механизмом действия и новыми мишенями, таких как модифицированные нуклеозиды бензимидазола.

1.2 Механизм действия аналогов нуклеозидов в отношении HCMV и HSV

Несмотря на то, что нуклеозиды бензимидазола известны в науке более 60 лет, механизм их действия, клеточные мишени *in vitro* и *in vivo* и метаболизм до конца не изучены. Достоверно известно только, что механизм их противовирусного действия отличается от механизма действия препаратов, используемых в клинической практике.

В основном все препараты, используемые для лечения и профилактики цитомегаловирусной инфекции являются ингибиторами репликации HCMV и действуют на вирусную ДНК-полимеразу. Было доказано, что лекарственная устойчивость цитомегаловируса к ганцикловиру и фоскарнету связана с мутациями в гене ДНК-полимеразы (UL54) [50].

Фоскарнет (8, Рисунок 6) взаимодействует напрямую с пирофосфат связывающим сайтом ДНК-полимеразы. Ганцикловир (5) и цидофовир (6, Рисунок 6) должны быть вначале фосфорилированы: ганцикловир - в три этапа, цидофовир - в два этапа до трифосфата и дифосфата. Затем эти соединения взаимодействуют как конкурентные ингибиторы (альтернативные субстраты dGTP и dCTP, соответственно) с субстратсвязывающим сайтом ДНК-полимеразы. Как альтернативные субстраты ганцикловиртрифосфат и цидофовирдифосфат встраиваются (в виде ганцикловирмонофосфата и цидофовира) в растущую цепь ДНК и блокируют элонгацию цепи. Первый этап фосфорилирования во внутриклеточном метаболизме ганцикловира катализируется HCMV-кодируемой протеин киназой (pUL97), продуктом гена UL97, который таким образом отвечает за преимущественное фосфорилирование ганцикловира в клетках, инфицированных цитомегаловирусом. Цидофовир не нуждается в фосфорилировании с помощью pUL97 [50].

Ген UL97 является основным сайтом для мутаций, которые могут вызывать устойчивость цитомегаловируса по отношению к ганцикловиру. Очевидно, что подобные мутации не приводят к устойчивости вируса к другим анти-HCMV препаратам, например, таким как фоскарнет и цидофовир, поскольку их механизм действия не связан с UL97 [22]. Напротив, различные мутации связанные с вирусной ДНК-полимеразой могут вызывать устойчивость штаммов цитомегаловируса как к цидофовиру (часто сопровождается перекрестной устойчивостью к ганцикловиру), так и к фоскарнету.

В связи с возникновением мутаций и устойчивости вируса к препаратам, широко применяемым для лечения цитомегаловируса, постоянно идет поиск новых соединений с альтернативным механизмом действия, а также более эффективных и менее токсичных. К таким соединениям с уникальным механизмом действия можно отнести некоторые нуклеозиды бензимидазола. В 1988 году Krosky и соавторы определили, что устойчивость цитомегаловируса к TCRB (4a, Рисунок 5) связана с мутациями в генах UL89 и UL56, кодирующих малую и большую субъединицу фермента терминазы [50]. В более позднем

исследовании *Biron и соавторы* на примере BDCRB (**4b**, Рисунок 5) доказали, что β -D-рибофуранозил бензимидазолы действуют на созревание и процессинг ДНК [2]. Кроме того, было выяснено, что терминаза влияет на упаковку и включение вирусной ДНК в капсид, и именно терминаза является мишенью нуклеозидов бензимидазола TCRB и BDCRB [42]. Следовательно, механизм ингибирования репликации вируса у соединений BDCRB и TCRB не затрагивает ДНК-полимеразу и сам синтез вирусной ДНК. Поскольку процесс созревания ДНК и включения ее в капсид специфичен для вирусов и отсутствует у млекопитающих, и мишенью соединений является фермент, присутствующий только у вируса - нуклеозиды бензимидазола обладают большей безопасностью, чем препараты применяемые в настоящее время в клинической практике.

Наиболее активным соединением в отношении цитомегаловируса (по сравнению с BDCRB и ганцикловиром) в ряду модифицированных нуклеозидов бензимидазола на сегодняшний день является Марибавир (**13**, Рисунок 10), L-аналог BDCRB, также он менее токсичен в исследованиях *in vitro* (чем ганцикловир) по отношению к клеткам костного мозга [2]. Марибавир проявляет активность в отношении штаммов цитомегаловируса, устойчивых к ганцикловиру. Механизм действия Марибавира связан с ингибированием репликации вируса путем воздействия на pUL97 протеинкиназу [2, 22]. Известно, что pUL97 протеинкиназа может не только фосфорилировать ганцикловир до монофосфата, но и способна к автофосфорилированию. Причем предварительное автофосфорилирование pUL97 является необходимым условием фосфорилирования ганцикловира. Функция продукта гена UL97 недавно была прояснена: он отвечает за ядерный выход, то есть за высвобождение нуклеокапсидов цитомегаловируса из ядер. Следовательно, Марибавир может блокировать энкапсидацию вирусной ДНК и таким образом вмешиваться в цикл репликации цитомегаловируса на более поздних стадиях, чем BDCRB, поскольку выход нуклеокапсидов из ядер происходит после того как созревание и упаковка ДНК уже завершены [2, 51].

Действие препаратов, активных в отношении HSV-1, также как и в случае препаратов против CMV, направлено главным образом на подавление активности основного фермента репликации вируса – ДНК- полимеразы [24]. Золотым стандартом в лечении герпетических инфекций до сих пор является Ацикловир (ACV, **28**) (Рисунок 17), синтезированный еще в 1977 году. Механизм действия ACV основан на его фосфорилировании вирусной тимидинкиназой (ТК) с образованием соответствующего монофосфата (ACVMP). Последующее фосфорилирование до трифосфата (ACVTP) осуществляется уже киназами клетки-хозяина. ACVTP является субстратом для вирусной ДНК-полимеразы, включается с ее помощью в цепь вирусной ДНК и блокирует ее синтез [52]. Эффективным и безопасным препаратом с повышенной пероральной биодоступностью является валацикловир – L-

валиновый эфир ацикловира. В настоящее время существует большое количество штаммов HSV, устойчивых к ацикловиру, причем основные мутации расположены как раз в генах, кодирующих ДНК-полимеразу (UL30) и ТК (UL23). В 95 % случаев устойчивость к АСВ связана с мутациями в гене ТК и только в 5 % случаев – с мутациями в гене ДНК-полимеразы [24].

Еще одним ациклическим нуклеозидом, близким по структуре к ацикловиру и ганцикловиру, и активным против HSV-1, является пенцикловир (PCV, **29**) (Рисунок 17) и его депо-форма фамцикловир. PCV нашел применение при лечении поражений кожи, вызванных HSV, кроме того этот препарат подавляет развитие штамма HSV-1, несущего ген мутантной ДНК-полимеразы [53]. Для проявления действия по отношению к HSV-1 необходимо его превращение в монофосфат вирусной тимидинкиназой.

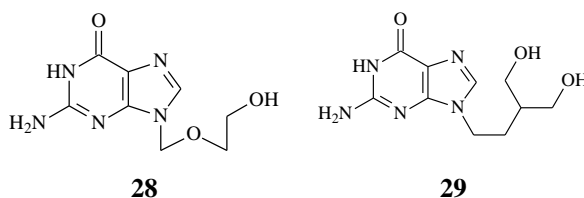


Рисунок 18 – Ацикловир (АСВ, **28**) и его структурный аналог – пенцикловир (PCV, **29**)

Рассмотренный ранее препарат фоскарнет (PFA) является ненуклеозидным ингибитором ДНК-полимеразы не только HCMV, но и HSV. PFA неконкурентно (по отношению к нуклеотидам) блокирует активный центр фермента, препятствуя связыванию входящего нуклеозидтрифосфата [54]. Фоскарнет из-за высокой токсичности используется только в случае неэффективности лечения ацикловиrom и другими нуклеозидными аналогами, если к ним возникает резистентность [23].

Кроме воздействия на основные ферменты-мишени (ДНК-полимеразу и тимидинкиназу) существует много других возможных механизмов действия препаратов против HSV. Альтернативными мишенями могут быть, например, комплекс вирусной хеликазы-праймазы (гены UL5, UL52, UL8), расплетающий ДНК и синтезирующий праймер, или (как и в случае с CMV) поздние стадии репликации вируса (сборка, упаковка генома и выход нуклеокапсида из ядра) и участвующие в них белки - UL36 и UL37 [24].

Мишеней много, однако, эффективных и малотоксичных препаратов как против эталонного штамма вируса простого герпеса, так и против резистентных к известным герпетическим препаратам штаммов пока нет. Следовательно, поиск новых препаратов с новым механизмом действия остается актуальным. Такие соединения могут быть найдены среди нуклеозидов бензимидазола, обладающих на данный момент довольно узкоспецифичным действием и широкими возможностями для модификаций. Четкое определение их клеточных

мишеней позволит в последствии получить препараты с высокой противовирусной активностью в сочетании с низкой системной токсичностью.

1.3 Способы получения нуклеозидов бензимидазола

Первые сообщения о разработке химических подходов к синтезу нуклеозидов бензимидазола появились в середине прошлого века [16, 55, 56]. И только в последние 30 лет с развитием генно-инженерных способов получения ферментов нуклеинового обмена стали активно развиваться химико-ферментативные методы синтеза, характеризующиеся стереоселективностью и высокой эффективностью [57 - 59].

1.3.1 Химические способы синтеза нуклеозидов бензимидазола

Все подходы к получению нуклеозидов бензимидазола можно подразделить на 2 способа: конденсация основания бензимидазола с защищенным углеводным остатком в основе которой лежит классическая реакция Форбрюггена [60, 61]. После удаления защитных групп получается обычно смесь нуклеозидов (α - и β -) (Рисунок 18) в разной пропорции, разделение которой представляет значительную трудность [62, 63]. Существующие модификации этого способа: использование силильного метода синтеза, селективных катализаторов, растворителей и температурного режима обеспечивают преимущественное образование того или иного регио- и/или стереоизомера [60, 62 - 64].

Второй подход к получению нуклеозидов бензимидазола – модификация ранее синтезированного нуклеозида по основанию или по остатку углевода. Такой подход ограничен наличием доступных исходных соединений для модификации.

1.3.1.1 Синтез β -D-рибозидов бензимидазола реакцией гликозилирования

Общая схема синтеза нуклеозидов реакцией гликозилирования представлена на рисунке 19.

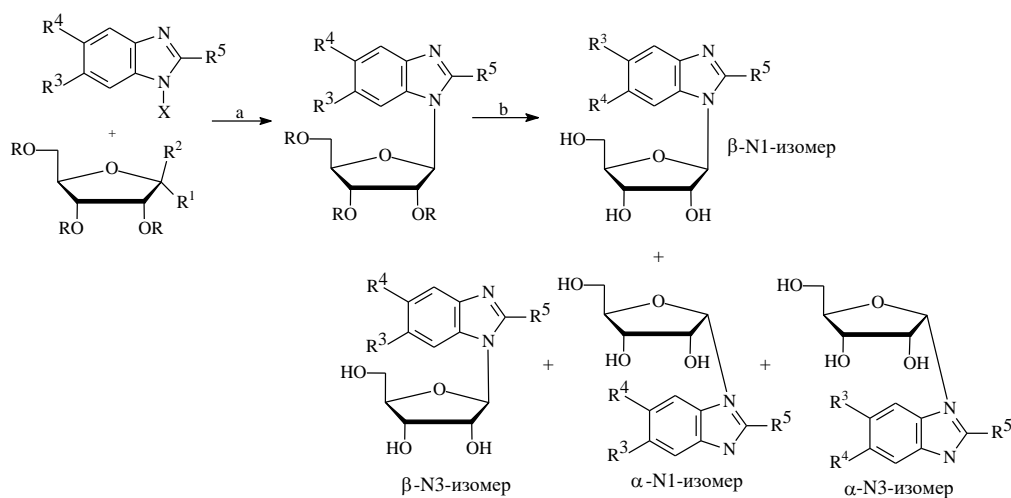


Рисунок 19 – Общая схема реакции гликозилирования

Защитные группы, реагенты и выходы целевых нуклеозидов приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия реакций гликозилирования оснований бензимидазола

Целевое соед.	Углеводный остаток			Бензимидазол				Реагенты	Соотношение изомеров в смеси, выход β -D- нуклеозида	Лит.
	R	R ¹	R ²	X	R ³	R ⁴	R ⁵			
4a (DRB)	Bz	Cl, H		HgCl	Cl	Cl	H	a) с отгонкой ксилола b) NaOCH ₃ , метанол	- 68 %	[16]
	Bz	H	OAc	H	Cl	Cl	H	a) сплавление при 170-180 °C, кат. TSA, 1 ч b) NH ₃ /MeOH	смесь α/β -изомеров 1:1, 51 %	[65]
	Bz	H	OAc	H	Cl	Cl	H	a) BSA, TMSOTf, CH ₃ CN b) NH ₃ /MeOH	- 51%	[18, 66]
12a	OAc				F	F	Cl	a) TAR, BSA, TMSOTf b) NH ₃ /MeOH	смесь α/β -изомеров, преобладает β , выход: 50 %	[35]
12b	OAc				Br	Br	Cl	a) TAR, BSA, TMSOTf b) Na ₂ CO ₃	смесь α/β -изомеров, преобладает β , выход: 64 %	
12c	OAc				I	I	Cl	a) TAR, BSA, TMSOTf b) Na ₂ CO ₃	смесь α/β -изомеров, преобладает β , выход: 68 %	

TSA - *p*-толуолсульфокислота; BSA - N,O-бис(триметилсилил)ацетамид;

TMSOTf - триметилсилилтрифторметансульфонат; TAR - 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил- β -D-рибофураноза.

Данный способ синтеза удобен в случае получения нуклеозидов с одинаковыми заместителями R³ и R⁴ бензимидазольного кольца. Если они различаются, то в процессе гликозилирования образуется смесь N1, N3-региоизомеров и процесс их выделения из реакционной смеси усложняется. На рисунке 20 представлен вариант синтеза 2,5(6)-дихлор-1-(β -D-рибофуранозил)бензимидазолов.

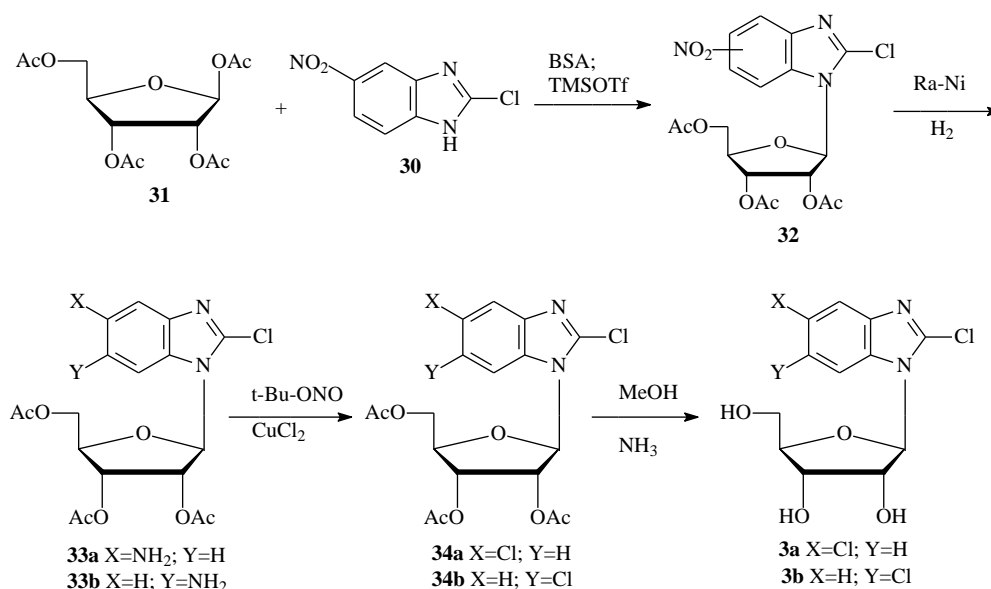
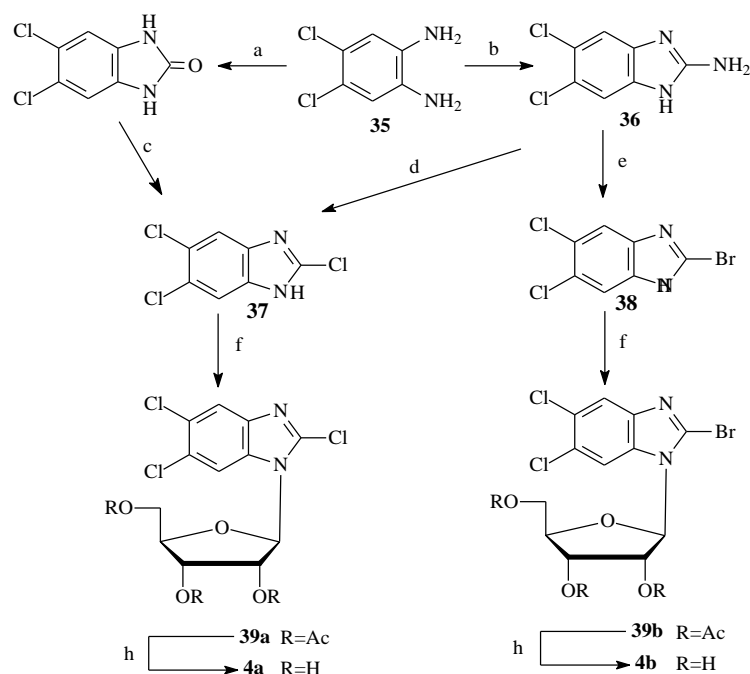


Рисунок 20 – Синтез 2,5(6)-дихлор-1-(β -D-рибофуранозил)бензимидазола

2-Хлор-5(6)-нитробензимидазол (30) был рибозилирован 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил- β -D-рибофуранозой (31) с выходом 71 % в виде смеси изомеров – 2-хлор-5-нитро- и 2-хлор-6-нитро-

1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)бензимидазола (**32**). Эти изомеры были восстановлены никелем Ренея в соответствующие аминопроизводные (**33a**) и (**33b**), которые были разделены колоночной хроматографией на силикагеле. Далее следовала стадия введения атома хлора в соответствующее положение бензимидазольного кольца. 5-Аминоизомер (**33a**) был диазотирован при помощи трет-бутил нитрита и хлорида меди в ацетонитриле, в результате было получено чистое 5-хлорпроизводное (**34a**) с выходом 56 %. Параллельное диазотирование 6-амино изомера (**33b**) привело к образованию 6-хлор производного (**34b**) с выходом 59 %. После удаления ацетильных защитных групп действием аммиака в метаноле получили 2,5-дихлор- (**3a**) и 2,6-дихлор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**3b**), соответственно [19].

Для синтеза TCRB (**4a**) и BDCRB (**4b**) был разработан единый подход, представленный на рисунке 21. На первом этапе синтезировали 2,5,6-трихлорбензимидазол (**37**) из коммерчески доступного 4,5-дихлор-*O*-фенилендиамина (**34**) замыканием цикла бромцианом в метаноле с последующим диазотированием амина-производного (**36**) (Рисунок 21) [12]. Указанный выше метод циклизации 4,5-дихлор-*O*-фенилендиамина (**35**) бромцианом - это хорошо известный метод синтеза различных 2-амино бензимидазолов [67 - 69]. После некоторых модификаций [12] удалось получить 2-амино-5,6-дихлорбензимидазол (**36**) с выходом 98 % вместо 22 %, указанных ранее в работе [70]. Следовательно и 2,5,6-трихлорбензимидазол (**37**) был получен с более высоким общим выходом.



- (a) Мочевина, амиловый спирт; (b) CNBr, MeOH; (c) POCl₃, HCl; (d) HCl, NaONO, CuCl₂; (e) HBr, NaONO, CuBr; (f) (1) N,O-бис(триметилсилил)ацетамид (BSA)/CH₃CN, (2) 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил-β-*D*-рибофураноза (TAR), триметилсилилтрифторметансульфонат (TMSOTf); (h) NH₃/MeOH.

Рисунок 21 – Схема синтеза синтеза TCRB (**4a**) и BDCRB (**4b**)

Второй этап синтеза TCRB (**4a**) - получение целевого рибофуранозидов - включал в себя силилирование 2,5,6-трихлорбензимидазола (**37**) N,O-бис(триметилсилил)ацетамидом (BSA) с последующим рибозилированием TAR, (**31**) в присутствии триметилсилил-трифторметансульфоната (TMSOTf) [71]. В результате был получен 2,5,6-трихлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**39a**) с незначительной примесью α-аномера. После удаления ацетильных групп действием аммиака в метаноле было получено целевое соединение - TCRB (**4a**) - с выходом 74 % [12].

BDCRB (**4b**) был синтезирован аналогичным способом (Рисунок 21). 2-амино-5,6-дихлорбензимидазол (**36**) был диазотирован с помощью нитрита натрия в водном HBr. Соль диазония разлагалась с образованием 2-бром-5,6-дихлорбензимидазола (**38**) в присутствии бромида меди. 2-Бром-5,6-дихлорбензимидазол (**38**) был затем силилирован с помощью BSA, после чего было проведено рибозилирование с помощью TAR в присутствии TMSOTf, в результате чего был получен 2-бром-5,6-дихлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**39b**). BDCRB был получен после удаления ацетильных защитных групп с выходом 37 % [12].

Поскольку было выяснено, что 2-йод-5,6-дихлорбензимидазол невозможно получить по реакции Зандмейера, для синтеза 5,6-дихлор-2-йод-1-β-*D*-рибофуранозилбензимидазола (**4d**, IDCRB) пришлось искать альтернативный путь синтеза [12]. Первым этапом синтеза, необходимым для исследования специфики диазотирования в неводной среде 2-амино-5,6-дизамещенных рибозидов бензимидазола с помощью третичных алкил-нитритов, стал синтез 2-амино-5,6-дихлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)бензимидазола (**40**) (Рисунок 21). Для этого 2-амино-5,6-дихлор-бензимидазол (**36**) был силилирован с последующим рибозилированием с помощью TAR (**31**) с 51 % выходом защищенного рибофуранозидов (**40**). Затем он был обработан десятикратным избытком трет-бутил нитрита в CH₂I₂ в безводных условиях в течение 24 часов при 110 °C. Однако вместо соединения (**45**) был получен 5,6-дихлор-4-нитро-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол-2-он (**43**) [72]. Механизм этой реакции был установлен благодаря выделению ключевого интермедиата - 5,6-дихлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол-2-она (**41**). Это промежуточное соединение было синтезировано отдельно для подтверждения структуры интермедиата. Для этого 5,6-дихлор-бензимидазол-2-он [73], который был в свою очередь получен путем замыкания цикла 4,5-дихлор-1,2-фенилендиамина (**35**) в присутствии мочевины (Рисунок 20), был подвергнут рибозилированию [12]. Когда соединение (**41**) было обработано 10 эквивалентами трет-бутил нитрита в дийодметане при 100 °C, конверсия в 4-нитро-производное (**43**) завершилась полностью через 2 часа, при этом не наблюдалось образование каких-либо других побочных продуктов. После перекристаллизации соединение (**43**) было получено с

выходом 86 %, и из него после снятия защит было получено незащищенное 4-нитро-производное (**44**) (Рисунок 22).

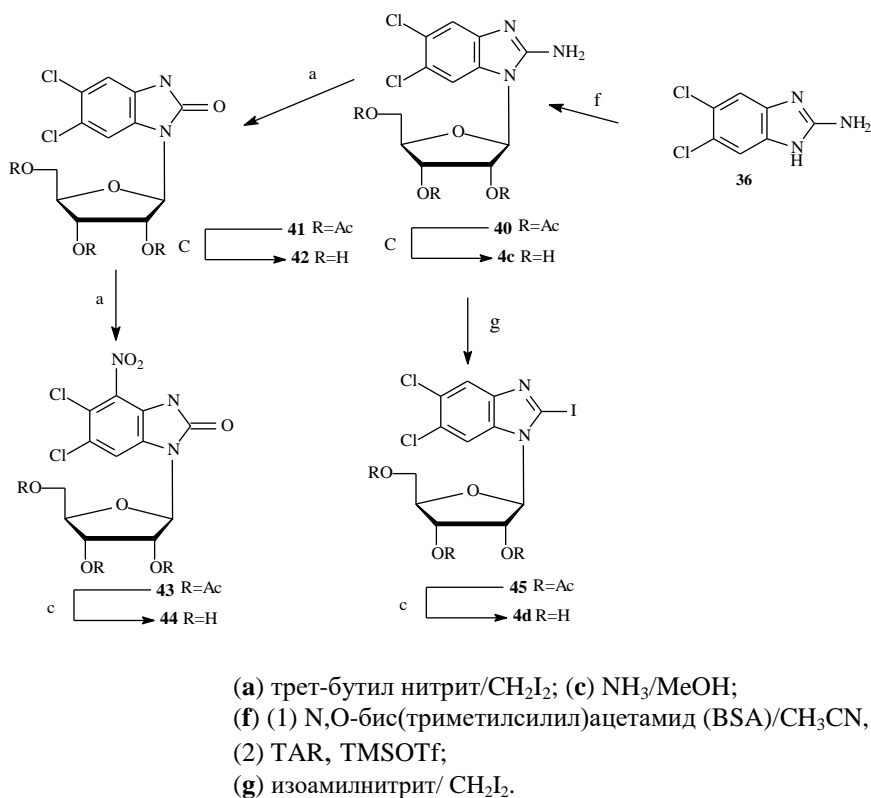


Рисунок 22 – Схема синтеза нуклеозида (**4d**)

2-Йод-производное (**45**) может быть получено, когда в реакции диазотирования используется первичный алкилнитрит. Для этого соединение (**40**) обрабатывали амил- или изоамилнитритом в таких же условиях, в которых образовывался побочный продукт. В результате было получено одно и то же соединение - 5,6-дихлор-2-йод-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил- β -*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**45**) с выходом 55 или 63 %, соответственно. Целевой 5,6-дихлор-2-йод-1-(β -*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**4d**) был получен после удаления защитных групп аммиаком в метаноле (Рисунок 22) [12].

Рибозиды моно- (**49a**) и ди-фтор-замещенных (**49b**) бензимидазолов и их N3 региоизомеры (**50**) были синтезированы по реакции Форбрюггена (Рисунок 23). Кипячение 4-фтор-1H-бензимидазола (**46**) с N,O-бис(триметилсилил)ацетамидом (BSA) и последующая реакция персилилированного основания с TAR, (**31**) в присутствии триметилсилилтрифторметансульфоната позволили получить 2',3',5'-три-*O*-ацетил-4-фтор-1-(β -*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**47a**) с выходом 65 %. Побочный N-3 изомер (**47a**) был получен с выходом 8 % [74].

В случае синтеза 4,6-дифтор-1H-бензимидазола (**49b**) целевой защищенный β -*D*-рибофуранозид (**47b**) был получен с 67 % выходом, в то время как выход N3 (**48b**) изомера составил 11 %. После разделения продуктов реакции проводили удаление ацетильных защит

нуклеозидов (47) и (48) в метанольном аммиаке. Свободные нуклеозиды (49a) и (49b) были получены с выходами 89 и 94 %, соответственно [74].

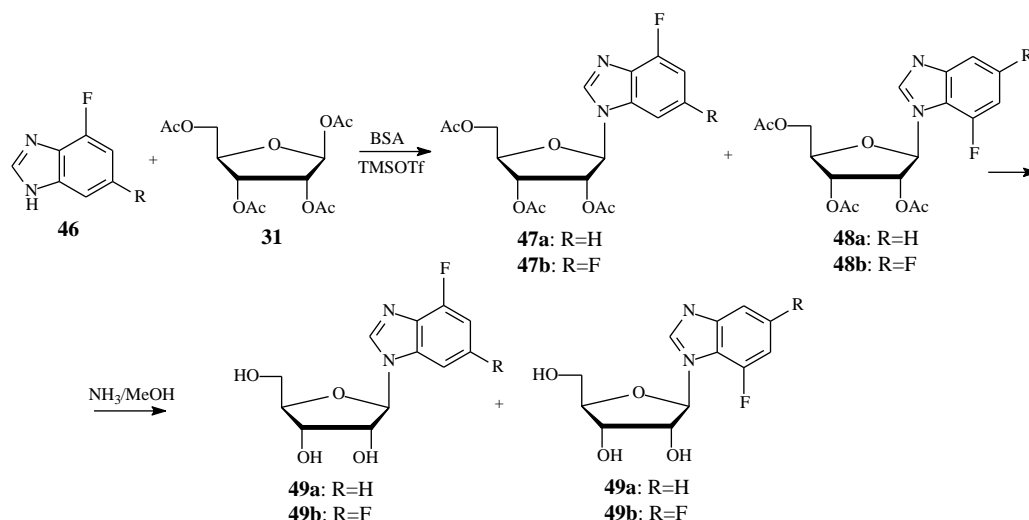
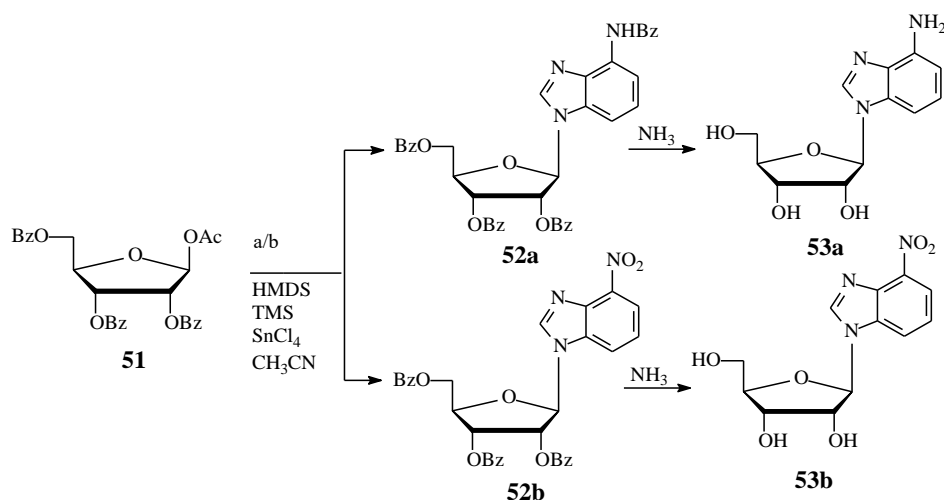


Рисунок 23 – Схема синтеза рибозидов моно- (45) и ди- (46) фторзамещенных бензимидазолов и их N3-региоизомеров

4-Амино/нитро-бензимидазольные рибозиды (53) были получены с использованием реакции Форбрюггена: исходные основания 4-(N-бензоил-амино)бензимидазол (a) или 4-нитро-бензимидазол (b) (Рисунок 24) гликозилировали 1-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоил-β-*D*-рибофуранозой (ABR) (51) при комнатной температуре без промежуточного выделения силильных производных гетероциклических оснований, полученных обработкой смесью гексаметилдисилазан (HMDS)/триметилхлорсилан (TMS). В качестве катализатора использовали хлорное олово [71, 76]. Нуклеозиды (53a,b) были получены после удаления защитных групп нуклеозидов (52a,b) 25 % раствором аммиака.



a: 4-(N-бензоил-амино)бензимидазол

b: 4-нитро-бензимидазол

Рисунок 24 – Схема синтеза рибозидов 4-амино- (53a) и 4-нитро-бензимидазола (53b)

1.3.1.2 Синтез 2'-дезоксирiboаналогов 5,6-дихлорбензимидазола, замещенных по C2 положению основания

Среди синтетических нуклеозидов бензимидазола основную группу составляют β -D-рибозиды. Для 5,6-дихлорбензимидазола, замещенного по С2 положению основания, были синтезированы 2'-дезоксиприбозиды. Для синтеза была использована реакция стереоселективного гликозилирования основания - 2,5,6-трихлорбензимидазола (**37**) 2-дезоксипри- β -D-эритро-пентофуранозил хлоридом (**54**) [77], в которой преимущественно образуются β -аномеры. Требуемый 2,5,6-трихлор-1-(2-дезоксипри- β -D-эритро-пентофуранозил) бензимидазол **55a** был получен с выходом 89 % (Рисунок 25). Свободный целевой нуклеозид 2,5,6-трихлор-1-(2-дезоксипри- β -D-эритро-пентофуранозил)бензимидазол **56a** выделен после удаления защит с выходом 63 %. Другие β -D-2'-дезоксиприбозиды (**56c-h**) были синтезированы из соответствующих замещенных бензимидазолов (**37c-h**). 5,6-Дихлор-2-метокси-1-(2'-дезоксипри- β -D-эритро-пентофуранозил)бензимидазол (**56j**) был получен обработкой соединения (**37a**) метилатом натрия в метаноле [78, 79].

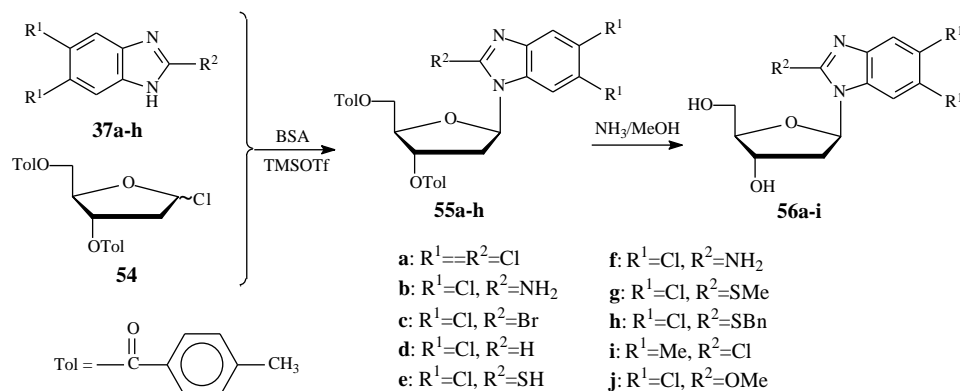


Рисунок 25 – Схема синтеза 2'-дезоксирiboаналогов 5,6-дихлорбензимидазола, замещенных по С2 положению основания

В результате обработки нуклеозида (**55a**) азидом лития и последующего снятия защитных групп метанольным аммиаком был получен 2-азидо-5,6-дихлор-1-(2-дезоксид-β-*D*-эритро-пентофуранозил)бензимидазол (**58**) (Рисунок 26). 2-Амино-5,6-дихлор-1-(2'-дезоксид-β-*D*-эритро-пентофуранозил)бензимидазол (**27a**) был получен восстановлением нуклеозида (**58**) никелем Ренея [33].

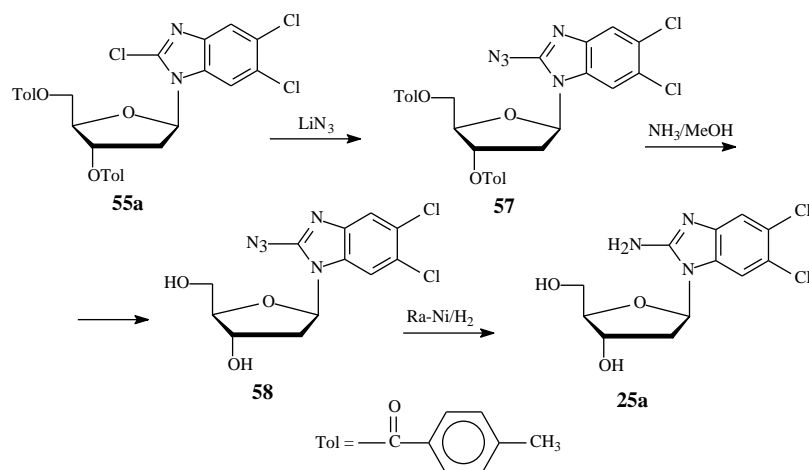
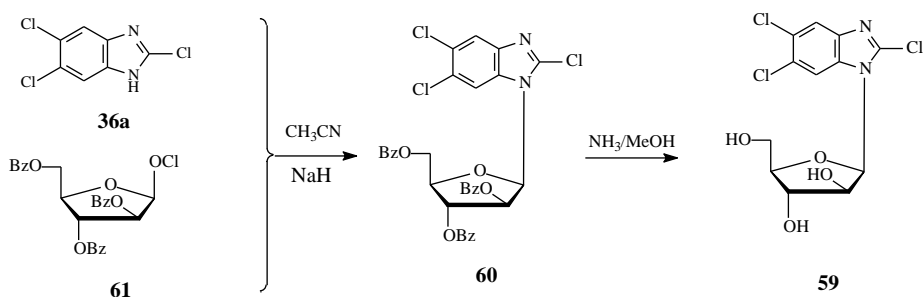


Рисунок 26 – Схема синтеза 2'-дезоксирiboаналогов 2-амино-5,6-дихлорбензимидазола (**25a**)

1.3.1.3 Синтез 2'-арабинозидов бензимидазола

Информация по синтезу β -D-арабинозидов бензимидазола весьма ограничена, несмотря на то, что среди противовирусных и противоопухолевых нуклеозидов других гетероциклических оснований есть несколько соединений с доказанной лечебной эффективностью (видарабин, неларабин, клофарабин, флудара, цитарабин). Интересно, что синтез α -D- и α -L-арабинозидов в литературе описан [14, 80 - 82], а вот способы получения β -D-арабинозидов практически не описаны.

В патенте US 5360795 A [83], автором которого является *Townsend*, была приведена методика синтеза 2,5,6-трихлор-1-(β -D-арабинофуранозил)бензимидазола (**59**) из соответствующего 2,5,6-трихлор-1-(2,3,5-три-O-бензил- β -D-арабинофуранозил)бензимидазола (**60**) (Рисунок 27), который, в свою очередь, был синтезирован из основания **37a** и 2,3,5-три-O-бензил-D-арабинофураноксилхлорида (**61**). Структура целевого β -D-нуклеозида (**59**) не была подтверждена спектральными характеристиками [83].



фторированного углевода с гетероциклическим основанием. Поскольку в работе [84] сообщается, что гликозилирование некоторых пуриновых оснований 2'-дезоксид-2'-фторарабинофуранозил-производными идет очень сложно и медленно, *Gudmundsson и соавторы* исследовали в своей работе [44] возможность фторирования диэтиламиносульфотрифторидом (DAST) *O*-тритил-защищенного нуклеозида - TCRB (**4a**). Как сообщалось ранее [85], DAST является эффективным фторирующим агентом β -нуклеозидов. Поскольку известно, что для проведения атаки слабо-нуклеофильным фторидом критически важна конформация защищенного фуранозного остатка углевода, для замещения уходящих групп во 2'-положении, очень важно, чтобы фуранозное кольцо имело конформацию, неблагоприятную для транс-элиминирования. Для этого можно использовать объемные защитные группы в C5' и C3' положениях. С этой целью был синтезирован 2,5,6-трихлор-1-(3',5'-ди-*O*-тритил- β -*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**63**) (Рисунок 28).

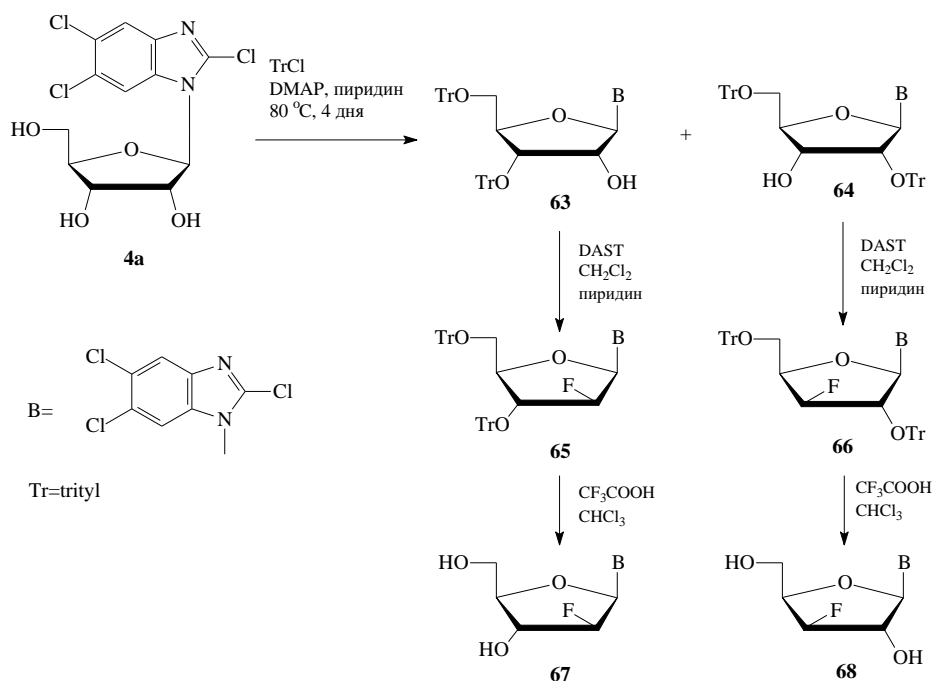


Рисунок 28 – Схема синтеза 2'- и 3'-фтор-нуклеозидов бензимидазола

В результате тритилирования исходного нуклеозида (**4a**) с использованием TrCl и 4-диметиламинопиридина (DMAP) в пиридине при 80 °C в течение 4-х дней образуется смесь дитритильных производных (**63**) и (**64**) с общим выходом 38 %. Все попытки улучшить выход в реакции, увеличивая время реакции, повышая температуру или используя другие основания вместо DMAP, не привели к ощутимым результатам. Ди-*O*-тритил-производные (**63**) и (**64**) не удалось разделить колоночной флэш-хроматографией, но они были разделены тонкослойной хроматографией в системе этилацетат/гексан, 1:2. Эти нуклеозиды также могут быть разделены фракционной кристаллизацией из диэтилового эфира, образуя в результате смесь 3:1 (соединений (**64**) и (**63**), соответственно).

Поскольку производное (**64**) было получено с выходом 30 %, в то время как соединение (**63**) - с выходом только 10 %, то именно нуклеозид (**64**) был использован для дальнейшего синтеза фторированного производного - 2,5,6-трихлор-(ксилофуранозил)бензимидазола (**68**). Фторирование нуклеозида (**64**) с помощью DAST и пиридина в CH_2Cl_2 привело к фтор-ксилозиду (**66**) с выходом 71 %. Фторирование 3',5'-дитритильного производного (**63**) в тех же условиях привело к получению 2'-фтор-2'-арабинозида (**65**) с выходом 63 %. После удаления тритильных групп из соединений (**65**) и (**66**) (10 % CF_3COOH в хлороформе) были получены целевые продукты 2,5,6-трихлор-1-(2'-дезоксид-2'-фтор- β -D-арабинофуранозил)бензимидазол (**67**) и 2,5,6-трихлор-1-(3'-дезоксид-3'-фтор- β -D-ксилофуранозил)бензимидазол (**68**), соответственно (Рисунок 28).

В результате реализации такой схемы синтеза требуемое фтор-арабинофуранозил-производное (**67**) было получено с общим выходом всего лишь 5 % [45].

Другой способ получения фторированных по остатку углевода арабинонуклеозидов бензимидазола - конденсация фторированного углевода с основанием - бензимидазолом. Для того, чтобы синтезировать 2,5,6-трихлор-1-(2'-дезоксид-2'-фтор- β -D-арабинофуранозил)бензимидазол (**67**), соответствующую галагенозу (**69**) конденсируют с 2,5,6-трихлорбензимидазолом (**37a**) [46]. Конвергентные синтезы ряда 2'-дезоксид-2-фтор- β -D-арабинофуранозилнуклеозидов были описаны двумя группами ученых [86]. Первые попытки синтеза гликозидной связи по методу Форбрюггена с использованием в реакции солей щелочных металлов гетероцикла (**37a**) были неудачными. В конечном итоге удалось провести гликозилирование основания (**37a**) с 1-бром-3,5-ди-O-бензоил-2-дезоксид-2-фтор- α -D-арабинофуранозой (**69**) [88], используя условия близкие к описанным в работе [89]: конденсация осуществлялась в дихлорэтано при 80 °C в присутствии молекулярных сит 4A (Рисунок 29). В результате была получена смесь аномеров, после разделения которой и удаления защитных групп был получен 2'-дезоксид-2'-фтор- β -D-арабино-аналог TCRB (**67**).

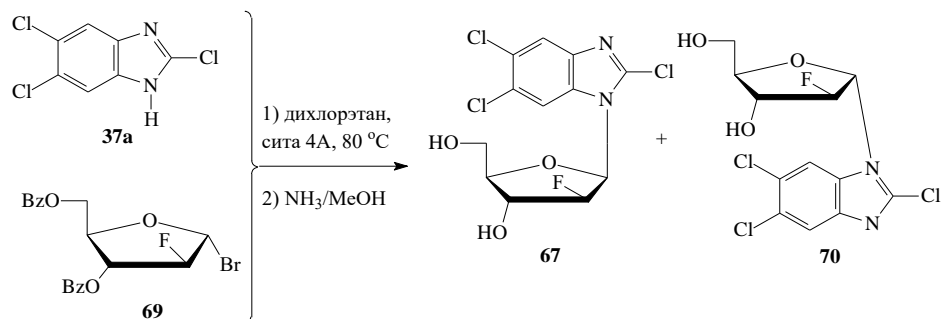


Рисунок 29 – Схема синтеза 2'-фтор-арабинозидов бензимидазола

Дальнейшие исследования реакции показали, что соотношение аномеров в смеси сильно зависит от условий конденсации. Конденсация в неполярных растворителях (например,

дихлорэтан (условия конденсации, описанные выше) и бензол) приводит к образованию преимущественно β -аномера (**67**) (соотношение β : α 5:1-10:1). А α -аномер (**70**) преобладает в смеси при проведении реакции в более полярных растворителях, таких как ацетонитрил и нитрометан. Суммарные выходы продуктов гораздо выше в дихлорэтано (80 %, соотношение изомеров β : α 8:1), чем в ацетонитриле (9 %, соотношение изомеров β : α 1:7). В результате проведения реакции в условиях, приведенных на рисунке 29, целевой β -аномер (**67**) был получен с выходом 50 % (Рисунок 29) [44].

При гликозилровании основания (**71**) фторированным фуранозидом (**69**) в системе трис[2-(2-метоксиэтокси)этил]амин (TDA-1)/KOH/ацетонитрил (Рисунок 30) был получен защищенный 2'-дезоксиз-2'-фторнуклеозид (**72**) с выходом 42 %. После удаления защит аммонолизом и хроматографического разделения компонентов смеси нуклеозид (**73**) был получен с выходом 61 % [39].

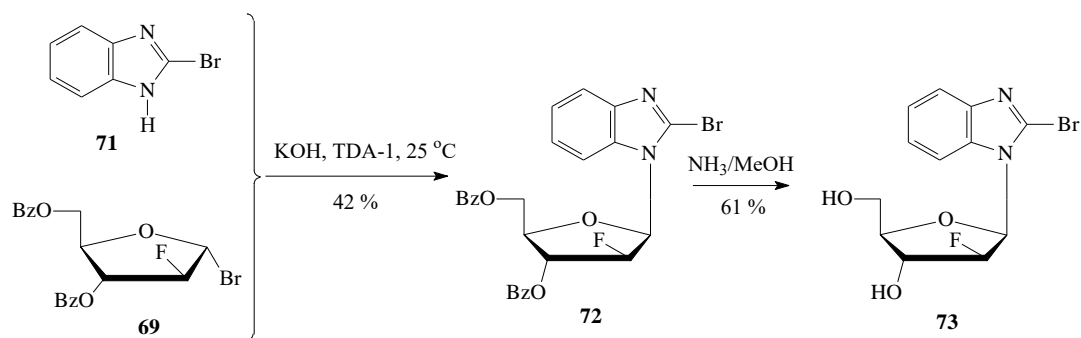
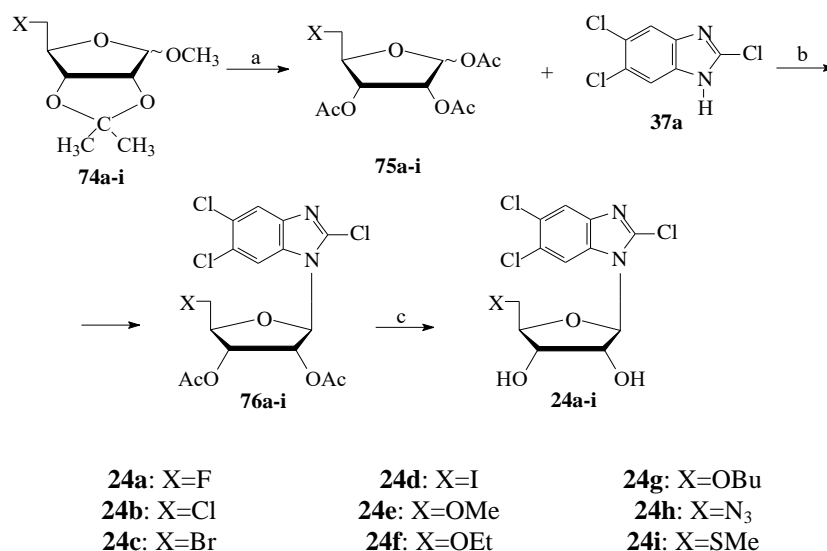


Рисунок 30 – Схема синтеза 2'-фтор- арабинозидов 2-бромбензимидазола (**72**)

1.3.1.5 Синтез 5'-замещенных производных 2,5,6-трихлорбензимидазола

В работе [44] описан синтез серии 5'-замещенных нуклеозидов 2-хлорбензимидазола (**24a-i**) (Рисунок 31). Метил 5-*O*-алкил-2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозиды (**74e-g**) были синтезированы по методике, предложенной ранее [90].

Метилгликозиды **74e-g** были конвертированы в 1,2,3-три-*O*-ацетил-5-*O*-алкил-*D*-рибофуранозы (**75e-g**) в разбавленной хлористоводородной кислоты и последующим ацетилированием при помощи уксусного ангидрида в пиридине. Производными (**75e-g**) гликозилировали 2,5,6-трихлорбензимидазол (**37a**), используя вариант реакции Форбрюггена [91] были получены 2,5,6-трихлор-1-(2,3-ди-*O*-ацетил-5-*O*-алкил- β -*D*-рибофуранозил)бензимидазолы (**76e-g**) с высокими выходами. После обработки соединений (**76e-g**) карбонатом натрия в водном этаноле были получены целевые 2,5,6-трихлор-1-(5-*O*-алкил- β -*D*-рибофуранозил)бензимидазолы (**24e-g**) (Рисунок 31).



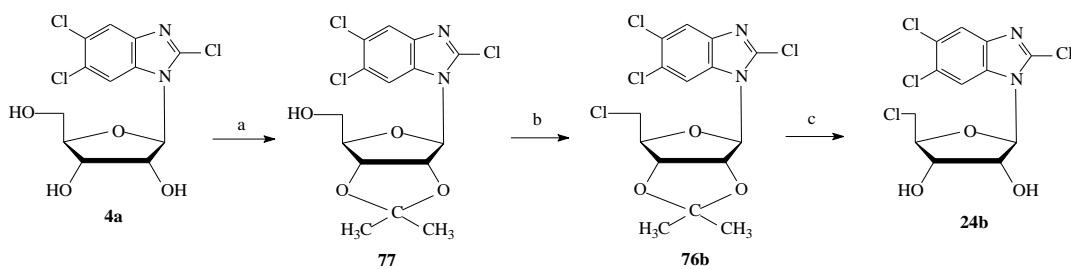
a: 1) 0.04 N HCl, кипячение 2) Ac₂O, пиридин
b: 1) бис(триметилсилил)ацетамид (BSA), CH₃CN,
 2) триметилсилилтрифторметансульфонат (TMSOTf), CH₃CN
c: Na₂CO₃, водный EtOH

Рисунок 31 – Схема синтеза 5'-замещенных рибозидов 2,5,6-трихлорбензимидазола (**24**)

5'-Хлорпроизводное (**24b**) было синтезировано в 4 стадии из 1-метил-5-хлор-5-дезоксид-2,3-*O*-изопропилиден-β-*D*-рибофуранозида (**74b**) [92]. Соединение (**74b**) было переведено в 1,2,3-три-*O*-ацетил-5-хлор-5-дезоксид-β-*D*-рибофуранозу (**75b**) и конденсировано с гетероциклом (**36a**). После удаления защитных групп было получено соединение (**24b**). По этому пути были синтезированы остальные 5'-галогенированные производные (**24a,c-d**), поскольку в нем отсутствует риск нежелательного обмена галогенов в С-2 положении бензимидазольного фрагмента. 1-Метил-5-дезоксид-5-фтор-2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозид (**74a**) [93], 1-метил-5-бром-5-дезоксид-2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозид (**74c**) [94], и 1-метил-5-дезоксид-5-йод-2,3-*O*-изопропилиден-*D*-рибофуранозид (**74d**) [95] были синтезированы по такой же схеме. Целевые нуклеозиды (**24a, c-d**) были получены с высокими выходами [93, 96, 44].

Для синтеза 5'-дезоксид-5'-хлораналога (**24b**) также был предложен альтернативный метод синтеза: рибозид (**4a**) защищали изопропилиденовым остатком, после чего замещали 5'-ОН группу на атом хлора (Рисунок 32).

TCRB (**4a**) защищали изопропилиденовым остатком, продукт (**77**) обрабатывали тетрахлорметаном и трифенилфосфином, в результате чего было получено соединение (**74**), из которого после снятия защит в кислой среде было получено соединение (**24b**) [44].



a: ацетон, 2,2-диметоксипропан, Dowex 50 H+,
b: PPh₃, CCl₄, CH₃CN
c: 2N HCl, ТГФ

Рисунок 32 – Схема синтеза 5'-хлор-5'-дезоксид-β-D-рибофуранозил-2,5,6-трихлорбензимидазола (**24b**)

2,5,6-Трихлор-1-(5'-дезоксид-5'-(метилтио)-β-D-рибофуранозил)бензимидазол (**24i**) был синтезирован из 1,2,3-три-*O*-ацетил-5-дезоксид-5-(метилтио)рибофуранозы (**74i**) по методике, описанной в работах *Montgomery* и *Kanazawa* [97].

1.3.1.6 Синтез серии β-*L*-нуклеозидов бензимидазола

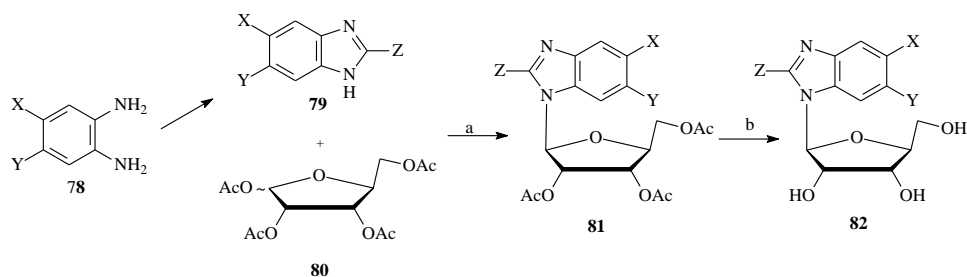
2-Изопропиламино-5,6-дихлор-1-(β-*L*-рибофуранозил)бензимидазол (Марибавир, **13**) и некоторые другие 2-алкиламино-аналоги были получены с использованием универсального подхода синтеза серии *L*-нуклеозидов бензимидазола, изложенного в патенте, автором которого является *Chamberlain S. D.* [99].

Общая методика синтеза *L*-нуклеозидов бензимидазола – аналогов Марибавира, состоит из трех этапов. Первый этап – синтез 2-(алкиламино)бензимидазольных оснований (**75**) (Рисунок 33). Соответствующий 1,2-фенилендиамин (**78**) конденсируют с соответствующим изотиосульфатом в безводном пиридине. Смесь нагревают до 80 °C и добавляют к ней 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимид мета-*n*-толуолсульфонат.

Второй этап - реакция гликозилирования 2-(алкиламино)-бензимидазола 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил-*L*-рибофуранозой. Полученный на первом этапе 2-(алкиламино)бензимидазол (**79**) в 1,2-дихлорэтаноле нагревают с BSA при 80 °C. Затем к смеси добавляют TMSOTf и 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил-*L*-рибофуранозу. Реакционную смесь выдерживают при 80 °C в течение нескольких часов, затем охлаждают до комнатной температуры, разбавляют 5 % водным раствором бикарбоната натрия.

Третий этап - снятие защиты с 2-(алкиламино)-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)-бензимидазола (**81**), полученного на предыдущей стадии. Для этого 2-(алкиламино)-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*D*-рибофуранозил)-бензимидазол растворили в этаноле и добавили к нему водную суспензию карбоната натрия и метанола (Рисунок 32). Продукты

реакции экстрагировали этилацетатом и промывали насыщенным водным солевым раствором и выделяют продукт (**82**) с помощью хроматографии на силикагеле [99].



a: 1) BSA, дихлорэтан, 80 °C; 2) TMSOTf, 80 °C;

b: Na₂CO₃

X = Y = Cl, Br, Z = изопропиламино, циклопропиламино.

Рисунок 33 – Схема синтеза 2-(алкиламино)бензимидазольных β-*L*-рибозидов (**82**)

Второй вариант синтеза Марибавира (**13**) состоит в выдерживании 2-бром-5,6-дихлор-1-(2,3,5-три-*O*-ацетил-β-*L*-рибофуранозил)-бензимидазола (**83**) с изопропиламино в абсолютном этаноле при 75 °C в течение 48 часов (Рисунок 34). Целевой продукт (Марибавир) был выделен из реакционной смеси колоночной хроматографией на силикагеле [100].

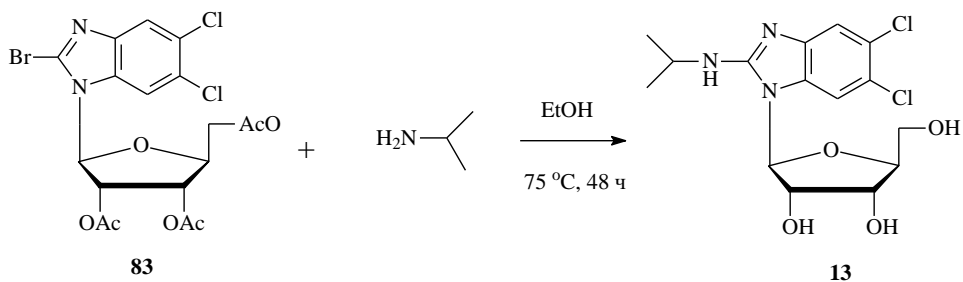
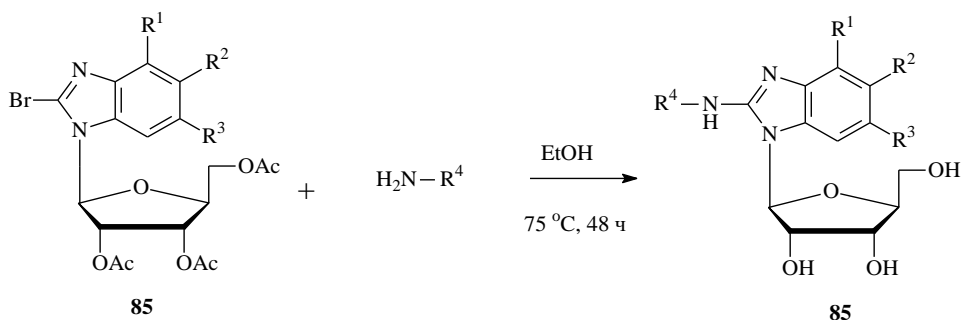


Рисунок 34 – Схема синтеза Марибавира (**13**)



a: R¹=R²=R³=Cl; R⁴= *i*-Pr

b: R¹=R²=R³=Cl; R⁴= *cyclo*-Pr

c: R¹=Br, R²=R³=Cl; R⁴= *i*-Pr

d: R¹= Br, R²=R³=Cl; R⁴= *cyclo*-Pr

e: R¹= R³=Cl; R²=H, R⁴= *i*-Pr

g: R¹= R²=Cl; R³=H, R⁴= *i*-Pr

Рисунок 35 – Схема синтеза 2-(алкиламино)бензимидазольных β-*L*-рибозидов (**85**)

С помощью этого подхода были синтезированы следующие аналоги Марибавира: 2-(изопропиламино)-4,5,6-трихлор- (**85a**), 2-(циклопропиламино)-4,5,6-трихлор- (**85b**), 4-бром-5,6-дихлор-2-(изопропиламино)- (**85c**), 4-бром-2-(циклопропиламино)-5,6-дихлор- (**85d**), 4,6-дихлор-2-(изопропиламино)- (**85e**) и 4,5-дихлор-2-(изопропиламино)-1-(β -*L*-рибофуранозил)-бензимидазолы (**85g**) (Рисунок 35).

Синтез β -*L*-2'-дезоксирибонуклеозидов бензимидазола проводили по схеме, представленной на рисунке 36. Первая стадия синтеза - реакция гликозилирования 5(6)-нитробензимидазола (**86**) 1- α -хлор-3,5-дигуанил-2-деокси- α -*L*-рибофуранозой (**87**) была проведена в ацетонитриле в присутствии KOH с использованием в качестве катализатора TDA-1. В результате реакции образовалась смесь N1- и N3-региоизомеров (**88**) и (**89**), которые были разделены с помощью флеш-хроматографии. Защита с обоих соединений была удалена действием раствора метилата натрия в метаноле. После кристаллизации из метанола соответствующие региоизомеры (**14**) и (**15**) были получены с выходами 59 и 62 % [39].

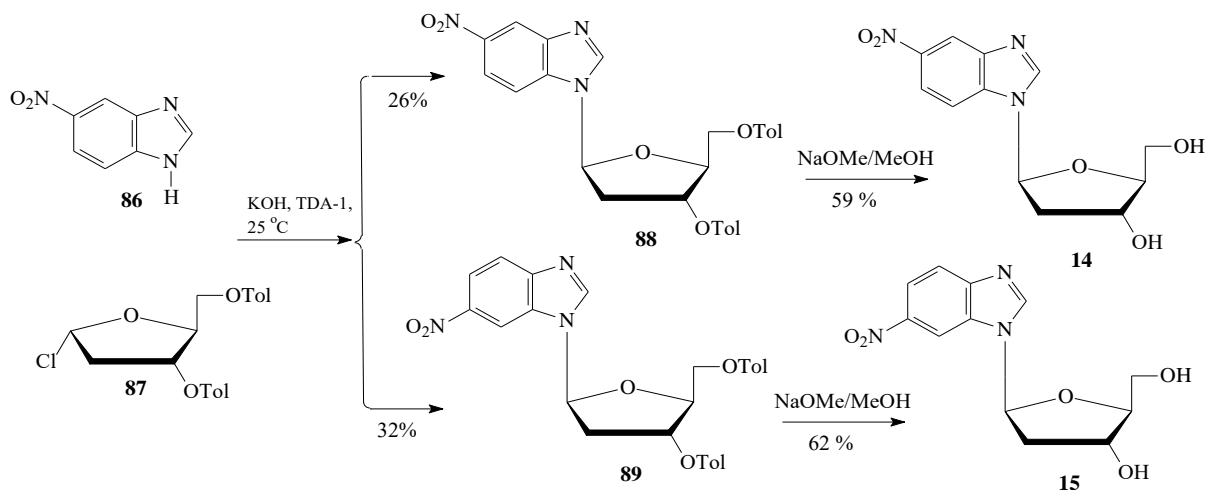


Рисунок 36 – схема синтеза β -*L*-2'-дезоксирибонуклеозидов бензимидазола

Гликозилирование 2-бромбензимидазола (**90**) и 4,5,6,7-тетрабромбензимидазола (**91**) с помощью галогенозы (**87**) было проведено с довольно высоким выходом (63 и 51 % соответственно) за счет использования гидрида натрия как показано на рисунке 37. Удаление толуильной защиты нуклеозидов (**92**) и (**93**) проводили с помощью 1 М раствора NaOMe/MeOH, в результате чего были получены β -*L*-нуклеозиды бром-бензимидазолов (**16**) (89 %) и (**17**) (51 %) [39].

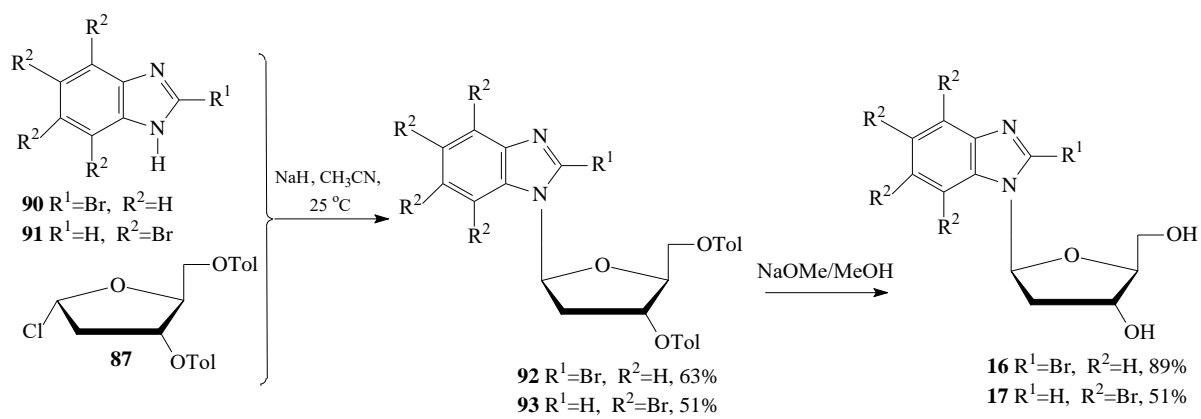


Рисунок 37 – схема синтеза β -L-2'-дезоксирибонуклеозидов бензимидазола (**16**) и (**17**)

1.3.2 Ферментативный способ получения модифицированных нуклеозидов

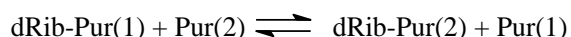
Альтернативой химическому способу синтеза нуклеозидов бензимидазола является ферментативное гликозилирование (трансгликозилирование), при котором реакция образования гликозидной связи протекает в водной среде в одну стадию (в отличие от многостадийных процессов химического синтеза). Данный способ не требует введения защитных групп ни в гетероциклическое основание, ни в углеводную часть молекулы и характеризуется стерео- и относительной региоселективностью процесса. Ферментативное гликозилирование является экологически чистым, безопасным, простым и высокоспецифичным способом получения нуклеозидов.

Реакция трансгликозилирования осуществляется с помощью бактериальных гликозилтрансфераз: нуклеозидфосфорилаз (NPs), N-рибозилтрансфераз (КФ 2.4.2.5) и N-дезоксирибозилтрансфераз (КФ 2.4.2.6) [101 - 104]. К NPs относятся уридинфосфорилаза (UP, КФ 2.4.2.3), тимидинфосфорилаза (TP, КФ 2.4.2.4) и пуриннуклеозидфосфорилаза (PNP, КФ 2.4.2.1).

1.3.2.1 Синтез нуклеозидов бензимидазола с применением N-дезоксирибозилтрансфераз (NDTs)

Такие микроорганизмы, как *Lactobacilli*, содержат достаточное количество N-дезоксирибозилтрансфераз. На данный момент обнаружено два класса таких ферментов: класс I (NDT-I) катализирует перенос остатка 2-дезоксирибозы исключительно между пуриновыми основаниями, класс II (NDT-II) - как между пуринами, так и между пиримидинами (Рисунок 38) [105].

для NDT-1



для NDT-2

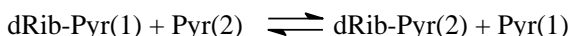
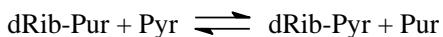
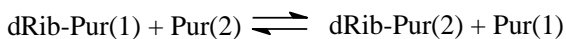
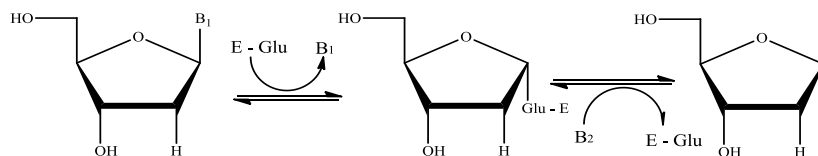


Рисунок 38 – Общая схема реакций трансгликозилирования, осуществляемых NDT 1 и 2 класса

Трансферазы получают в основном из *Lactobacillus helveticus* или *L. leichmanii*, их кинетические механизмы, каталитические и субстрат-связывающие сайты хорошо изучены и охарактеризованы. Ферменты специфичны в отношении 2'-дезоксирибозидов, реакции осуществляемые ферментами высоко стереоспецифичны - в результате образуются только β-аномеры нуклеозидов [106], и региоселективны - гликозилирование осуществляется по N-1

положению у пиримидинов и N-9 у пуринов [107]. Трансферзные реакции протекают через образование интермедиата - ковалентносвязанного комплекса дезоксирибозил-фермент [108 - 110] (Рисунок 39). Было доказано, что для связывания субстрата в активном центре фермента ключевое значение имеет остаток глутамина (Glu98) [111 - 113].



E - фермент, B₁ и B₂ - пурин или пиримидин, Glu - остаток глутамина

Рисунок 39 – Механизм реакции, катализируемой NDT

Лучшими донорами углеводного остатка в реакциях с NDT являются 2'-дезокситидин и тимидин, к акцепторным основаниям фермент толерантен, в качестве акцепторов могут использоваться различные структурные вариации оснований. Так, например, противолейкемическое средство 2'-дезоксинуклеозид 2-хлораденина, обладающий иммуносупрессивной активностью, был синтезирован с помощью NDT *L. leichmanii* [114]. С помощью NDT можно синтезировать также 2',3'-дидезоксинуклеозиды. Так, для синтеза 2',3'-дидезоксинуклеозидов природных оснований [115] и 2-галоген-замещенных-аденозинов [116] использовали в качестве катализатора NDT *L. helveticus*. Трансферазы из *L. leichmanii* могут катализировать перенос 2',3'-дидезоксирибозы с 2',3'-дидезокситидина на N(6)-замещенные аденины [117].

Первые данные о синтезе дезоксирибозидов бензимидазола с помощью NDT касаются непосредственно 2'-дезоксирибозида бензимидазола и 2'-дезоксирибозида 5,6-диметил-бензимидазола, которые были получены с конверсией 33 и 38 %, соответственно (продукты не были выделены и охарактеризованы) [105]. Реакции проводили в фосфатном буфере при температуре 40 °C, в качестве донора дезоксирибозы был использован тимидин. Другие данные о ферментативном синтезе дезоксирибозида бензимидазола с помощью NDT относятся к 1990 году [57]. В качестве донора дезоксирибозы в этой работе был выбран 2'-дезокситидин, реакцию проводили в цитратном буфере и целевой продукт (**95**) на этот раз был выделен из реакционной смеси и охарактеризован (выход 46 %) (Рисунок 40).

Позднее было показано, что с помощью NDT можно получить 2'-дезоксирибозиды 2-аминобензимидазола и 2-гидроксибензимидазола [118]. В качестве донора остатка углевода в подобных реакциях был использован 2'-дезоксаденозин. Однако, активность по отношению к основаниям бензимидазола данного фермента составила всего 4.8 %, при условии, что за 100 % была принята активность фермента по отношению к дезоксиаденозину и цитозину.

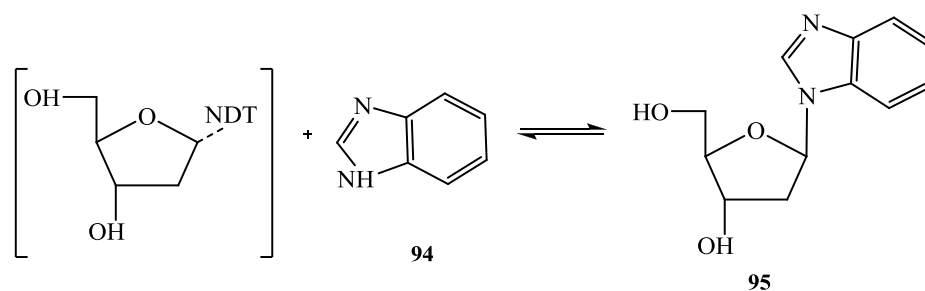


Рисунок 40 – Синтез 2'-дезоксирибозида бензимидазола с помощью NDT

N-дезоксирибозилтрансферазы (NDTs) были обнаружены также в других микроорганизмах: в некоторых видах *Streptococcus* [119], в *Crithidia luciliae* [120, 121], в *Trypanosoma brucei* [122], и в *Borrelia burgdorferi* [123]. Все описанные выше NDTs были строго специфичны к 2'-дезоксирибозе и не принимали природные рибонуклеозиды в качестве доноров рибозы. Однако недавно ученые сообщили о клонировании и экспрессии в *E. coli* гена *ndt*, кодирующего NDT II из *Lactobacillus reuteri* (LrNDT). С помощью LrNDT можно синтезировать природные и неприродные нуклеозиды, LrNDT обладает более высокой активностью, чем другие ферменты, описанные в литературе. Очень интересно, что LrNDT способен синтезировать новые, неприродные нуклеозиды: 2'-фтордезоксирибонуклеозиды и арабинонуклеозиды, - но рибонуклеозиды в качестве субстратов данный фермент также не воспринимает. Кроме того, фермент термостабилен и может функционировать при температуре до 64 °C. Оптимальные условия для синтеза - 40 °C и pH 6.5. С помощью LrNDT был получен 2'-дезоксирибозид бензимидазола, в качестве донора остатка углевода были использованы dUrd или dAdo. Также с помощью этого фермента удалось синтезировать 2'-фтордезоксирибозид (донор - 2'-FdUrd), арабинозид бензимидазола в реакции с 1-β-D-арабинофуранозилурацилом обнаружен не был [107].

Некоторые 2'-дезоксирибозиды модифицированных бензимидазолов были получены химико-ферментативным методом с использованием N-дезоксирибозифуранозил трансферазы (NDT) [58]. Было обнаружено, что 5,6-дихлорбензимидазол (**37d**) (без заместителя во втором положении) является субстратом для N-дезоксирибозилтрансферазы. В реакции с данным основанием и дезоксиуридином в присутствии фермента образовывался 5,6-дихлор-1-(2'-дезоксид-β-D-эритро-пентофуранозил)бензимидазол (**56d**) (Рисунок 41). Первый этап синтеза с использованием NDT проводили в цитратном буфере, при 50 °C при pH 6.

Последующее ацетилирование соединения (**56d**) привело к получению 5,6-дихлор-1-(2'-дезоксид-3,5-ди-O-ацетил-β-D-эритро-пентофуранозил)бензимидазола (**96**) с хорошим выходом. После обработки соединения (**96**) NBS образовалось его 2-бром производное (**97**). А последующая его обработка карбонатом натрия привела к образованию 2-бром-5,6-дихлор-1-(2'-дезоксид-β-D-эритро-пентофуранозил)бензимидазола (**56c**). Нуклеофильное замещение

брома во втором положении соединения (**97**) изопропиламином и снятие защитных групп привело к образованию *D*-аналога Марибавира (**13**) – 2-изопропиламин-5,6-дихлор-1-(2'-дезокс-β-*D*-эритро-пентофуранозил)бензимидазола (**98**) [33].

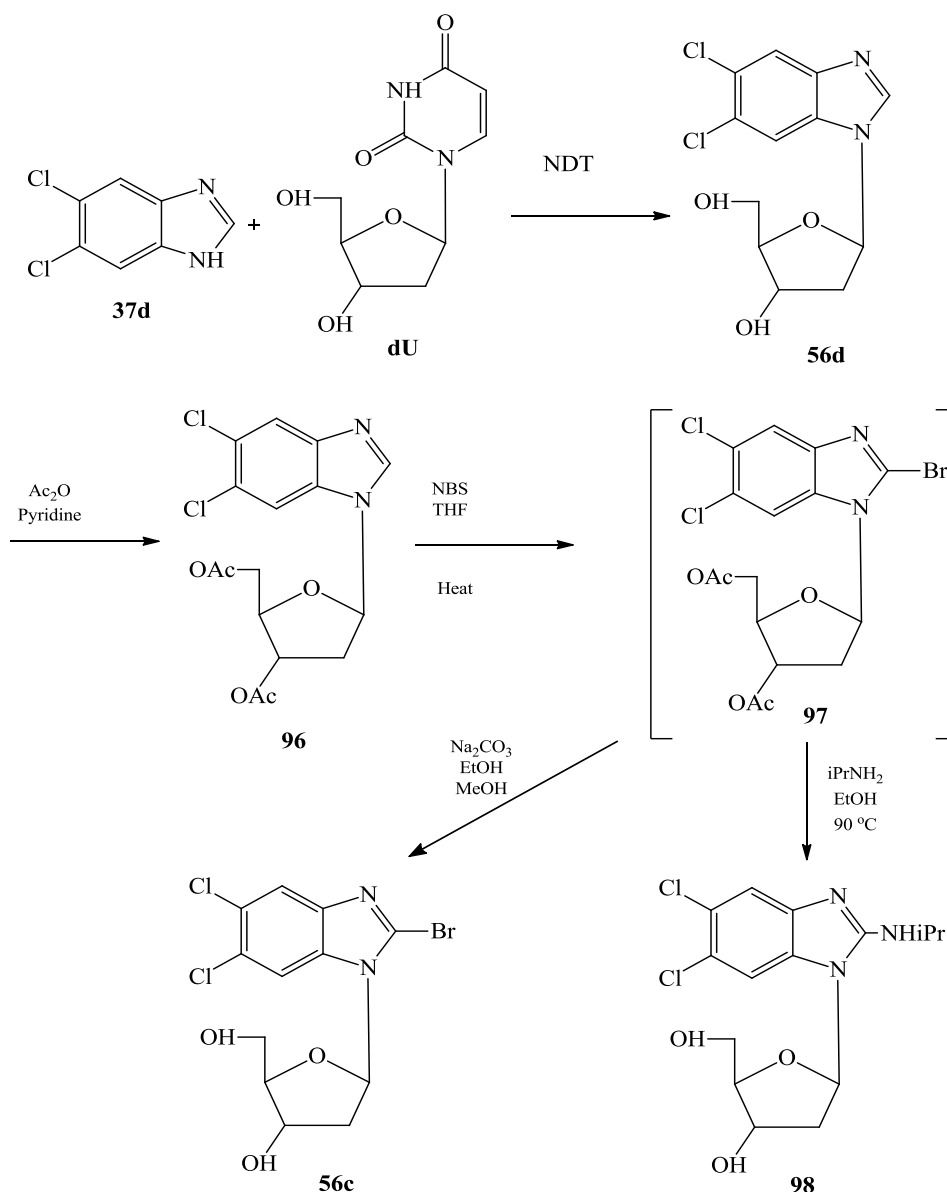


Рисунок 41 – Схема синтеза различных 2'-дезоксирibo нуклеозидов бензимидазола с использованием реакции ферментативного трансгликозилирования (фермент NDT)

Данный подход пробовали применить к синтезу фторированных по остатку углевода нуклеозидов бензимидазола. В статье [45] описана попытка ферментативного синтеза 2'-дезокс-2'-фтор-рибонуклеозида - производного TCRB. Однако, перенос углеводного фрагмента с соединения (**99**) (2'-дезокс-2'-фтор-уридин) на основание 2,5,6-трихлор-бензимидазол (**37a**) оказался неуспешным. Тогда углеводный фрагмент с соединения (**99**) был перенесен на 5,6-дихлорбензимидазол (**37d**) с помощью фермента NDT (Рисунок 42), поскольку уже было известно, что это основание является субстратом для данного фермента. После

защиты гидроксильных групп у полученного на первом этапе синтеза нуклеозида, введения брома во второе положение бензимидазольного кольца с использованием NBS в диоксане, а затем снятия защит при помощи карбоната натрия, был получен фторированный по аналогу BDCRB - 2-бром-5,6-дихлор-1-(2'-дезоксигидро-2'-фтор-β-D-рибофуранозил)бензимидазол (**26b**).

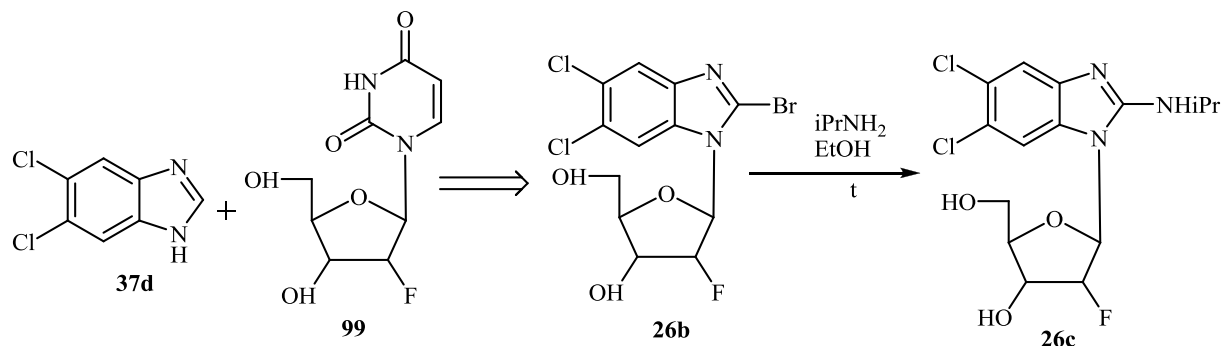


Рисунок 42 – Схема синтеза 2'-дезоксигидро-2'-фтор-рибоаналога (**26b**) BDCRB и 2'-дезоксигидро-2'-фтор-β-D-рибоаналога (**26c**) марибавира с использованием NDT на первом этапе синтеза

Из соединения **26b** был получен фторированный β-D-аналог Марибавира (**13**) - 2-изопропиламино-5,6-дихлор-1-(2'-дезоксигидро-2'-фтор-β-D-рибофуранозил)бензимидазол (**26c**), - с выходом 57 % (Рисунок 42) [44].

Таким образом, использование NDT в синтезе нуклеозидов бензимидазола является очень удобным и эффективным подходом к получению 2'-дезоксирибозидов, но, к сожалению, не рибозидов.

1.3.2.2 Синтез нуклеозидов бензимидазола с применением нуклеозидфосфорилаз (NPs)

Другим подходом к ферментативному синтезу нуклеозидов бензимидазола может быть использование нуклеозидфосфорилаз (NPs). Использование NPs позволяет получать не только 2'-дезоксирибозиды, но и рибозиды бензимидазола.

К классу нуклеозидфосфорилаз принадлежат уридинфосфорилаза (UP), тимидинфосфорилаза (TP) и пуринынуклеозидфосфорилаза (PNP) [124 - 126]. Все три нуклеозидфосфорилазы содержатся в *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. В этих микроорганизмах было обнаружено две функции нуклеозидфосфорилаз: первая - участие в синтезе нуклеозидов, вторая - катаболическое превращение нуклеозидов [127 - 129]. PNP - ключевой фермент пуринового обмена [130 - 134]. В основном все PNP активны в широком диапазоне pH (от 6 до 8.5, в зависимости от источника) и обладают обширной субстратной специфичностью [135, 136]. PNP используют в качестве инструмента для синтеза нуклеозидов с потенциальной противовирусной и противоопухолевой активностью [130, 137 - 139].

Последние 40 лет нуклеозидфосфорилазы (NPs) широко используются в получении модифицированных нуклеозидов из природных и модифицированных пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов (реакция трансгликозилирования, механизм представлен на рисунке 43) [130].

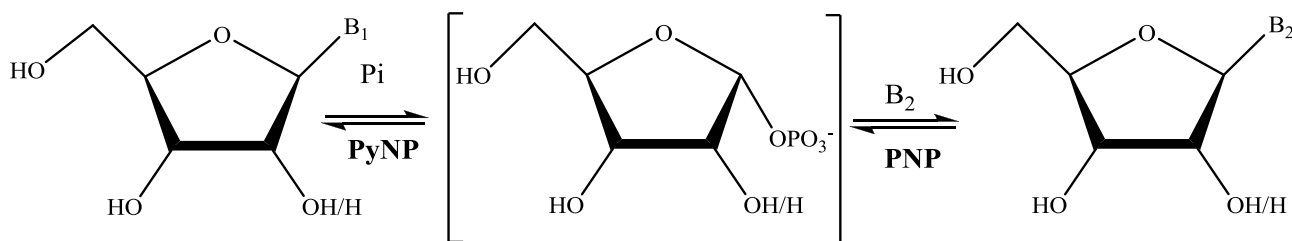


Рисунок 43 – Общая схема ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов по реакции трансгликозилирования с использованием NPs

Реакция протекает через образование соответствующего α -фуранозо-1-фосфата, который в дальнейшем используется пуриннуклеозидфосфорилазой (PNP) в качестве субстрата. Такая стратегия была использована для получения ряда нуклеозидов с модифицированным остатком углевода и/или основанием. Представленная на рисунке 43 схема включает использование на первой стадии синтеза PyNP (UP или TP) поскольку в качестве источника углеводного остатка чаще всего используют пиримидиновые нуклеозиды, что связано с их более низкой стоимостью. Кроме того использование именно пентозо-1-фосфатов пиримидиновых нуклеозидов (а не пуриновых) рационально при синтезе нуклеозидов с неприродными остатками углеводов, поскольку пуриновые нуклеозиды с такими углеводными остатками не всегда доступны [140]. Применимость такой схемы ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов впервые была детально описана *Krenitsky и соавторами* [141, 142] для синтеза модифицированных нуклеозидов пурина (выход целевых нуклеозидов составил 70 - 80 %).

Впервые о синтезе нуклеозидов бензимидазола с помощью PNP было сообщено в 1995 году [59]. При исследовании субстратных свойств фермента в реакции трансгликозилирования было обнаружено, что бензимидазол обладает высокой акцепторной способностью в связи с хорошим сродством основания к активному центру фермента. Кроме того, было показано, что β -D-рибозид бензимидазола является плохим субстратом для фосфорилазы, осуществляемого PNP *E. coli* [138], что связано с более высокой стабильностью гликозидной связи рибозида бензимидазола по сравнению со стабильностью гликозидной связи пуриновых нуклеозидов [143]. Поэтому нуклеозид бензимидазола, образовавшийся в активном центре фермента, очень плохо подвергается фосфоролизу. Следовательно, такой ферментативный метод может быть применен для синтеза различных нуклеозидов бензимидазола.

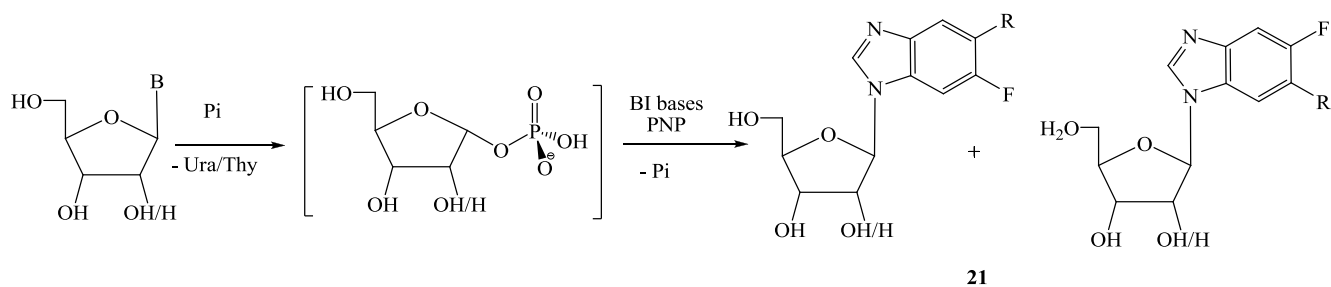
В качестве субстратов для PNP была протестирована целая серия бензимидазолов (Таблица 2). В качестве донора остатка углевода были использованы гуанозин и 2'-дезоксигуанозин. Использование адениновых нуклеозидов в процессе трансгликозилирования было нецелесообразно из-за возможной побочной реакции биосинтеза инозина из аденозина под действием аденозиндезаминаз, поскольку использовались не чистые PNP, а целые клетки *E. coli*.

Таблица 2 - Эффективность синтеза нуклеозидов бензимидазола с помощью целых клеток *E. coli*, содержащих PNP

Акцептор	Соед.	R ¹	R ²	Донор	Время (ч)	Выход (%)
	94	H	H	G	23	70
				dG	3.5	90
	100	F	F	G	24	75
				dG	2	80
	37d	Cl	Cl	G	3	80
				dG	0.2	72
	101	CH ₃	CH ₃	G	1.5	98
				dG	1.5	98
	102	NO ₂	NO ₂	G	48	32
				dG	4	65
	103	H	NO ₂	G	24	75
				dG	2.5	77
	104	Br	Br	G	3	50
				dG	1.5	66
	105	NO ₂	NO ₂	G	48	<1
				dG	24	7
	106	NH ₂	H	G	48	<1
				dG	24	57

Наилучший выход наблюдался в реакциях синтеза нуклеозидов 5,6-диметил (**101**), дихлор (**37d**) и дифтор (**99**) бензимидазола, наихудший - в реакциях синтеза нуклеозидов 4,6-динитробензимидазола (**100**) [59].

С помощью реакции ферментативного трансгликозилирования с использованием генно-инженерных ферментов PNP *E. coli* из модифицированных оснований была синтезирована серия 5-фтор-6-замещенных-1-(β-D-рибо- и 2'-дезоксирibo-фуранозил)-бензимидазолов (**21**, Рисунок 44) [40]. В качестве донора остатка углевода были использованы уридин, дезоксиуридин или тимидин, реакции проводились при 52 °С и pH 7 в фосфатном буфере. Конечный выход нуклеозидов составил от 51 до 98 %.



B = Ura, Thy

R = F, OMe, OEt, Oi-Pr, морфолино, N-метилпиперазино

Рисунок 44 - Схема синтеза 5-фтор-6-замещенных-1- β -D-рибо- и 2'-деоксирибофуранозил бензимидазолов с использованием NPs

Необходимо отметить, что в этой работе, так же как и в случае химического гликозилирования в работе [74], было обнаружено присутствие N1- и N3-региоизомеров несимметричных нуклеозидов бензимидазолов.

Таким образом, использование ферментов на стадии гликозилирования обеспечивает ученых современным и эффективным способом получения различных модифицированных β -D-нуклеозидов бензимидазола.

2. Результаты и обсуждение*

Новые нуклеозиды – производные бензимидазола представляют интерес для исследователей с точки зрения изучения структурно-функциональных особенностей проявляемой ими биологической активности, в частности противовирусной. Синтез, изучение цитотоксичности и антивирусной активности новых нуклеозидов модифицированного бензимидазола является крайне актуальной задачей при создании библиотек новых соединений. Именно благодаря структурному разнообразию синтезируемых соединений, есть возможность определить наиболее активных кандидатов, изучить механизмы их действия и получить в результате новые биологически активные препараты.

Цель работы – изучение субстратной специфичности пуриннуклеозидфосорилазы *E. coli* для осуществления ферментативного синтеза новых нуклеозидов бензимидазола, создание библиотеки нуклеозидов, модифицированных по остатку бензимидазола и углеводной части молекулы. Изучение цитотоксичности и противовирусной активности синтезированных нуклеозидов бензимидазола в экспериментах *in vitro*.

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

1. Синтез серии 4,6-дифтор-5-замещенных-нуклеозидов бензимидазола рибо- и 2'-дезоксирibo рядов.
2. Синтез серии 2'-дезоксид-2'-фторарабинозидов 5,6-, 4,6- и 4,5,6-замещенных бензимидазолов.
3. Синтез нуклеозидов бензимидазола, модифицированного 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. Определение *in vitro* антивирусной активности модифицированных нуклеозидов бензимидазола и исследование их цитотоксичности на опухолевых клетках человека.

* Нумерация соединений, схем, рисунков и таблиц, принятая в разделах «Результаты и обсуждение» и «Материалы и методы», отличается от нумерации в «Обзоре литературы».

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

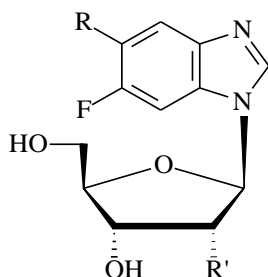
Использование ферментов нуклеинового обмена для получения нуклеозидов бензимидазола значительно упрощает схему синтеза по сравнению с химическими методами: исчезает необходимость использования защитных групп, отсутствуют стереоизомеры, уменьшается значительно количество стадий получения целевого соединения, увеличивается в несколько раз выход реакций [40, 44, 45, 57, 58, 105, 107, 118, 130].

Наиболее часто для синтеза нуклеозидов бензимидазола используют N-дезоксирибозилтрансферазы (NDT) *Lactobacillus*, однако их использование ограничено синтезом 2'-дезоксирибо- и 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-рибонуклеозидов [57, 58, 105-107].

Для синтеза модифицированных нуклеозидов бензимидазола возможно применение реакции ферментативного трансгликозилирования с использованием нуклеозидфосфорилаз *E. coli*, поскольку подтверждено, что бензимидазол является хорошим субстратом для пуриннуклеозидфосфорилазы (PNP) *E. coli*. Кроме того, показано, что по реакции трансгликозилирования можно синтезировать более широкий круг нуклеозидов: использование PNP позволяет получать не только 2'-дезоксирибозиды, но и рибозиды бензимидазола [130, 144, 145, 146].

Использование нуклеозидфосфорилаз в синтезе нуклеозидов бензимидазола требует тщательной оптимизации условий и подбора всех параметров синтеза таким образом, чтобы реакции протекали с максимальным значением конверсии основания в нуклеозид. Интересным и необходимым является расширение знаний о субстратной специфичности фермента: по реакции трансгликозилирования можно получать нуклеозиды бензимидазола с различными заместителями как в основании, так и в остатке углевода. Такой подход позволяет быстро и эффективно, без использования сложных химических синтетических процедур получать новые нуклеозиды с механизмом действия, отличающимся от механизма действия существующих противовирусных препаратов, и, как следствие, с непредсказуемой биологической активностью.

Данное исследование является продолжением работы, начатой в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН. К моменту начала наших исследований уже была синтезирована серия рибо- и 2'-дезоксирибо-нуклеозидов 5-замещенного-6-фтор-бензимидазола (**1**) (Рисунок 1). К сожалению, соединения этой серии не показали активности в отношении широкого спектра ДНК и РНК вирусов [40]. При этом все соединения (**1**) серии оказались нецитотоксичными.



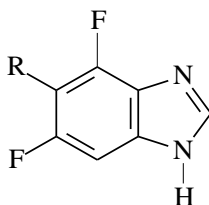
(1) R = F, OMe, OEt, O-*i*Pr, морфолино, N-метилпиперазино

R' = OH, H

Рисунок 1 – Серия 5,6-дизамещенных нуклеозидов бензимидазола (1)

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

Известно, что введение дополнительного атома фтора в гетероциклическое основание может повлиять на свойства нуклеозидов, в том числе на их биологическую активность. Примером может служить противоопухолевый препарат флударабин – С2 фторированный аналог противовирусного препарата видарабина [147]. Мы решили ввести в бензимидазол дополнительный атом фтора в С4 положение и синтезировать серию новых нуклеозидов, предполагая, что они окажутся более активными при том же невысоком уровне цитотоксичности. В ИОС УрО РАН (г. Екатеринбург) была получена серия производных бензимидазола (2) - (7) (Рисунок 2).



Соединение	R
2	H
3	F
4	OMe
5	OEt
6	N-морфолино
7	N-пирролидино

Рисунок 2 – Серия 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов

Наши коллеги из института ИОС УрО РАН предложили удобный метод получения модифицированных оснований - восстановление нитроанилинов (8), (9) до соответствующих диаминов (10), (11) оловом в соляной кислоте с последующей циклизацией в муравьиной кислоте (Рисунок 3). Преимущества данного метода заключаются в высокой чистоте гетероциклических оснований, используемых далее в реакции ферментативного трансгликозилирования. При этом отсутствует необходимость

хроматографической очистки целевых 4,6-дифтор- и 4,5,6-трифторбензимидазолов (**2**), (**3**). Поскольку атом фтора в *para*-положении к нитрогруппе в 6-нитро-2,3,4-трифторанилине (**9**) достаточно легко подвергается действию нуклеофилов, в результате нуклеофильного замещения фтора в реакциях с алкоголями металлов (-OMe, -OEt) и биогенными аминами (морфолином, пирролидином) были получены 5-замещенные 2,4-дифтор-6-нитроанилины (**12a-d**), которые каталитическим восстановлением нитрогруппы превращены в соответствующие *орто*-фенилендиамины (**13a-d**) (Рисунок 4).

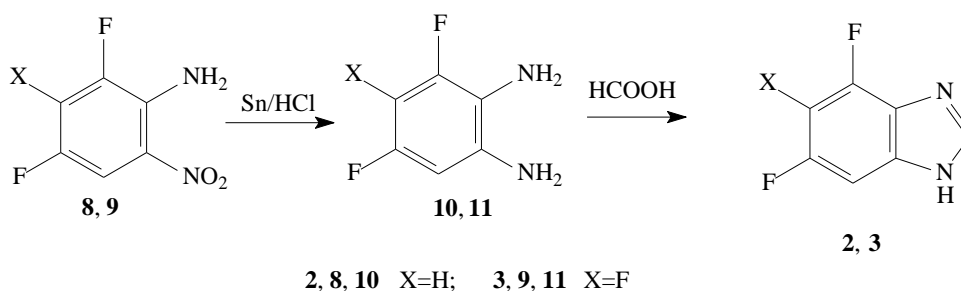


Рисунок 3 – Схема синтеза 4,6-дифтор- и 4,5,6-трифтор-1H-бензимидазолов

Лучшие результаты были достигнуты при восстановлении нитроанилинов (**12a,b**) до *орто*-фенилендиаминов (**13a,b**) кипячением в растворе соответствующего спирта с гидразин гидратом в присутствии никеля Рэнэя в течение 1 ч (выходы 70 и 80 %). Нитроанилины (**12c,d**) восстанавливали до *орто*-фенилендиаминов (**13c,d**) оловом в соляной кислоте с выходами 40-70 %. 5-Замещенные 4,6-дифтор-1H-бензимидазолы (**4**)- (**7**) получали кипячением *орто*-фенилендиаминов (**13a-d**) в муравьиной кислоте с выходами 40 и 60 %.

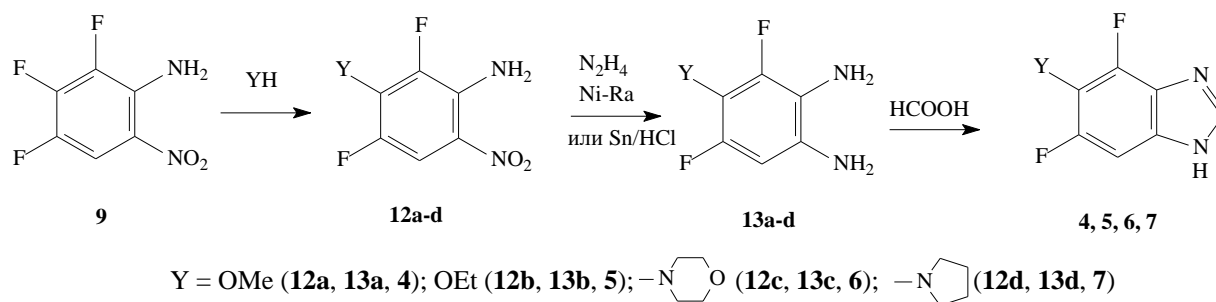
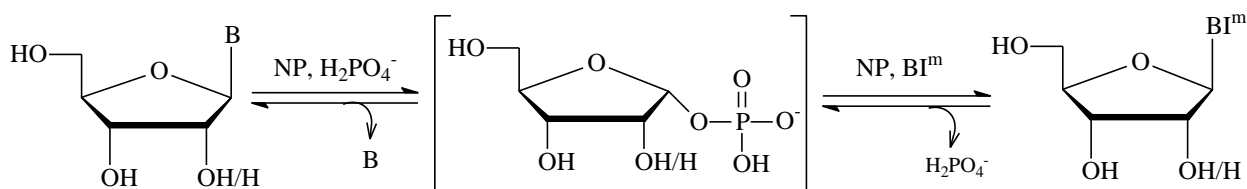


Рисунок 4 – Схема синтеза 5-замещенных 4,6-дифтор-1H-бензимидазолов

На следующем этапе синтеза из оснований (**2**) - (**7**) необходимо было синтезировать нуклеозиды с природными остатками углеводов - рибозиды и 2'-дезоксирибозиды. Синтез модифицированных нуклеозидов бензимидазола проводили по общей схеме, представленной на рисунке 5.



В - природное гетероциклическое основание, BI^m - бензимидазол, NP - ферменты нуклеозидфосфорилазы

Рисунок 5 – Принципиальная схема реакции трансгликозилирования

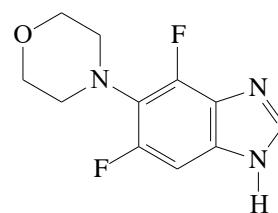
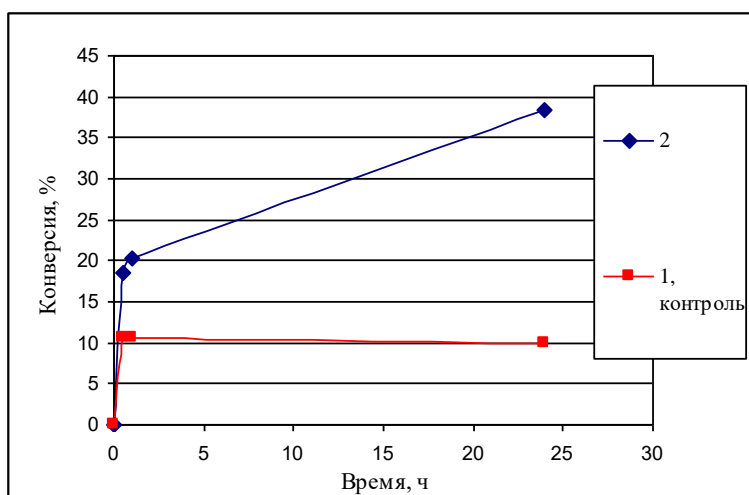
На первом этапе работ по синтезу нуклеозидов проводилось изучение субстратно-специфических свойств пуриннуклеозидфосфорилазы (PNP) *E. coli* [148] по отношению к 4,6-дифтор-5-замещенным аналогам бензимидазола (BI^m) (соединения (2) – (7)).

При изучении реакции трансгликозилирования с участием неизученного основания можно ожидать три возможных результата:

- соединение – ингибитор PNP,
- соединение – субстрат PNP,
- соединение – ни ингибитор, ни субстрат PNP.

Для изучения субстратной специфичности были приготовлены два типа реакционных смесей: тестовая (с содержанием модифицированных оснований (2) – (7)) и контрольная (без бензимидазолов, содержащая только природный нуклеозид - инозин (Ino)). Оба типа реакционных смесей содержали дигидрофосфат калия. В каждую реакционную смесь добавляли PNP и термостатировали при 50 °C в течение 2 суток. Контроль реакции осуществляли с помощью ВЭЖХ и LC-MS.

Заключение о субстратной специфичности делали на основе сравнения количества продукта фосфорилиза инозина - гипоксантина (Нур), - в контрольной и тестовой реакциях, а также по появлению на ВЭЖХ в тестовой реакционной смеси пиков новых нуклеозидов. Во всех тестовых реакциях на ВЭЖХ появились пики новых соединений и 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 являются субстратами PNP. Ингибиторов среди модифицированных по 4,5,6-положениям оснований обнаружено не было. В качестве примера на рисунке 6 приведены данные реакции, содержащей основание (6). Результаты всех тестовых реакций рибозилирования приведены в таблице 1 (24 ч от начала реакций).

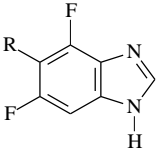




6

Рисунок 6 – Образование гипоксантина при фосфорилизе инозина в отсутствие (1, контроль) основания (**6**) и в его присутствии (2, тестовая реакция), %

По указанной выше методике были проведены тестовые реакции образования 2'-дезоксирибозидов. В качестве донора углеводного остатка использовали 2'-дезоксиинозин (dIno). Интересно, что самыми хорошими субстратами в реакции рибозилирования оказались модифицированные основания (**2**) и (**6**), первое из которых не содержит заместителя, а второе содержит самый объемный из имеющихся в данной серии соединений заместитель (морфолинил) в 5-положении бензимидазольного кольца. Тестовые реакции образования 2'-дезоксирибозидов шли с конверсией в среднем 60 % (Таблица 1).

Таблица 1 – Экспериментальные данные по определению субстратной специфичности PNP по отношению к основаниям (**2**) - (**7**)

Соединение  R=		Субстрат/ не субстрат	Конверсия основания в рибозид, %	Конверсия основания в 2'- дезоксирибозид, %
2	H	Субстрат	84.3	61.3
3	F	Субстрат	79.3	61.8
4	OMe	Субстрат	68.9	57.9
5	OEt	Субстрат	75.7	73.2
6		Субстрат	81.6	62.6
7		Субстрат	75.4	63.0

На следующем этапе работ осуществляли оптимизацию процесса ферментативного способа получения серии модифицированных нуклеозидов: рибозидов и 2'-дезоксирибозидов, структура которых представлена на рисунке 7.

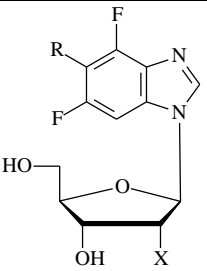


	Соединение	X	R	Соединение	X	R
	8	ОН	Н	14	ОН	OEt
	9	Н		15	Н	
	10	ОН	F	16	ОН	
	11	Н		17	Н	
	12	ОН	OMe	18	ОН	
	13	Н		19	Н	

Рисунок 7 – Серия рибо- и 2'-дезоксирибо-нуклеозидов 5-замещенных-4,6-дифторбензимидазолов (**8**) – (**19**)

Оптимизацию реакции трансгликозилирования указанных нуклеозидов проводили по следующим параметрам:

- подбор оптимального донора рибозы или 2'-дезоксирибозы;
- определение оптимального соотношения субстратов (природного нуклеозида к модифицированному основанию - BI^m);
- количество добавляемых нуклеозидфосфорилаз.

Подбор оптимального донора рибозы и 2'-дезоксирибозы осуществлялся по следующей схеме: для каждого модифицированного основания готовилось по три реакционных смеси объемом по 1 мл, содержащих каждая один из природных нуклеозидов - доноров остатка рибозы или 2'-дезоксирибозы. В качестве источников углеводного остатка использовались уридин (Urd), инозин (Ino), гуанозин (Guo) и их 2'-дезоксиде аналоги. Если реакцию трансгликозилирования проводили между пуриновым нуклеозидом и BI^m , в реакционную смесь добавляли только один фермент - PNP. В случае использования Urd или dUrd, для осуществления реакции трансгликозилирования необходимо было добавление двух ферментов: UP и PNP. Все реакции проводились при 50 °С и pH 7 в буфере дигидрофосфата калия, концентрация которого составляла 4 мМ. Ход реакций контролировали с помощью ВЭЖХ по появлению продукта реакции с характеристическим R_f .

Практически во всех случаях конверсия гетероциклического основания в нуклеозид оказалась выше в случае, когда донором рибозы был Urd (Рисунок 8). В качестве примера приведены данные реакции синтеза нуклеозида (**10**) из основания (**3**).

С учетом полученных данных об оптимальном доноре углеводного остатка, реакция трансгликозилирования для данной серии нуклеозидов имеет вид, представленный на рисунке 9.

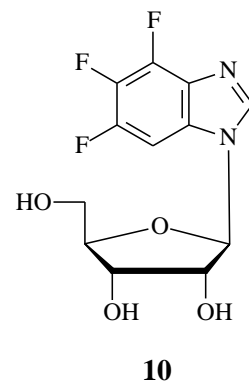
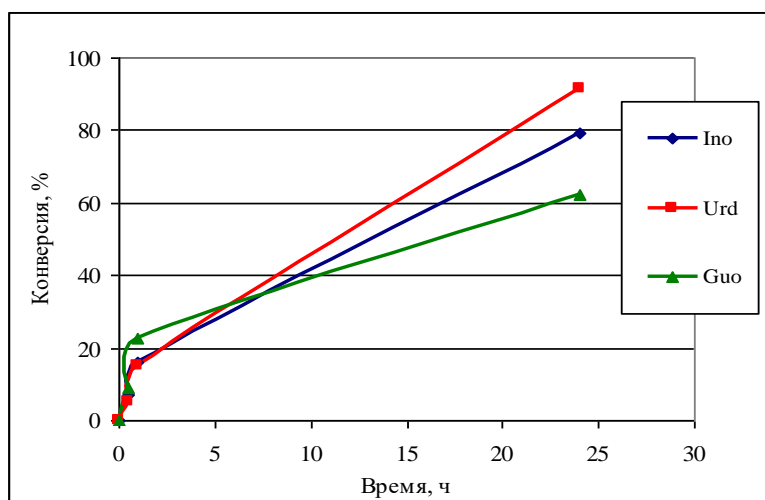
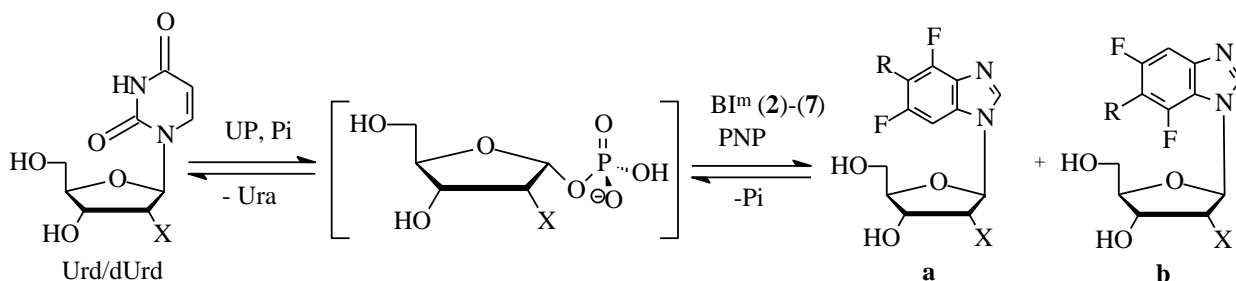


Рисунок 8 – Процесс синтеза рибозида (**10**) из основания (**3**) в зависимости от типа донора рибофуранозы (соотношение донор рибозы/основание (**3**), 4:2 (молярное); количество PNP/UP или PNP – по 1800 *е.а./ммоль* основания)

На этапе оптимизации условий синтеза нуклеозидов в некоторых реакциях было обнаружено наличие по данным LC-MS двух модифицированных нуклеозидов, предположительно N1- (**a**) и N3-изомеров (**b**). Аналогичная ситуация наблюдалась ранее в синтезе серии 5,6-дизамещенных нуклеозидов (**1**) с небольшим по объему заместителем в C5 положении бензимидазола [40]. С учетом такой вероятности схема синтеза нуклеозидов приведена на рисунке 9.



Pi-неорганический фосфат, UP- уридин-, PNP-пурииннуклеозидфосфорилаза,
Urd - уридин, dUrd - дезоксиуридин

Рисунок 9 – Общая схема реакции ферментативного транскгликозирования для серии 5-замещенных-4,6-дифтор-рибо/2'-дезоксирибонуклеозидов

Определение оптимального соотношения субстратов проводилось по похожей методике: готовилось по пять реакционных смесей для каждого основания BI^m , объемом по 1 мл. В каждую добавлялся Urd (dUrd) по отношению к модифицированному основанию 1, 1.5, 2, 3, 5 и в некоторых случаях 10-ти кратном избытке. Реакции проводились при 50 °C и pH 7 в калия фосфатном буфере, концентрация которого составляла от 2 до 20 mM. Ход реакций контролировали с помощью ВЭЖХ. Было показано, 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 (Рисунок 10). Данные представлены на примере реакции синтеза нуклеозида (**18**) из основания (**7**).

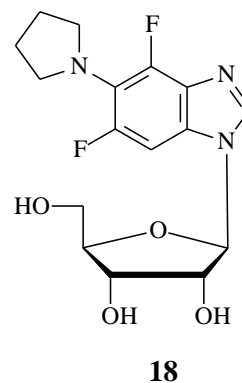
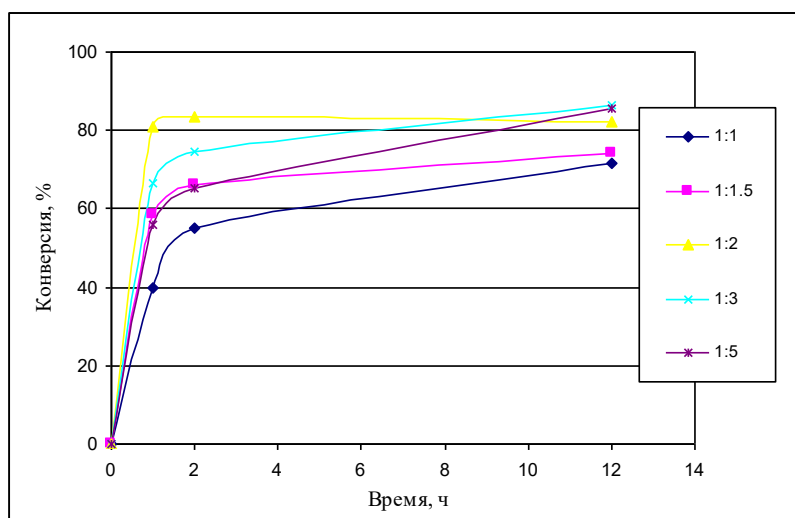
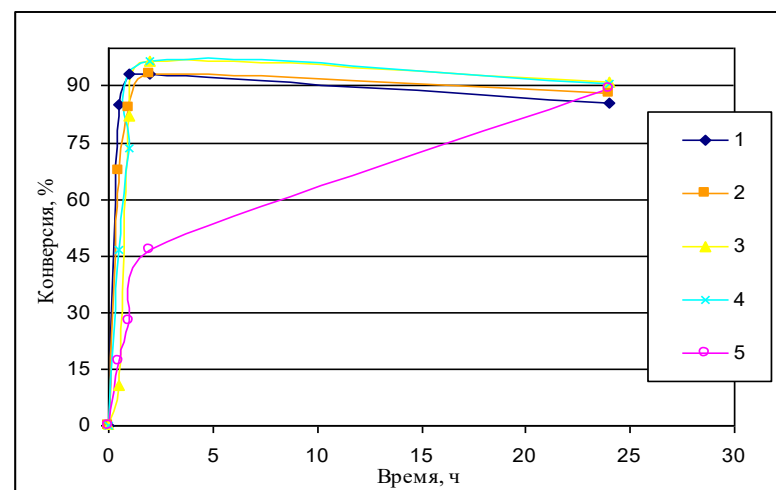
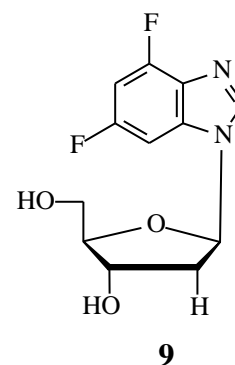
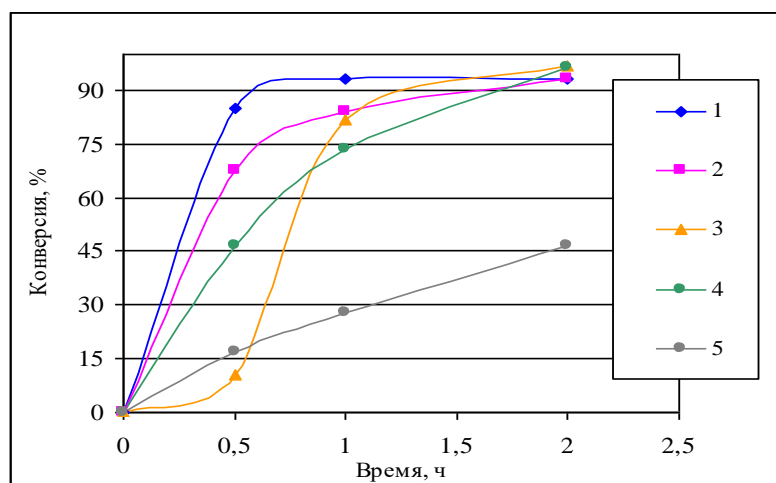
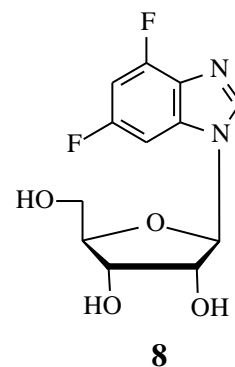
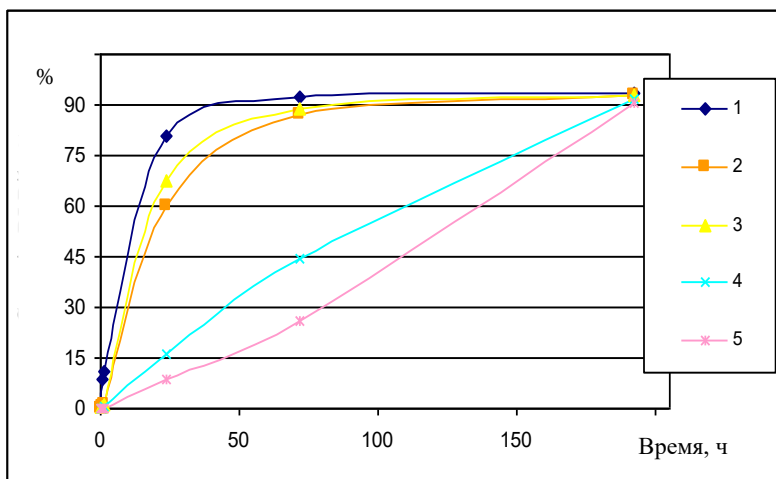


Рисунок 10 – Процесс конверсии основания (**7**) в рибозид (**18**) в зависимости от соотношения Urd/основание (**7**) (отношение PNP/UP – по 1800 е.а./ммоль ВГ^{III})

Подбор количества добавляемых нуклеозидфосфорилаз осуществлялся для каждого ВГ^{III} в серии. Количество Urd (dUrd) во всех реакциях было одинаковое, также как и количество модифицированного основания и концентрация буферного раствора.

Количество используемых ферментных препаратов варьировалось от 90 до 900 е.а. на 1 ммоль гетероциклического основания для PNP и от 60 до 600 е.а. на 1 ммоль Urd (dUrd) для UP (Рисунок 11). В качестве примера приведены данные реакций, содержащих основание (**2**).

Из данных, приведенных на рисунке 11а видно, что очень часто в первые часы синтеза рибозидов увеличение количества добавляемых ферментов приводит к ускорению образования продуктов, а не к увеличению максимальной конверсии. Со временем во всех реакциях рибозилирования конверсия основания в нуклеозид достигает примерно одного значения. Поэтому мы приняли решение на этапе наработки рибозидов ВГ^{III} уменьшить количество PNP и UP в среднем до 45 е.а./ммоль основания и 30 е.а./dUrd, соответственно. Поскольку предпочтительнее было экономить ферментные препараты, увеличивая время синтеза.



Отношение PNP/UP (г.а./ммоль $VI^m/dUrd$): 1- 900/600; 2- 360/240; 3- 360/60; 4- 90/240; 5-90/60.
Молярное соотношение 6:4 донор/основание (2)

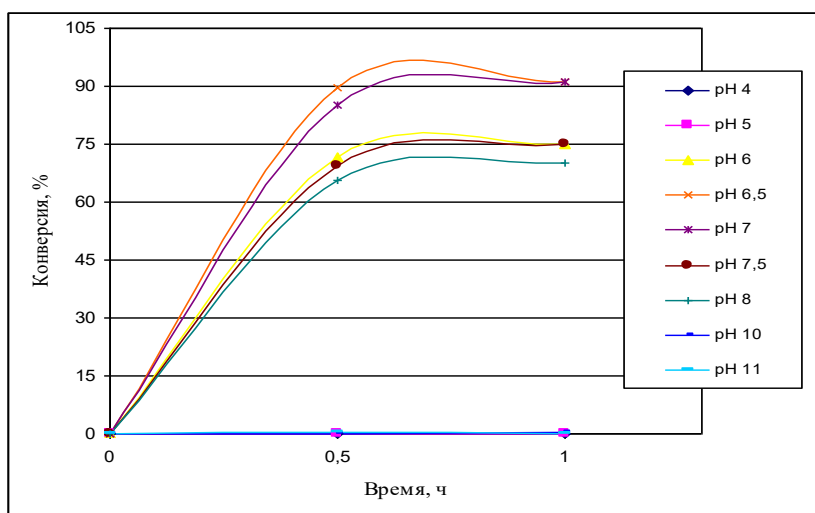
Рисунок 11 – Динамика накопления нуклеозидов в зависимости от соотношения NPs.

- (а) - рибозида (8), время синтеза - 8 суток;
(б) - 2'-деоксирибозида (9), время синтеза - 2 ч;
(с) - 2'-деоксирибозида (9), время синтеза - 24 ч.

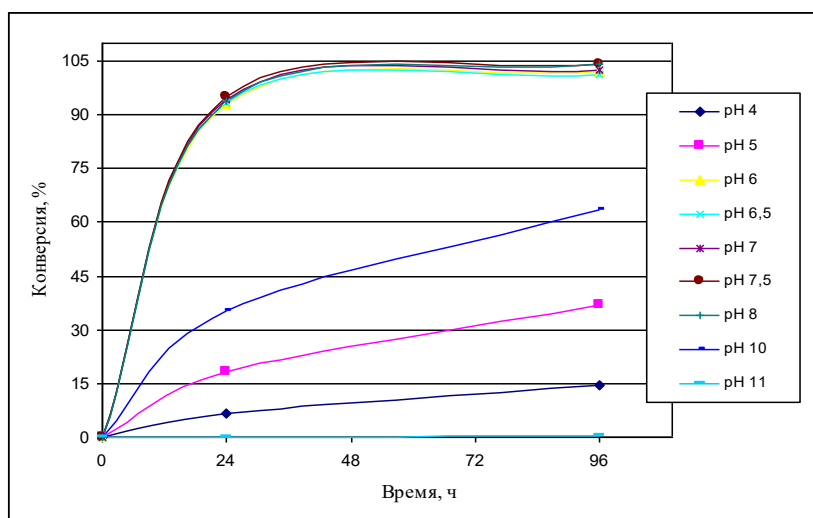
Однако для синтеза 2'-деоксирибонуклеозидов данный подход не был оптимальным: синтез 2'-деоксирибонуклеозидов не следовало проводить более 3-4 часов. Так как после

достижения максимального значения конверсия снижалась на 10-15 % уже за первые сутки (Рисунок 11b). Этот эффект можно объяснить тем, что 1- α -фосфат-2-дезоксирибозы гидролизуются в активном центре фермента до неорганического фосфата и 2-дезоксирибозы, которая выходит из равновесной ферментативной реакции [134, 149].

Все реакции синтеза нуклеозидов проводили при рН 7, поскольку известно, что оптимальное значение рН реакционной смеси для данного фермента находится в диапазоне 6-8 [130]. В отдельной серии опытов мы подтвердили, что изменение значений рН, в пределах от 6 до 8, практически не влияло на скорость образования рибозидов бензимидазола (Рисунок 12). Интересно, что реакция трансгликозилирования проходила даже при значениях рН 4.0 и 10, хотя и с значительным снижением скорости процесса. В качестве примера на рисунке 12 приведены данные реакции синтеза нуклеозида (8) из основания (2) при изменении диапазона рН от 4 до 11.



а



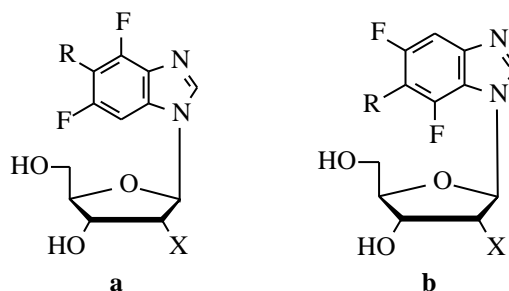
б



Рисунок 12 – Процесс синтеза рибозида (8) в зависимости от рН реакционной смеси (время процесса: **а** - 1 ч, **б** - 96 ч)

Итак, условия проведения ферментативных реакций трансгликозилирования для получения β -D-рибо- и β -D-2'-дезоксирибонуклеозидов 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов были оптимизированы: в качестве донора рибофуранозы/2'-дезоксирибофуранозы для всех реакций был выбран Urd (dUrd), соотношение в исходной смеси гетероциклического основания и донора остатка углевода преимущественно было определено как 2:1 (см. таблицу 3), также были подобраны оптимальные количества нуклеозидфосфорилаз (NPs) рекомбинантной *E. coli* и определен временной интервал синтеза всех нуклеозидов.

Как и в случае синтеза серии дизамещенных нуклеозидов бензимидазола [40], при получении нуклеозидов тризамещенных модифицированных оснований было обнаружено (по данным ВЭЖХ) и подтверждено образование смеси N1- (**a**) и N3- (**b**) региоизомеров нуклеозидов с преобладанием N1-изомера (Таблица 2). Только в случае рибозных и 2'-дезоксирибозных производных морфолина (**16**), (**17**) и рибозного аналога пирролидина (**18**) образование N3-региоизомеров не было обнаружено (по данным LC-MS и ЯМР).

Таблица 2 - Данные по конверсии оснований бензимидазола в нуклеозиды (**8**) – (**19**) после оптимизации условий синтеза с учетом образования N1 и N3 изомеров



R	X	Соединение	Конверсия (%)	Соотношение изомеров (по данным ВЭЖХ)	
				N1 (a)	N3 (b)
H	OH	8	95.2	87	13
	H	9	86.1	88	12
F	OH	10	98.6	90	9
	H	11	98.7	92	8
OMe	OH	12	92.3	91	9
	H	13	90.5	94	6
OEt	OH	14	96.9	91	9
	H	15	88.2	90	10
	OH	16	93.0	100	не определено
	H	17	94.3	100	не определено
	OH	18	83.8	100	не определено
	H	19	98.7	89	11

В оптимизированных условиях были синтезированы шесть рибонуклеозидов и шесть 2'-дезоксирибозидов бензимидазола в количествах, достаточных для дальнейшего исследования их активности и цитотоксичности в экспериментах *in vitro*.

Все экспериментальные данные масштабированных реакций по ферментативному синтезу β -D-рибо- и β -D-2'-дезоксирибонуклеозидов (**8**) – (**19**) представлены в сводной таблице (Таблица 3). Ферментативные реакции были проведены в K-фосфатном буфере, концентрацией от 4 до 10 мМ при pH 7.0 и температуре 50 °C, ход реакций контролировался с помощью ВЭЖХ. Реакции были остановлены добавлением в них этанола (50 % от объема) в тот момент, когда конверсия достигала значений, полученных в тестовых реакциях. Затем реакционные смеси были упарены до объема 5 мл, соединения (**10**) и (**11**) были выделены кристаллизацией. Остальные нуклеозиды были выделены из реакционных смесей с помощью колоночной хроматографии на силикагеле C18 (размер колонки 20×100 мм). Конверсия оснований (**2**) – (**7**) в нуклеозиды (**8**) - (**19**) в реакциях наработки препаративных количеств составила от 84 до 99 %. Синтез 2'-дезоксирибозидов завершался в среднем в течение 0.5 - 3.0 часов, в то время как реакции транскрибозилирования протекали гораздо медленнее, и для их завершения требовалось от 1 до 8 дней.

Таблица 3 – Экспериментальные данные по ферментативному синтезу β -D-рибо- и β -D-2'- дезокси-рибонуклеозидов бензимидазола (**8**) - (**19**)

Соед. MW	Акцептор MW	Донор MW	Объем, мл [мМ KH ₂ PO ₄]	Субстраты			PNP, ^a е.а. (A)	UP, ^a е.а. (B)	Время, ч	Ост. акцептор (данные ВЭЖХ), %	E, ^b %
	A	D		A мг (ммоль)	D мг (ммоль)	A/D					
8 286.23	2 154.11	Urd	114 [8]	70 (0.46)	223 (0.91)	1:2	55 (120)	27 (30)	72	4.85	20
9 270.23		dUrd	114 [5]	70 (0.41)	156 (0.61)	1:1.5	82 (200)	73 (120)	3	13.9	25
10 304.22	3 172.09	Urd	102 [8]	70 (0.41)	199 (0.82)	1:2	98 (240)	98 (120)	192	1.33	-
11 288.22		dUrd	102 [8]	70 (0.41)	186 (0.82)	1:2	185 (450)	197 (240)	3	1.27	-
12 316.26	4 184.14	Urd	95 [8]	70 (0.38)	186 (0.76)	1:2	17 (45)	23 (30)	24	7.69	25
13 300.26		dUrd	95 [6]	70 (0.38)	130 (0.57)	1:1.5	171 (450)	171 (300)	3	9.48	20
14 330.29	5 198.17	Urd	88 [6]	70 (0.35)	129 (0.53)	1:1.5	10 (30)	8 (15)	24	3.11	30
15 314.29		dUrd	88 [5]	70 (0.35)	100 (0.44)	1:1.3	158 (450)	158 (360)	4	11.78	22
16 371.34	6 239.21	Urd	73 [8]	70 (0.29)	143 (0.58)	1:2	13 (45)	17 (30)	48	7.00	50
17 355.34		dUrd	68 [10]	65 мг (0.27)	155 (0.68)	1:2.5	122 (450)	122 (180)	2.5	5.66	40
18 355.34	7 223.21	Urd	157 [4]	70 (0.31)	152 (0.63)	1:2	14 (45)	19 (30)	48	16.2	50
19 339.34		dUrd	157 [4]	70 (0.31)	143 (0.63)	1:2	14 (45)	113 (180)	2	1.32	40

^a Количество PNP (A) приведено в е.а. на 1 ммоль модифицированного основания, количество UP (B) в е.а. на 1 ммоль уридина или 2'-дезоксиридина.

^b Нуклеозиды элюировали с колонки в градиенте: 1) вода-ацетонитрил (соед. **8**, **9**, **12-15**), 2) вода-этанол, 1:1 (соед. **16**, **18**), 3) вода-метанол (соед. **17**, **19**). E - % (объемный) ацетонитрила или спирта в воде.

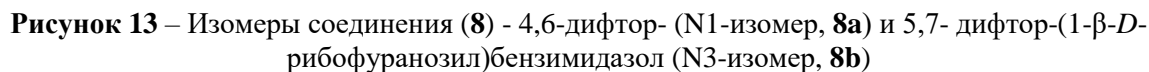
Выход целевых нуклеозидов в реакциях ферментативного трансгликозилирования составил от 60 до 94 %. Физико-химические свойства синтезированных нуклеозидов приведены в таблице 4. Данные по соотношению изомеров и чистоте синтезированных нуклеозидов определены по ВЭЖХ.

Таблица 4 – Физико-химические свойства нуклеозидов (8) – (19)

Соединение (соотношение изомеров по ВЭЖХ)	Выход (%), [мг]	Чистота (%) по ВЭЖХ ^a [R _t , мин (метод)]	Мр (°С) (растворитель) физ. состояние	УФ [λ _{max} , нм; (ε)]	Расщ. [M+H] ⁺	Масс-спектр, m/z
8 (соотношение 8a/8b 92:8)	60 [77]	96.8 [R _t =7.1, 8.1 (I)]	- белый аморфный порошок	-	287.0843	287.0858 [M+H] ⁺ , 155.0439 [M- Rib+2H] ⁺
9 (соотношение 9a/9b 94:6)	94 [116]	100.0 [R _t =6.7, 6.2 (I)]	- белый аморфный порошок	-	271.0894	271.0904 [M+H] ⁺ , 155.0420 [M- dRib+2H] ⁺
10 (соотношение 10a/10b 90:10)	89 [110]	96.5 [R _t =8.6, 8.0 (I)]	118 (H ₂ O) бесцветные кристаллы	-	305.0749	305.0754 [M+H] ⁺ , 173.0340 [M- Rib+2H] ⁺
11 (соотношение 11a/11b 99:1)	65 [76]	98.9 [R _t = 10.2, 11.2 (I)]	195 (H ₂ O) бесцветные кристаллы	268 [3,900], 241 [7,400]	289.0800	289.0794 [M+H] ⁺ , 173.0337 [M- dRib+2H] ⁺
12 (соотношение 12a/12b 82:18)	79 [95]	93.1 [R _t =9.0, 8.4, (I)]	- белый аморфный порошок	-	317.0949	317.0942 [M+H] ⁺ , 185.0540 [M- Rib+2H] ⁺
13 (соотношение 13a/13b 90:1)	83 [95]	99.1 [R _t =9.4 (I)]	- белый аморфный порошок	274 [3,800]; 243 [6,600]	301.1000	301.0966 [M+H] ⁺ , 185.0517 [M- dRib+2H] ⁺
14 (соотношение 14a/14b 93:7)	70 [82]	97.9 [t _R =17.0, t _R =18.0(II)]	- белый аморфный порошок	-	331.1106	331.1097 [M+H] ⁺ , 199.0690 [M- Rib+2H] ⁺
15 (соотношение 15a/15b 94:6)	71 [79]	86.2 [R _t =11.4, 11.2 (I)]	- белый аморфный порошок	-	315.1156	315.1120 [M+H] ⁺ , 199.0665 [M- dRib+2H] ⁺
16a	83 [88]	97.6 [R _t =9.5 (I)]	- белый аморфный порошок	277 [3,500]	372.1371	372.1342 [M+H] ⁺ , 240.0930 [M- Rib+2H] ⁺
17a	93 [89]	98.3 [R _t =9.1 (I)]	- белый аморфный порошок	277 [3,700]	356.1422	356.1395 [M+H] ⁺ , 240.0930 [M- dRib+2H] ⁺
18 (соотношение 18a/18b 98:2)	61 [68]	84.7 [R _t =6.2, 6.2 (I)]	- белый аморфный порошок	305 [1,400]; 231 [16,400] (в этаноле)	356.1422	356.1422 [M+H] ⁺ , 224.0981 [M- Rib+2H] ⁺
19 (соотношение 19a/19b 95:5)	63 [56]	92.5 [R _t = 8.5, 10.7 (I)]	- белый аморфный порошок	305 [2,000]; 231 [18,500] (в этаноле)	340.1473	340.1467 [M+H] ⁺ , 224.0999 [M- dRib+2H] ⁺

^a Параметры ВЭЖХ приведены в разделе "Материалы и методы". Метод элюирования: (I) от 0 до 70 % В за 20 мин, (II) от 0 до 30 % В за 20 мин, где элюент А – вода:0.1 % TFA, элюент В – смесь: вода, ацетонитрил, TFA-30:70:0.1.

Отнесение сигналов N1- (**a**) и N3- (**b**) региоизомеров нуклеозидов рассмотрим на примере нуклеозида (**8**).



1H NMR spectrum of 4,6-diF-BIR in CDCl₃. The x-axis is chemical shift (f1) in ppm, ranging from 0.0 to 10.0. The y-axis is intensity, ranging from -1 to 20. The spectrum shows several peaks with integration values and chemical shift labels.

Chemical Shift (ppm)	Integration
8.67	0.08
8.56	1.00
7.63	1.00
7.40	0.08
7.22	0.08
7.11	0.99
5.98	0.08
5.86	1.00
5.51	0.98
5.41	0.99
5.20	1.00
5.17	1.00
5.04	0.08
4.36	1.06
4.33	1.07
4.12	0.99
4.09	1.07
3.99	0.08
3.92	2.04
3.68	0.09
3.64	
3.58	
3.56	

61

Соотнесение сигналов проводили следующим образом: в диапазоне ароматических протонов мы видим для основного нуклеозида (кроме синглетов Н-2, 8.5 м.д.) два мультиплета: дублет дублета (7.63 м.д., $^3J_{H7,F6} = 8.98$, $^4J_{H7,H5} = 1.2$ Гц, 1Н,) и дублет триплетов (7.11 м.д., $^3J_{H5,F4} = ^3J_{H5,F6} = 10.5$, $^4J_{H5,H7} = 1.3$ Гц, 1Н, Н5) (Рисунок 15).

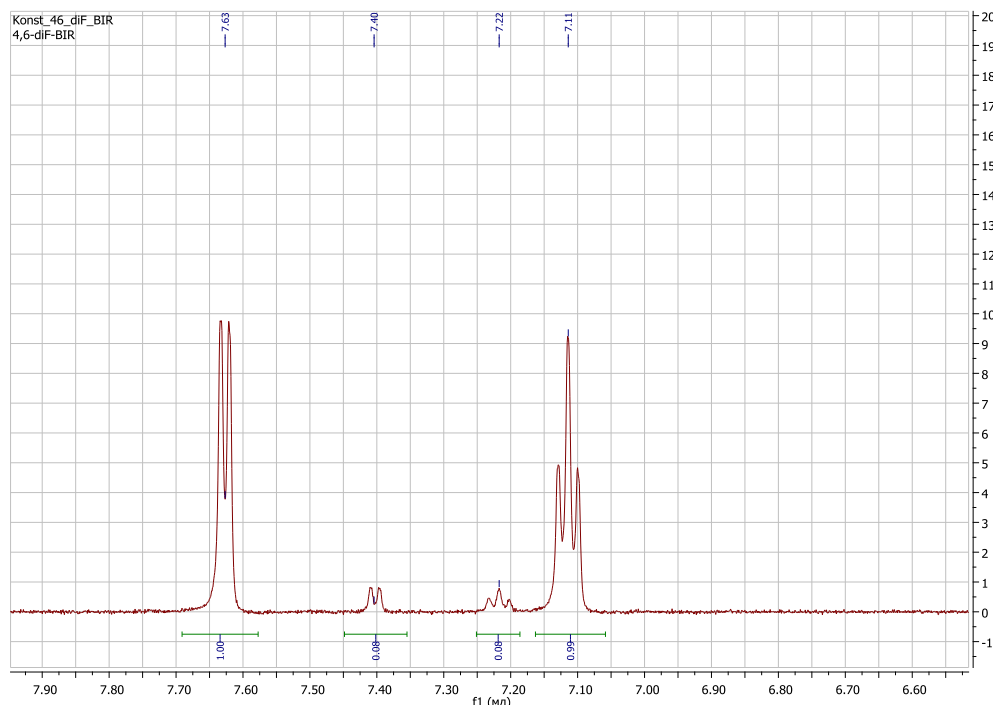


Рисунок 15 – Мультиплеты протонов бензимидазола нуклеозида (8)

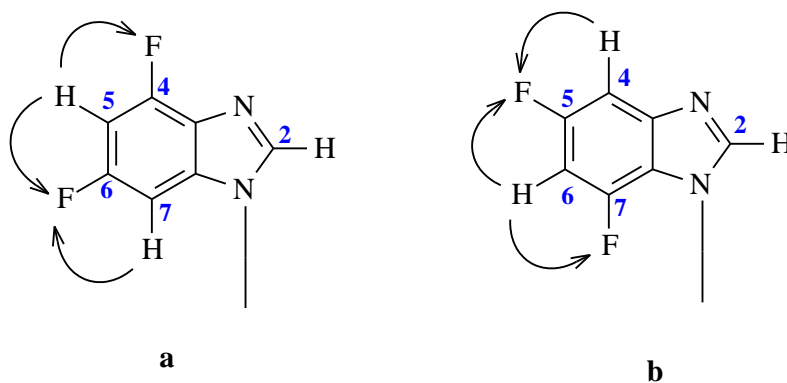


Рисунок 16 – Фрагмент структуры изомеров N1 и N3-нуклеозида (8)

Для изомера (а): мультиплетность дд (7.63 м.д.) характерна для Н7, взаимодействующего с F6 с константой 8.98 Гц, вторая константа четвертого порядка (1.2 Гц) возникает при взаимодействии Н7 с Н5 (Рисунок 16). Для протона Н5, в свою очередь, благодаря присутствию двух атомов фтора – возникает триплет с константой $^3J_{H5,F6} = 10.5$, и та же константа четвертого порядка $^4J_{H5,H7} = 1.3$ Гц. Пространственное взаимодействие протонов основания с кольцом рибозы изучали с использованием NOE-спектроскопии. На рисунке 17 приведен фрагмент NOE спектра: кросс-пики Н7 протона с протонами рибозы 5.85 (Н1'), 5.44 (ОН-2'), 5.16 (ОН-5'), 4.3

(H2'), 4.11 (H3'), 3.64 м.д. (H5'a), однозначно свидетельствуют о том, что рассматриваемое соединение имеет N1-тип замещения (Рисунок 18).

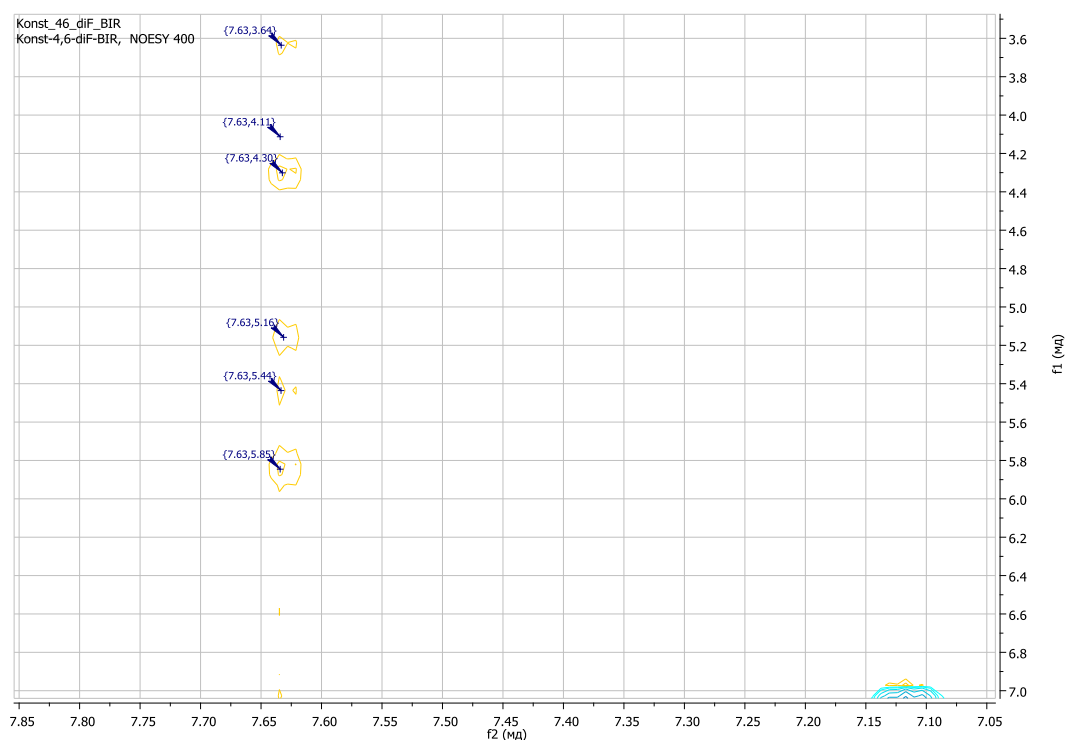


Рисунок 17 – Фрагмент NOE-спектра нуклеозида (**8**)

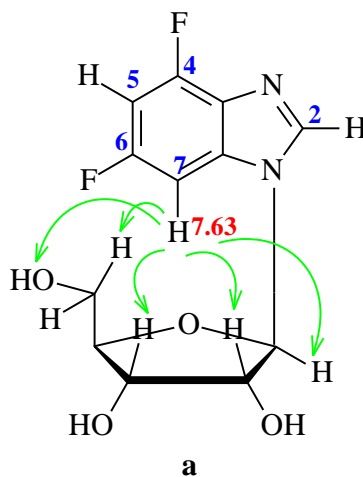


Рисунок 18 – Пространственное взаимодействие ароматического протона Н7 с протонами рибозы

Протон Н5 (7.11 м.д.) с протонами рибозы не взаимодействует. Кросс-пики в спектре NOE отсутствуют.

Для соединения (**8**) содержание N3-изомера составляет 7.4 %, поэтому получить кросс-пики для Н6 с протонами рибозы не удалось. Однако, для синтезированных ранее нуклеозидов [40] подробная расшифровка структуры N3-изомера была проведена, что дает нам основание отнести второй (минорный) нуклеозид к N3 типу.

Описание ЯМР спектров N1- (a) и N3- (b) изомеров нуклеозидов (8) - (19) приведено в таблице 5. Полный набор спектров для соединения 8, а также ¹H ЯМР спектры всех синтезированных рибозидов и 2'-дезоксирибозидов приведены в *Приложениях 1-16*.

Таблица 5 – Данные ¹H и ¹³C ЯМР спектров нуклеозидов бензимидазола (8)-(19) (ДМСО-d₆, δ, м.д., J, Гц)^a

Соединение	H-1' [C1']	H-2'a [C2']	H-2'b [C2']	H-3' [C3']	H-4' [C4']	H-5'a/H-5'b [C5']
	Другие [¹³ C]{ ¹⁵ N}					
8a 4,6-diF-R	5.86 (д, J = 6.4) [89.46]	4.33 (м, J = 6.0, 5.6) [74.02]	-	4.12 (м) [70.37]	3.99 (м) [86.22]	3.63, 3.68 (м) [61.47]
	8.50 (с, 1H, H2) [144.06], 7.63 (дд, ³ J _{H7,F6} = 8.98, ⁴ J _{H7,H5} = 1.2, 1H, H7) [95.77], 7.11 (дт, ³ J _{H5,F4} = ³ J _{H5,F6} = 10.5, ⁴ J _{H5,H7} = 1.3, 1H, H5) [98.07], 5.45 (д, J = 6.4, 1H, 2'-OH), 5.20 (д, J = 4.5, 1H, 3'-OH), 5.17 (т, J = 5.0, 1H, 5'-OH), [158.51 (д, J _{CF} = 235, C6), 152.98 (д, J _{CF} = 270 C4), 135.4 (с, C8), 129.47 (с, C9)], {237.36 (N3), 167.90 (N1)}					
8b 6,7-diF-R 7%	5.98 (д, J = 5.5) [89.98]	4.36 (м) [75.15]	-	4.09 (м) [70.20]	3.95 (м) [85.68]	3.57, 3.68 (м) [61.25]
	8.68 (с, 1H, H2) [144.73], 7.40 (дд, ³ J _{H4,F5} = 9.4, ⁴ J _{H4,H6} = 1.35, 1H, H4,) [102.24], 7.22 (дд, ³ J _{H6,F4} = ³ J _{H5,F7} = 10.9, ⁴ J _{H4,H6} < 1.4, 1H, H6) [99.53], 5.50 (д, J = 6.5, 1H, 2'-OH), 5.04 (т, J = 5.0, 1H, 5'-OH)					
9a 4,6-diF-dR	6.34 (дд, J = 6.3, 7.1) [85.40]	2.55 (м, ^{gem} J = 13.3, 7.1, & 1.1) [40.1]	2.30 (м, ^{gem} J = 13.3, 6.1 & 3.3) [40.1]	4.40 (м) [70.69]	3.88 (м) [88.09]	3.56, 3.60 (м) [61.70]
	8.52 (с, 1H, H2) [143.7], 7.58 (дд, ³ J _{H7,F6} = 9.0, ⁴ J _{H7,H5} = 2.0, 1H, H7,) [95.48], 7.10 (дт, ³ J _{H5,F4} = ³ J _{H5,F6} = 10.7, ⁴ J _{H5,H7} = 2.1, 1H, H5) [98.0], 5.32 (д, J = 3.7, 1H, 3'-OH), 5.0 (т, J = 5.0, 1H, 5'-OH), [135.55 (с, C8), 129.38 (с, C9)], {172.3 (N1), 237.5 (N3)}					
9b 6,7-diF-dR 5%	6.41 (дд, J = 5.5) [nd]	2.58 (м) [40.25]	2.37 (м) [40.25]	4.34 (м) [nd]	[nd] ^b	3.50, 3.49 (м) [nd]
	8.62 (с, 1H, H2) [144.4], 7.38 (м, 1H, H4) [nd], 7.20 (м, 1H, H5) [nd], 4.91 (уш. т, 1H, 5'-OH)					
10a 4,5,6-triF-R	5.87 (д, J = 6.43) [89.55]	4.31 (м) [74.03]	-	4.12 (уш. м) [70.47]	4.00 (уш. м) [86.39]	3.65, 3.68 (м) [61.45]
	8.58 (с, 1H, H2) [145.14], 7.94 (дд, ³ J _{H7,F} = 9.5, 6.4, 1H, H7,) [96.46], 5.46 (д, J = 6.4, 1H, 2'-OH), 5.22 (д, J = 4.2, 1H, 3'-OH), 5.22 (т, J = 4.26, 1H, 5'-OH), [147.1 (д, J _{CF} =230, C6,), 129.3 (C8)], {236.67 (N3), 167.44 (N1)}					
10b 5,6,7-triF-R 4%	5.97 (д, J = 5.0) [90.07]	4.36 (м) [75.08]	-	4.10 (уш. с) [nd]	3.96 (м) [85.91]	3.57, 3.58 (м) [nd]
	8.70 (с, 1H, H2), 7.69 (м, 1H, H4), 5.46 (д, J = 6.0, 1H, 2'-OH), 5.05 (т, J = 4.8, 1H, 5'-OH)					
11a 4,5,6-triF-dR	6.35 (дд, J = 6.9, 6.3) [85.57]	2.54 (м, ^{gem} J = 13, 6.6) [40.20]	2.30 (м) [40.20]	4.40 (м) [70.68]	3.89 (м) [88.20]	3.60-3.57 (м) [61.62]
	8.59 (с, 1H, H2) [144.76], 7.89 (дд, J = 10.0, 6.3, 1H, H7) [96.18], 5.33 (д, J = 4.0, 1H, 3'-OH), 5.04 (т, J = 5.1, 1H, 5'-OH), [147.8 (д, C6, J _{CF} =230), 140.1 (д, C5, J _{CF} =240), 129.25 (с, C8)], {237.0 (N3), 171.44 (N1)}					
11b 5,6,7-triF-dR <1%	6.41 (дд, J = 6.7, 6.4) [nd]	Перекрыт сигн. H-2' 11a [nd]	2.28 (м) [nd]	4.35 (м) [nd]	3.98 (м) [nd]	3.49 & 3.34 (2 м) [nd]
	8.64 (с, 1H, H2), 7.66 (дд, J = 10.4, 7.0, 1H, H4), 5.34 (уш. д, 1H, 3'-OH), 4.90 (т, J = 5.3, 1H, 5'-OH)					

Соединение	H-1' [C1']	H-2'a [C2']	H-2'b [C2']	H-3' [C3']	H-4' [C4']	H-5'a/H-5'b [C5']
	Другие [¹³ C]{ ¹⁵ N}					
12a 5-OMe- 4,6-diF- R	5.83 (д, $J = 6.5$) [89.45]	4.31 (м, $J = 10.7, 5.2$) [74.03]	-	4.11 (м) [70.52]	3.99 (м) [86.30]	3.64 - 3.67 (м) [61.48]
	8.48 (с, 1H, H2) [144.34 C2], 7.72 (д, $^3J_{H7,F6} = 10.8$, 1H, H7) [96.03 C7, $J_{C7,F6} = 26.8$], 5.43 (д, $J = 5.4$, 1H, 2'-OH), 5.20 (д, $J = 4.4$, 1H, 3'-OH), 5.18 (т, $J = 5.0$, 1H, 5'-OH), 3.90 (с, 3H, OCH ₃) [62.91 C _{Me}], [129.3 (д, C7a, $J_{C7a,F6} = 15.8$), 129.65 (дд, C5, $J = 98.1, 14.5$), 132.12 (дд, C4a, $J = 17.3, 12.7$), 146.58 (дд, C6, $J_{C6,F6} = 253.5, 7.7$)], 153.05 (д, C6, $J_{C6,F6} = 241.5$), {236.8 (N3), 166.5 (N1)}					
12b 6-OMe- 5,7-diF- R	5.96 (д, $J = 5.5$) [89.84]	4.36 (м) [74.15]	-	4.09 (м) [70.26]	3.95 (м) [85.74]	3.63 & 3.57 (2 м) [61.44]
	8.61 (с, 1H, H2) [144.09], 7.48 (д, $^3J_{H4,F5} = 10.58$, 1H, H4) [102.64], 5.51 (уш. д, 1H, 2'-OH), 1H, 3'-OH перекрыт сигналом 3'-OH 12a , 5.04 (т, $J = 4.5$, 1H, 5'-OH), 3.93 (с, 3H, OCH ₃) [62.97]					
13a 5-OMe- 4,6-diF- dR	6.32 (дд, $J = 6.3, 7.4$) [89.45]	2.54 (м, $J = 12, 7.4$) [40.04]	2.28 (м, $J = 12, 6.34$) [40.04]	4.39 (м) [80.70]	3.87 (м) [88.08]	3.56 - 3.58 (м) [61.67]
	8.49 (с, 1H, H2) [143.79], 7.67 (д, $^3J_{H7,F6} = 10.4$, 1H, H7,) [95.64], 5.31 (д, $J = 4.1$, 1H, 3'-OH), 5.00 (т, $J = 5.1$, 1H, 5'-OH), 3.90 (с, 3H, OCH ₃) [62.77], [129.5 (с, C8), 132.1 (с, C5), 152.9 (д, C6, $^2J_{C6,F6} = 243$)], {236.85 (N3), 170.82 (N1)}					
13b 6-OMe- 5,7-diF- dR <1%	6.40 (уш. т, $J \sim 6.5$) [nd]	~ 2.54 (м), [nd]	~ 2.28 (м) [nd]	4.34 (м) [nd]	~ 3.87 (м) [nd]	$\sim 3.56 - 3.58$ (м) [nd]
	8.65 (с, 1H, H2), 7.46 (д, $^3J_{H4,F6} = 10.5$, 1H, H4), 5.37 (уш. сигн, 1H, 3'-OH), 4.91 (т, $J = 5.5$, 1H, 5'-OH), 3.93 (с, 3H, OCH ₃),					
14a 5-OEt- 4,6-diF- R	5.83 (д, $J = 6.4$) [89.45]	4.31 (м) [73.91]	-	4.11 (м) [71.10]	3.99 (м) [86.24]	3.64 - 3.67 (м) [61.49]
	8.47 (с, 1H, H2) [144.20], 7.71 (д, $^3J_{H7,F6} = 10.5$, 1H, H7,) [95.80], 5.43 (д, $J = 6.4$, 1H, 2'-OH), 5.19 (д, $J = 4.8$, 1H, 3'-OH), 5.18 (т, $J = 4.6$, 1H, 5'-OH), 4.12 (м, 2H, OCH ₂ CH ₃) [70.41], 1.31 (т, 3H, CH ₂ CH ₃) [15.61], [129.3 (с, C8), 129.9 (с, C9), 130.66 (с, C5), 153.27 (д, C6, $^2J_{C6,F6} = 236.87$)], {236.81 (N3), 166.54 (N1)}					
14b 6-OEt- 5,7-diF- R 6%	5.96 (д, $J = 5.2$) [89.75]	4.36 (м) [nd]	-	nd перекрыт сигналом 3'-H 14a	3.94 (м) [nd]	~ 3.57 (м) [nd]
	8.61 (с, 1H, H2), 7.47 (д, $^3J_{H4,F6} = 10.4$, 1H, H4), 5.50 (д, $J = 5.9$, 1H, 2'-OH), ~ 5.19 (перекрыт сигн, 1H, 3'-OH), 5.04 (т, $J = 5.1$, 1H, 5'-OH), 4.15 (м, 2H, OCH ₂ CH ₃), 1.32 (т, 3H, CH ₂ CH ₃)					
15a 5-OEt- dR	6.31 (дд, $J = 6.4, 7.3$) [85.48]	2.54 (дт, $J = 13.5, 6.8$) [40.51]	2.28 (ддд, $J = 13.3, 5.8, 3.2$) [40.51]	4.39 (м) [70.80]	3.87 (м) [88.20]	3.56 - 3.59 (м) [61.77]
	8.49 (с, 1H, H2) [143.88], 7.66 (д, $^3J_{H7,F6} = 10.3$, 1H, H7,) [95.63, д, $J_{C7,F6} = 26.0$], 5.31 (д, $J = 4.0$, 1H, 3'-OH), 5.0 (т, $J = 5.10$, 1H, 5'-OH), 4.12 (дт, $J = 7.10$, 2H, CH ₂ CH ₃) [70.99], 1.31 (т, $J = 7.0$, 3H, CH ₂ CH ₃) [15.64], [129.5 (дд, $J_{C7a,F6} = 9.4, 14.7$, C7a), 129.66 (д, $J_{C4a,F5} = 14.3$, C4a), 130.66 (дд, $J = 11.0, 16.9$, C5), 146.90 (д, C4, $J_{C4,F4} = 254.6$), 153.17 (д, $^2J_{C6,F6} = 240.7$, C6)], {236.65 (N3), 170.89 (N1)}					

Соединение	H-1' [C1']	H-2'a [C2']	H-2'b [C2']	H-3' [C3']	H-4' [C4']	H-5'a/H-5'b [C5']
	Другие [¹³ C]{ ¹⁵ N}					
15b 6-OEt-5,7-diF-dR	6.40 (уш. т, $J = 6.48$) [nd]	2.57 (м) [nd]	2.36 (м) [nd]	4.34 (м) [nd]	3.87 перекрыт сигн. 4'-H 15a [nd]	3.46 - 3.56 (м) [nd]
	8.56 (с, 1H, H2) [143.80], 7.45 (д, $^3J_{H4,F6} = 10.8$, 1H, H4) [102.25], ~ 5.31 (перекрыт сигн., 1H, 3'-OH), 5.0 (т, $J = 5.48$, 1H, 5'-OH), 4.12 (дт, $J = 7.20$, 2H, CH ₂ CH ₃), 1.32 (т, перекрыт сигн. CH ₃ 15a , 3H, CH ₂ CH ₃)					
16a 4,6-diF-5-Morph-R	5.82 (д, $J = 6.0$) [89.45]	4.30 (м) [73.98]	-	4.10 (м) [70.42]	3.98 (м) [86.19]	3.61 - 3.70 (м) [61.50]
	8.44 (с, 1H, H2) [143.95], 7.61 (д, $^3J_{H7,F6} = 10.9$, 1H, H7,) [95.83], 5.43 (д, $J = 6.0$, 1H, 2'-OH), 5.19 (д, $J = 3.5$, 1H, 3'-OH), 5.16 (т, $J = 4.5$, 1H, 5'-OH), 3.71 (уш. с, 4H, O(CH ₂) ₂) [67.35], 3.10 (уш. с, 4H, N(CH ₂) ₂) [52.0], [122.84 (C5), 130.02 (C4a), 130.82 (C7a), 150.03 (д, $J_{C4,F4} = 244.2$, C4), 156.47 (д, $J_{C6,F6} = 243.2$, C6)], {166.41 (N1), 237.54 (N3), 287.19 N-morph}					
17a 4,6-diF-5-morph-dR	6.30 (т, $J = 6.7$) [85.28]	2.53 (м, $J = 13.6, 6.8$) [40.24]	2.28 (м, $J = 13.2, 5.8, 3.2$) [40.24]	4.39 (м) [70.66]	3.87 м [88.08]	3.55 - 3.58 (м) [61.61]
	8.46 (с, 1H, H2) [143.55], 7.56 (д, $^3J_{H7,F6} = 11.2$, 1H, H7,) [95.65], 5.31 (д, $J = 3.9$, 1H, 3'-OH), 4.99 (д, $J = 5.2$, 1H, 5'-OH), 3.71 (м, 4H, CH ₂ OCH ₂) [67.24], 3.09 (м, 4H, CH ₂ NCH ₂) [51.82], [122.76 (C5), 129.8 (C4a), 150.10 (д, $J_{C4,F4} = 237.8$, C4), 156.52 (д, $J_{C6,F6} = 248.2$, C6)], {170.91 (N1), 237.69 (N3), 287.23 N-morph}					
18a 4,6-diF-5-pyrrol-R	5.79 (д, $J = 6.3$) [89.34]	4.30 (м) [73.77]	-	4.10 (м) [70.39]	3.97 (м) [86.02]	3.63 - 3.67 (м) [61.50]
	8.39 (с, 1H, H2) [143.45], 7.55 (д, $^3J_{H7,F6} = 11.9$, 1H, H7,) [95.66], 5.41 (д, $J = 6.5$, 1H, 2'-OH), 5.18 (д, $J = 4.5$, 1H, 3'-OH), 5.15 (т, $J = 4.9$, 1H, 5'-OH), 3.30 (м, 4H, CH ₂ NCH ₂) [51.82], 1.90 (м, 4H, NCH ₂ (CH ₂) ₂) [25.61], [121.32 (с, C5), 128.93 (с, C8), 130.34 (с, C9), 148.42 (д, C4, $^2J_{C4,F4} = 247$), 155.52 (д, C6, $^2J_{C6,F6} = 242$)], {236.70 (N3), 165.65 (N1), 162.66 N _{pyr} }					
18b 5,7-diF-6-pyrrol-R < 1%	5.95 (д, $J = 5.4$) [nd]	4.35 (м) [nd]	-	4.20 (м) [nd]	3.92 (м) [nd]	~ 3.56 (м) [nd]
	8.50 (с, 1H, H2), 7.32 (д, $^3J_{H4,F5} = 12.18$, 1H, H4), 5.46 (д, $J = 5.8$, 1H, 3'-OH), 5.02 (т, $J = 5.2$, 1H, 5'-OH), Н-Руг перекрыт сигналом 18a 3.30 (м, 4H, CH ₂ NCH ₂) и 1.90 (м, 4H, NCH ₂ (CH ₂) ₂)					
19a 4,6-diF-5-pyrrol-dR	6.28 (дд, $J = 6.8$) [85.28]	2.53 (м, $J = 13.2, 5.86, 3.2$) [40.02]	2.26 (м, $J = 13.4, 6.98, 3.27$) [40.02]	4.38 (м) [70.73]	3.85 (м) [88.0]	3.55 - 3.57 (м) [61.71]
	8.40 (с, 1H, H2) [143.28], 7.49 (д, $^3J_{H7,F6} = 11.7$, 1H, H7,) [95.57], 5.30 (д, $J = 2.5$, 1H, 3'-OH), 4.98 (т, $J = 4.8$, 1H, 5'-OH), 3.30 (м, 4H, CH ₂ NCH ₂) [51.88], 1.89 (м, 4H, NCH ₂ (CH ₂) ₂) [25.67], [121.32 (дд, $J = 9.6, 16.4$, C5), 129.09 (дд, $J = 10.06, 16.6$, C7a), 130.25 (д, $J = 17.0$, C4a), 148.50 (дд, $J = 253.0, 9.5$, C4), 155.7 (дд, $J = 241.4, 6.9$, C6)] {170.02 (N1), 236.98 (N3), 292.61 N _{pyr} }					
19b 5,7-diF-6-pyrrol-dR 3%	6.39 (уш. т, $J \sim 6.22$) [nd]	~ 2.54 (м) [nd] перекрыт сигн. 19a	~ 2.27 (м) [nd] перекрыт сигн. 19a	4.34 (м) [nd]	3.91 (м) [nd]	3.51 (м) [nd]
	8.46 (с, 1H, H2), 7.31 (д, $^3J_{H4,F5} = 12.5$, 1H, H4), 5.38 (уш. сигн., 1H, 3'-OH), 4.91 (уш. т, $J \sim 4.8$, 1H, 5'-OH), 3.33 (м, 4H, CH ₂ NCH ₂) перекрыт сигналом Н ₂ O, ~ 1.89 (м, 4H, NCH ₂ (CH ₂) ₂) перекрыт сигн. 19a .					

nd – не определяется, например, количество изомера (5 %) в смеси с **9a** не позволяет выделить сигналы ¹³C **9b** в двумерных ¹H/¹³C-HSQC, ¹H/¹³C-HMBC спектрах.

Результаты исследований по синтезу новых рибозидов и 2'-дезоксирибозидов бензимидазола опубликованы в работе:

Chemo-Enzymatic Syntheses and Antiviral Evaluation of 5-substituted 4,6-difluorobenzimidazoles Ribo- and 2'-Deoxyribo-Nucleosides. M.I. Kharitonova, I.V. Fateev, A.L. Kaushin, I.D. Konstantinova, S.K. Kotovskaya, V.L. Leont'eva, G.A. Galegov, V.N. Charushin, A.I. Miroshnikov // Synthesis. 2016, 48(03), 394-406 [150].

2.1.2 Синтез серии 2'-дезоксиг-2'-фторарабинозидов 5,6-, 4,6- и 4,5,6-замещенных бензимидазолов

Изменять цитотоксичность и биологическую активность нуклеозидов можно не только введением заместителей в гетероциклическое основание, но и заменой природных остатков – *D*-рибозы или 2'-дезоксиг-*D*-рибозы – на неприродные. Так, например, замена рибозы на остаток арабинозы в молекуле аденозина привела к получению противовирусного препарата Видарабин, активного против вируса простого герпеса и Варицелла-Зостер вируса. Данное соединение применяется для лечения герпетических кератитов, увеитов, ветряной оспы, опоясывающего герпеса и герпетических энцефалитов [151, 152]. Мы решили проверить, как изменится активность и цитотоксичность некоторых нуклеозидов бензимидазола по сравнению с соединениями серии дизамещенных (**1**) и тризамещенных нуклеозидов бензимидазола (**8**) – (**19**) при замене природного остатка углевода в молекуле на арабинозу или 2'-дезоксиг-2'-фторарабинозу.

Сначала мы попытались синтезировать β -*D*-арабинозиды бензимидазола и его 4,5,6-замещенных аналогов по реакции ферментативного трансгликозилирования. Для синтеза новой серии нуклеозидов были выбраны несколько модифицированных бензимидазолов (Рисунок 19). Выбор основывался на данных по антигерпетической активности синтезированных ранее рибо- и 2'-дезоксигрибонуклеозидов серий (**1**) [40, 150] и соединений (**8**) – (**19**).

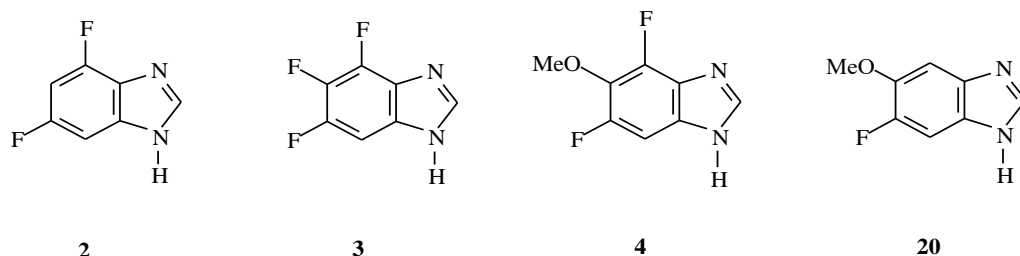


Рисунок 19 – Модифицированные бензимидазолы, отобранные для синтеза арабинозидов и 2'-фторарабинозидов

Индекс селективности (показывающий, во сколько раз уровень цитотоксичности превосходит уровень противовирусной активности) соединений против вируса HSV-1 изменялся от 0 в случае нуклеозидов основания (**20**), до 9 в случае рибозидов (**3**). Отобранные для синтеза арабинозидов и 2'-дезоксиг-2'-фторарабинозидов основания содержали в качестве заместителей только метоксигруппу и атомы фтора, причем количество атомов фтора в бензимидазольном кольце варьировалось от одного до трех, что, как мы предположили, должно было упростить корреляцию данных по активности полученных соединений с их структурой.

Для синтеза β -*D*-арабинозидов использовали NPs *E. coli* и два типа донора арабинозы: 1-(α -*D*-арабинофуранозил)урацил и 1- α -фосфат арабинозы. Однако, нам не удалось получить ни одного нуклеозидов бензимидазола с помощью такого подхода, хотя по отдельности каждый

модифицированный бензимидазол и 1- α -фосфат арабинозы являются хорошими субстратами для PNP *E. coli* [153-155]. Более того, даже в ферментативных реакциях арабинозилирования с незамещенным бензимидазолом (BI), которые были поставлены в качестве контроля, не было обнаружено образования нуклеозидов.

Нас очень заинтересовало, почему PNP не способна синтезировать 1-(β -D-арабинозил)бензимидазолы. Мы предположили, что это явление может быть связано с тем, что β -D-арабинозиды бензимидазола, образующиеся в активном центре фермента, являются его ингибиторами. Чтобы это проверить и установить тип ингибирования, мы синтезировали 1- β -D-арабинофуранозид незамещенного бензимидазола (Ara^{fur}-BI) химически.

Литературный поиск химических способов синтеза арабинозидов бензимидазола показал, что в основном все описанные ранее арабинозиды бензимидазола имеют *L*-конфигурацию [81, 82]. Единственное упоминание о синтезе 2,5,6-трихлор-1-(β -D-арабинофуранозил)бензимидазола из 2,5,6-трихлор-1-(2,3,5-три-*O*-бензоил- β -D-арабинофуранозил)бензимидазола дается в патенте [83], однако, и в нем структура соединения не была охарактеризована. Поэтому мы синтезировали 1-(β -D-арабинофуранозил)бензимидазол (**26**) из арабинозы и силилированного по N1 положению бензимидазола (**24**) по новой методике (Рисунок 20).

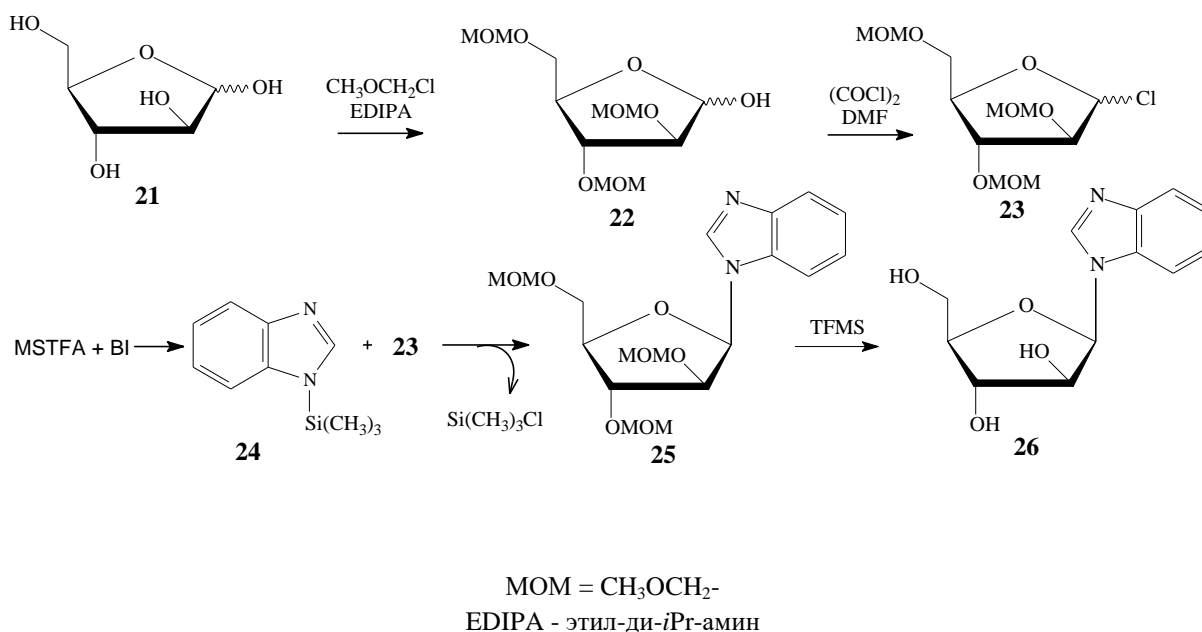


Рисунок 20 – Схема химического способа синтеза 1-(β -D-арабинофуранозил)бензимидазола (**26**)

Существует три основных подхода к получению нуклеозидов β -D-арабинофуранозы: обращение конфигурации при втором атоме углерода в остатке рибозы рибонуклеозидов, химический нуклеозидный синтез и ферментативный (химико-ферментативный) синтез нуклеозидов [153]. Самый простой, первый подход, эффективен только в случае

рибопиримидинов, образующих 2,2-ангидронуклеозиды [156, 157]. Если это невозможно (как для рибопуринов и имидазолидов), соответствующие производные получают путем многостадийных синтезов, требующих выделения промежуточных соединений, зачастую с помощью сложной хроматографии. Разработанная в нашей лаборатории последовательность стадий химического синтеза позволяет минимизировать количество таких разделений, что существенно упрощает общую методику.

Первый этап синтеза - алкилирование арабинозы (**21**) тремя эквивалентами метоксиметилхлорида (MOM-Cl) (Рисунок 20), в результате чего образуется сложная смесь MOM-эфиров арабинофуранозы и арабинопиранозы и, в том числе, MOM-эфир арабинофуранозы (**22**) и арабинопиранозы со свободной гликозильной OH-группой. При обработке полученной смеси реагентом Вильсмейера (оксалилхлорид/DMF) образуется смесь 2,3,5-три-*O*-метоксиметил-арабинофуранозил- (**23**) и пиранозил- хлоридов. Последующая реакция с 1-*N*-триметилсилилбензимидазолом (**24**) проходит стереоспецифически с образованием смеси из двух защищенных бета-аномеров арабинозилбензимидазола в пиранозной и фуранозной (**25**) форме (вместо образования смеси из четырех возможных арабинозилнуклеозидов). Последующая обработка реакционной смеси трифторметансульфокислотой в метаноле привела к получению смеси β -D-арабинопиранозил- и фуранозил- (**26**) бензимидазола, которая легко разделялась препаративной ВЭЖХ.

Поскольку после алкилирования арабинозы (**21**) MOM-Cl в диоксане и последующих преобразований получается смесь арабинопиранозил- и фуранозил- бензимидазолов в соотношении 7:3, необходимо было оптимизировать первую стадию синтеза таким образом, чтобы процент пиранозных форм был минимальным. Мы обнаружили, что проведение реакции алкилирования арабинозы (**21**) при пониженной температуре в неполярных растворителях (бензоле, дихлорметане) в итоге приводит к существенному (7:1) преобладанию фуранозного производного (**22**).

β -D-Арабинофуранозил бензимидазол (Ara^{fur}-BI, **26**) был выделен колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 40 %. Структура соединения была подтверждена данными ¹H- и двумерной гомо- и гетеро-ядерной ЯМР-спектроскопии: ¹H/¹H-COSY, ¹H/¹³C-HSQC, ¹H/¹³C-HMBC, ¹H/¹⁵N-HSQC, ¹H/¹⁵N-HMBC и [¹H,¹H] NOE спектрами. В [¹H,¹H] NOE спектре присутствуют кросс-пики взаимодействия C2 протона бензимидазола (8.43 м.д.) с H5' протонами (3.66 и 3.72 м.д.), с H3' протонами (4.12 м.д.) и OH2' (5.55 м.д.) арабинозы (Рисунок 21). Кросс-пики C2 протона с H4' протоном (м.д.) отсутствовали. Все эти данные в совокупности свидетельствуют о β -конфигурации синтезированного нуклеозида (**26**).

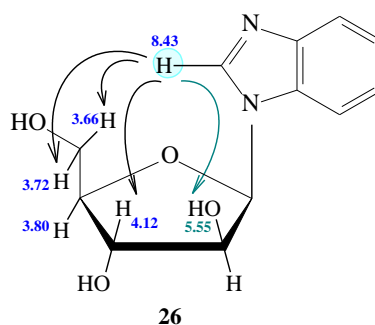
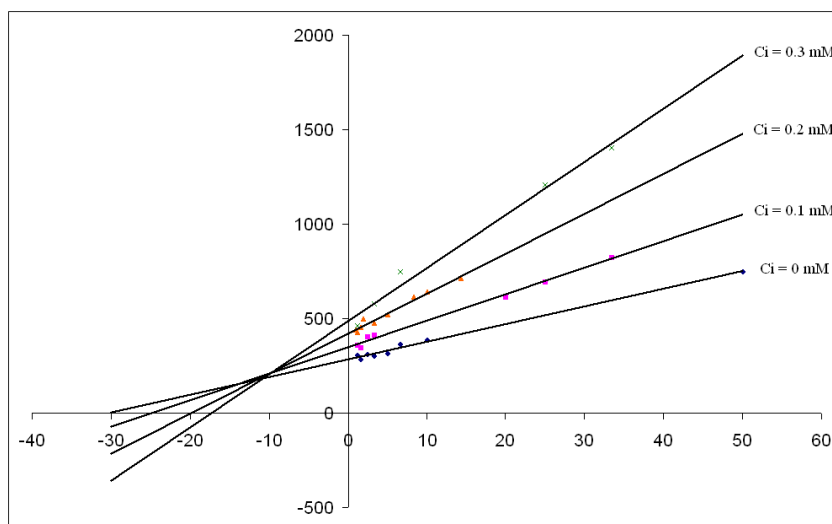


Рисунок 21 – ЯМР спектр Ara^{fur}-BI (26)

Мы синтезировали Ara^{fur}-BI для того, чтобы определить тип ингибирования фермента данным соединением. Для этого была изучена кинетика фосфоориза инозина с помощью PNP в присутствии предполагаемого ингибитора Ara^{fur}-BI. Было установлено, что максимальная скорость реакции уменьшается, а константа Михаэлиса увеличивается с увеличением концентрации Ara^{fur}-BI. Такая зависимость характерна для ингибиторов смешанного типа. Константу ингибирования рассчитывали в соответствии с уравнением ингибирования смешанного типа (Рисунок 22). Среднее значение K_i составило 0.17 ± 0.04 мМ, а значение α – 2.9 ± 1.0 . Эти результаты проиллюстрированы на графике Лайнуивера-Берка (Рисунок 23).

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

Рисунок 22 – Уравнение для ингибирования смешанного типа



Концентрации Ara^{fur}-BI: 0.3; 0.2; 0.1 и 0 мМ. Все реакции проводились в 10 мМ К/фосфатном буфере (рН 7.0) при 20 °С в течение 2 мин, количество PNP - 0.15 мкг/мл, количество инозина - от 0.02 до 1.0 мМ.

Рисунок 23 – График Лайнуивера-Берка для фосфоориза инозина с помощью PNP при разных концентрациях Ara^{fur}-BI (26).

Поскольку мы определили, что арабинозид (26) является ингибитором PNP *E. coli* смешанного типа, то его ферментативный синтез с помощью PNP действительно невозможен.

Полученные результаты объясняют также отсутствие продуктов арабинозилирования в ферментативных реакциях синтеза нуклеозидов 4,6-, 5,6-ди- и 4,5,6-тризамещенных бензимидазолов. Судя по всему, арабинозиды модифицированных оснований бензимидазола также являются ингибиторами PNP.

Несмотря на неудачной попытку получить арабинозиды по реакции ферментативного трансгликозилирования, мы решили попробовать синтезировать 2'-дезоксидеозокси-2'-фтор-арабинопроизводные модифицированных нуклеозидов бензимидазола. Наше решение синтезировать нуклеозиды VI^m с фторированным остатком углевода связано с наличием в литературе данных о высокой противовирусной и противоопухолевой активности некоторых 2'-дезоксидеозокси-2'-фтор (рибо- или арабино-) нуклеозидов (клофарабин, гемцитабин и др.) [86], [158], [159].

Ранее уже было показано, что PNP *E. coli* воспринимает 1- α -фосфат-2-дезоксидеозокси-2'-фтор-арабинозы в качестве субстрата для реакции трансгликозилирования. С использованием этого соединения удалось разработать ферментативный подход к получению клофарабина [160].

Первые же тестовые реакции синтеза 2'-дезоксидеозокси-2'-фтор-арабинозидов модифицированных бензимидазолов (2) - (4), (20) по реакции трансгликозилирования показали положительные результаты: по данным хромато-масс-спектрометрии было зафиксировано образование N1- (a) и N3- (b) нуклеозидов - 2'-дезоксидеозокси-2'-фторарабинозидов (27) - (30) (Рисунок 24).

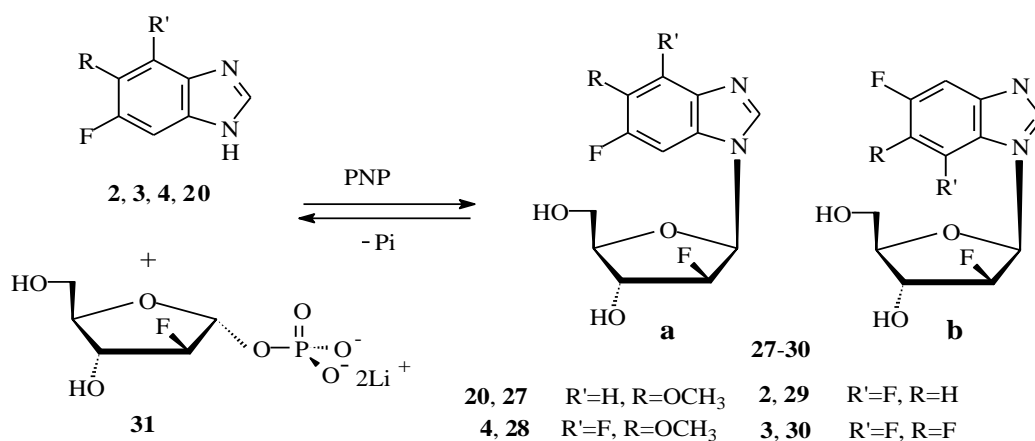


Рисунок 24 – Схема химико-ферментативного синтеза 2'-дезоксидеозокси-2'-фтор- β -D-(арабинофуранозил)бензимидазолов 27-30

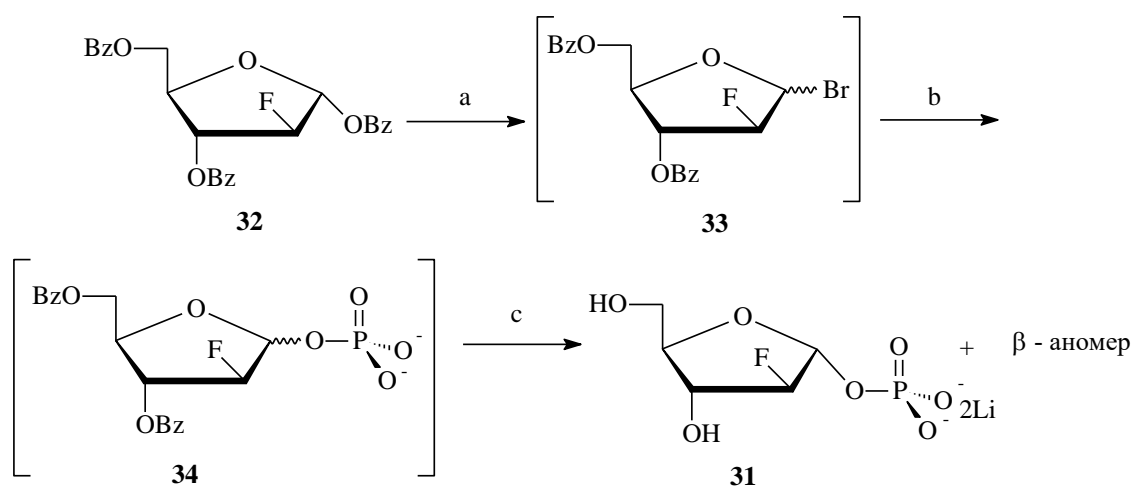
Данные по конверсии модифицированных оснований в нуклеозиды в пробных реакциях указаны в таблице 6.

2-Дезоксидеозокси-2-фтор- α -D-арабинофуранозил-1-фосфат (31, 1-P-FAra) был синтезирован с выходом 50 % из 1,3,5-три-O-бензоил-2-дезоксидеозокси-2-фтор-арабинофуранозы по методу, описанному ранее [160].

Таблица 6 – Экспериментальные данные по конверсии модифицированных бензимидазолов в 2'-фторарабинозиды за 24 ч в реакциях с PNP до оптимизации условий синтеза

Основание	Нуклеозид	Конверсия основания в нуклеозид, %
2	29	27.3
3	30	24.2
4	28	61.3
20	27	38.7

Схема синтеза 1-Р-FAга (**31**) представлена на рисунке 25. Данный метод, разработанный в нашей лаборатории, заключался в следующем: на первом этапе 1-*O*-бензоат (**32**) выдерживался с ацетил бромидом в безводной фосфорной кислоте в течение нескольких часов с образованием соответствующей бромгалогенозы (**33**). Реакционную смесь, содержащую интермедиат (**33**) растворяли в диоксане, охлаждали, обрабатывали три-*n*-бутиламином и затем выдерживали при комнатной температуре ночь (контролироль с помощью ТСХ). Затем в реакционную смесь добавляли эквивалентный объем воды, постепенно вводили LiOH (рН 7-8) и выдерживали, в течение часа. Образующийся фосфат лития отфильтровывали, рН водной фазы доводили до 11, три-*n*-бутиламин экстрагировали хлороформом. Водный слой выдерживали при комнатной температуре в течение еще одной ночи, образование незащищенного фосфата (**31**) и его β-аномера контролировали по ТСХ. Реакционную смесь (рН 7.5) концентрировали в вакууме до объема 10 мл, добавляли метанол и ацетонитрил и выдерживали при 4 °С двое суток. Осадок отделяли центрифугированием, промывали метанолом, ацетонитрилом, эфиром и сушили в вакууме над P₂O₅, в результате чего получали смесь α-фосфата (**31**) и его β-аномера в виде белого порошка (1:1 в соответствии с данными ¹H ЯМР спектроскопии).



(a) AcBr/H₃PO₄, 50 °С, 5 ч; (b) диоксан/три-*n*-бутиламин, 25 °С, 12–18 ч; (c) вода/LiOH, 25 °С, 1 ч.

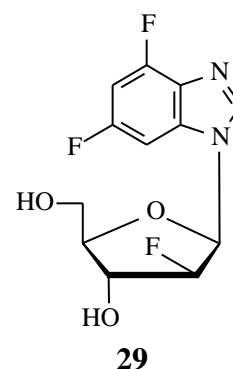
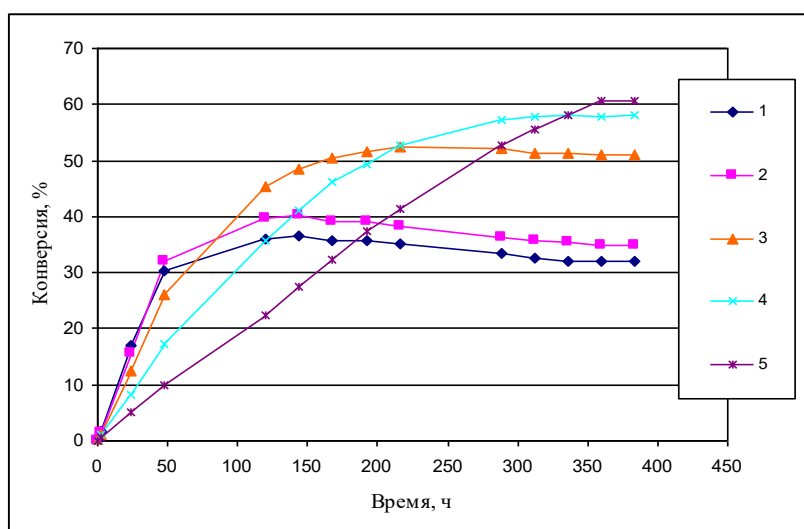
Рисунок 25 – Химический синтез 2-дезоксид-2-фтор-α-*D*-арабинофуранозил-1-фосфата (**31**)

Следующим этапом синтеза 2'-фторарабинозидов бензимидазолов (**27**) - (**30**) была реакция ферментативного трансгликозилирования, осуществляемая PNP *E. coli*. Условия ферментативных реакций были оптимизированы по следующим параметрам:

- соотношение BI^m и 1-P-FArA в исходной смеси;
- оптимальное количество PNP *E. coli*;
- pH реакционной смеси.

Объем каждой реакции составлял 0.5 мл. Первые два эксперимента проводили при 50 °С в воде, при pH 7. Ход реакций контролировали с помощью обращеннофазовой ВЭЖХ и LC-MS по появлению новых соединений в реакционных смесях.

При оптимизации соотношения 1-P-FArA и модифицированных бензимидазолов (**2**), (**3**), (**4**), (**20**) - исследования проводились в диапазоне соотношений от 2:1 до 5:1. Оптимальная конверсия основания в нуклеозид наблюдалась в реакциях при соотношении 4:1 и 5:1. При дальнейшем увеличении количества 1-P-FArA в реакционной смеси, степень конверсии изменялась незначительно (Рисунок 26). Данные представлены на примере реакции синтеза нуклеозида (**29**) из основания (**2**).

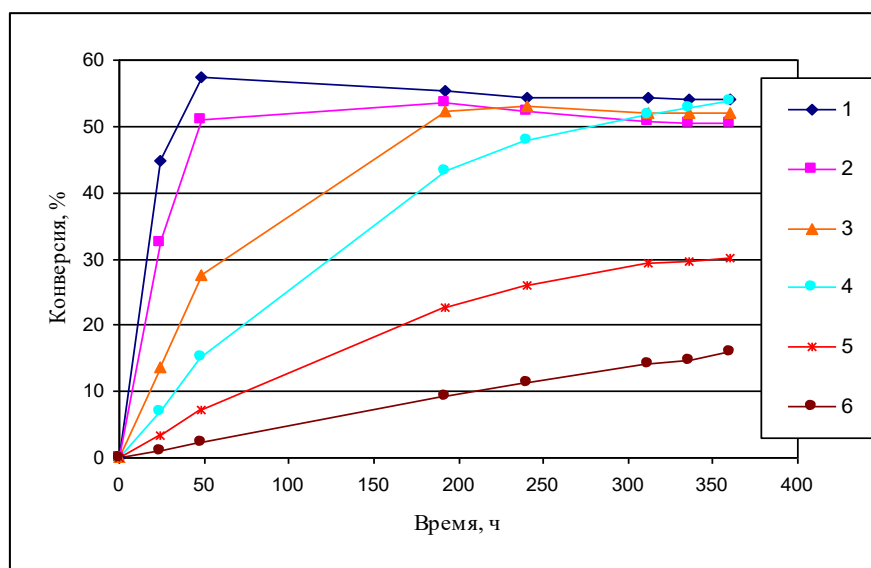


Условия реакции: основание (**2**) (1 мМ) и 1-P-FArA (X мМ) в 0.5 мл водного раствора (pH 7.0), количество PNP *E. coli* - 14500 е.а., 50 °С, 384 ч. X = 1) 2 мМ; 2) 3 мМ; 3) 4 мМ; 4) 5 мМ; 5) 10 мМ.

Рисунок 26 – Зависимость конверсии основания (**2**) в нуклеозид (**29**) от соотношения 1-P-FArA/модифицированное основание

При оптимизации количества PNP для осуществления реакции трансгликозилирования исследовался диапазон от 145 до 14500 е.а. на 1 ммоль гетероциклического основания. По данным, приведенным на рисунке 27 видно, что очень часто в первые часы синтеза увеличение количества фермента приводило к ускорению образования продуктов. Однако со временем в преобладающем количестве реакций, с количеством ферментов от 1450 до 14500 е.а./ммоль BI^m ,

конверсия основания в нуклеозид достигала примерно одного значения - порядка 50 %. Данные на рисунке 27 представлены на примере образования нуклеозида (29).



Условия реакции: основание (7) (1 мМ) и 1-P-FAg (5 мМ) в 0.5 мл водного раствора (рН 7.0), 50 °С, 360 ч, количество PNP *E. coli* (e.a./ммоль основания): 1 - 14500; 2 - 8700; 3 - 2900; 4 - 1450; 5 - 580; 6 - 145.

Рисунок 27 – Зависимость конверсии основания (2) в нуклеозид (29) от количества фермента PNP

Известно, что оптимальные значения рН реакционной смеси при использовании PNP *E.coli* находятся в диапазоне 6-8 [130]. Для данного синтеза изменение значений рН в пределах 6-8, ожидаемо практически не повлияло на скорость образования нуклеозидов бензимидазола. Однако, что интересно: значение рН 10 оказалось критичным для ферментативного синтеза 2'-фторарабинозидов: образования нуклеозидов в таких условиях не наблюдалось. При этом, что синтез рибозидов и 2'-дезоксирибозидов (8) – (19) происходил (хотя и со значительным снижением скорости процесса) даже при критических значениях рН = 4.0 и 10.

Конверсия оснований в нуклеозиды (27) - (30) после оптимизации условий синтеза составила от 46 до 88 %. Во всех реакциях наблюдалось, как и в случае синтеза рибозидов и 2'-дезоксирибозидов, образование смеси N1 (a) и N3 (b) региоизомеров нуклеозидов с преобладанием N-1-изомера (a) (Соотношение изомеров представлено в таблице 7).

Таблица 7 – Конверсия оснований бензимидазола (2) - (4), (20) в 2'-фторарабинозиды (27) - (30) с указанием соотношения N1 (a) и N3 (b) изомеров

Соединение	Конверсия (%)	Соотношение изомеров (по данным ВЭЖХ)	
		a	b
27	88	60	40
28	63	96	4
29	62	98	2
30	46	96	4

Несмотря на то, что 2'-фторарабинозиды не являются типичным субстратом для PNP, нам удалось получить прекрасную конверсию в них модифицированных бензимидазолов: до 88 % для 5-фтор-6-метокси-бензимидазола (**20**).

В оптимизированных условиях была синтезирована серия из четырех 2'-фторарабинозидов в количествах, достаточных для исследования их активности и цитотоксичности *in vitro*. Все ферментативные реакции синтеза были проведены при pH 7.0 и 50 °C, процесс контролировался с помощью ВЭЖХ. Время синтеза нуклеозидов варьировалось от 2 дней для соединения (**28**) до 15 дней для соединения (**29**). После достижения максимальной конверсии (контролировалась с помощью ВЭЖХ), реакции были остановлены добавлением этанола. Реакционные смеси упаривались до объема 5 мл, целевые соединения (изомеры **a**) были выделены из реакционной смеси с помощью обращено-фазовой хроматографии (размер колонки 20×100 мм). Экспериментальные данные по ферментативному синтезу нуклеозидов представлены в сводной таблице 8.

Таблица 8 – Экспериментальные данные синтеза β-D-2'-дезоксид-2'-фтор-арабинонуклеозидов бензимидазола (**27**) - (**30**)

Соединение, М.в. (г/моль)	Акцептор, М.в. (г/моль)	Акцептор, мг (ммоль)	Донор ^a , мг (ммоль)	Соотнош. A/D	PNP, е.а. (A) ^b	Время, ч	Ост. кол- во акцептора (ВЭЖХ), %	E ^c , %
		A	D					
27 300.3	166.2	50 (0.30)	176 (0.72)	1:2.5	330 (1100)	168	12	-
28 318.3	184.1	50 (0.27)	133 (0.54)	1:2	250 (925)	48	37	25 ¹⁾
29 288.2	154.1	50 (0.32)	395 (1.62)	1:5	660 (2061)	360	38	60 ²⁾
30 306.2	172.1	70 (0.41)	170 (0.71)	1:2	786 (1917)	624	54	70 ³⁾

^a Донор углеводного остатка - 2-дезоксид-2-фтор-α-D-арабинофуранозы-1-фосфат (дилитиевая соль), М.в. = 244.0 г/моль

^b Количество PNP (A) приведено в е. а. на 1 ммоль модифицированного основания,

^c Нуклеозиды элюировали с колонки в градиенте: 1) вода - ацетонитрил (соединение **28**), 2) вода - этанол (соединение **29**), 3) вода - метанол (соединение **30**).

E - % (объемный) ацетонитрила или спирта в воде.

Физико-химические свойства синтезированных нуклеозидов приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Физико-химические свойства нуклеозидов (27) - (30)

Соединение (соотношение изомеров по ВЭЖХ)	Выход (%), [мг]	Чистота (%) по ВЭЖХ ^a [R _t , мин (метод)]	Физическое состояние	УФ [λ _{max} , нм; (ε)]	Рассч. [M+H] ⁺	MS, m/z
SK-468-F-Ara, 27 (27a/27b = 60:40)	42 [38]	99.2 [R _t = 8.6 (III)]	белый аморфный порошок	285 [6.200] 243 [6.100]	301.1000	301.1027 [M+H] ⁺ , 167.0632 [M-FAra+2H] ⁺
SK-473-F-Ara, 28	55 [47]	98.0 [R _t = 10.2 (I)]	белый аморфный порошок	275 [2.700] 241 [5.500]	319.0906	319.0919 [M+H] ⁺ , 185.0537 [M-FAra+2H] ⁺
SK-471-F-Ara, 29	40.5 [38]	99.2 [R _t = 8.6 (IV)]	белый аморфный порошок	240 [6.100]	289.0800	289.0792 [M+H] ⁺ , 155.0411 [M-FAra+2H] ⁺
SK-472-F-Ara, 30 (30a/30b = 97:3)	40 [21]	99.0 [R _t = 10.4, 10.0 (IV)]	белый аморфный порошок	239 [6.500]	307.0706	307.0686 [M+H] ⁺ , 173.0313 [M-FAra+2H] ⁺

^a Параметры ВЭЖХ приведены в разделе "Материалы и методы". Метод элюирования: (I) от 0 до 70 % В за 20 мин, скорость потока – 1 мл/мин, (III) 7 % В, скорость потока – 1 мл/мин, (IV) от 0 до 70 % В за 15 мин, скорость потока – 0.5 мл/мин, где элюент А – вода:0/1 %TFA, элюент В - вода-ацетонитрил-TFA, 30:70:0.1 %, а.

Для всех структур синтезированных нуклеозидов были получены ¹H и ¹³C ЯМР спектры, данные (включая [¹H,¹H] и [¹H,¹³C] 2D: COSY, HSQC, HMBC и NOE спектры) представлены в таблице 10 (¹H ЯМР спектры - Приложения 17-22).

Таблица 10 – ¹H и ¹³C ЯМР спектры нуклеозидов бензимидазола (DMCO-d₆, δ, м.д., J, Гц)

Соединение	Н-1' [C1']	Н-2' [C2']	Н-3' [C3']	Н-4' [C4']	Н-5'a/Н-5'b [C5']
	Другие [¹³ C]{ ¹⁵ N}				
31 1-P-FAra	5.70 (тд, J _{1,2} ~0.7, J _{1,F} = 9.83, J _{1,P} = 6.99), [100.21, J _{C1,F} = 32.4]	5.035 (м, J ~0.7, 1.7, J _{2,F} = 50.2), [100.77, J _{C2,F} = 172]	4.20 (м, J _{3,F} = 24.4, J = 1.2, 5.4), [74.85, J _{C3,F} = 18.5]	4.25 (м, J = 5.47, 5.35, 3.37), [84.55]	3.87 (м, ^{gem} J = 12.4, J = 3.37), 3.74 (м, ^{gem} J = 12.4, J = 5.35). [60.99]
	-				
26 Ara ^{fur} -BI	6.28 (д, J = 5.1) [85.48]	4.21 (м) [76.44]	4.12 (м) [75.4]	3.80 (м) [84.29]	3.66 (дд, J = 11.5, 4.8), 3.72 (дд, J = 11.5, 3.6) [61.1]
	8.43 (с, 1H, H2) [143.54], 7.76 (д, J _{H4,H5} = 7.4, 1H, H4) [119.47], 7.75 (д, J _{H7,H6} = 7.4, 1H, H7) [111.59], 7.26 (т, J = 7.4, 1H, H6) [122.88], 7.22 (т, J = 7.4, 1H, H5) [122.23], 5.55 (д, J = 5.6, 1H, 2'-OH), 5.52 (уш. сигн., 1H, 3'-OH), 5.09 (уш. т, 1H, 5'-OH), [143.0 (C9), 134.03 (C8)], {241.3 (N3), 161.55 (N1)}				
27a 6-F-5-OMe-F-Ara	6.37 (дд, J = 16.7, 4.4) [84.25]	5.14 (тд, J = 52.6, 4.0, 3.2) [96.92]	4.38 (м, ³ J _{H3',F2'} = 21.3) [73.46]	3.82 (м) [83.62]	3.67, 3.72 (м) [60.47]
	8.31 (с, 1H, H2) [143.40], 7.65 (д, ⁴ J _{H7,F5} = 11.4, 1H, H7) [99.73], 7.40 (д, ⁴ J _{H4,F6} = 8.0, 1H, H4) [103.46], 5.93 (д, J = 4.1, 1H, 3'-OH), 5.13 (т, J = 5.5, 1H, 5'-OH), 3.86 (с, 1H, CH ₃) [56.71], [149.91 (д, J = 245.0, C6), 144.7 (C5), 139.52 (C9), 126.58 (C8)], {246.38 (N3), 157.49 (N1)}				

Соединение	Н-1' [C1']	Н-2' [C2']	Н-3' [C3']	Н-4' [C4']	Н-5'a/Н-5'b [C5']
	Другие [¹³ C]{ ¹⁵ N}				
27b 5-F-6-OMe- F-Ara	6.45 (дд, $J = 16.67, 4.3$) [84.07]	5.23 (тд, $J = 52.6, 4.1, 3.2$) [96.74, $J_{C,F} = 198.0$]	4.42 (м, $^3J_{H3',F2'} = 20.8$) [73.59, $J_{C,F} = 53.0$]	3.84 (м) [83.60]	3.67, 3.74 (2м) [60.38]
	8.27 (с, 1H, H2) [143.03], 7.56 (д, $^4J_{H7,F5} = 7.7, 1H, H7$) [96.72], 7.49 (д, $J_{H4,F5} = 11.6, 1H, H4$) [105.9], 5.95 (д, $J = 4.8, 1H, 3'-OH$), 5.14 (уш. т, 1H, 5'-OH), 3.87 (с, 1H, CH ₃) [56.72], [149.6 (д, $J = 240.0, C5$), 145.2 (C6), 136.04 (C9), 129.92 (C8)], {246.65 (N3), 157.47 (N1)}				
28a 4,6-diF-5- OMe-F-Ara	6.42 (дд, $J = 15.9, 4.4$) [84.3]	5.21 (дт, $J = 52.6, 4.3, 3.3$) [96.8, $J_{C,F} = 188.0$]	4.39 (дт, $J = 20.9, 5.4, 3.3$) [73.8, $J_{C,F} = 26.0$]	3.84 (м) [83.8]	3.67, 3.74 (2м) [60.3]
	8.43 (с, 1H, H2) [144.4], 7.62 (д, $^3J_{H7,F6} = 10.5, 1H, H7$) [95.9], 5.96 (м, 1H, 3'-OH), 5.17 (м, 1H, 5'-OH), 3.91 (с, 1H, CH ₃) [62.8], [153.1, 146.4, 132.1 (C _{аром}), 129.8 (C8)], {237.7 (N3), 160.2 (N1)}				
29a 4,6-diF-F-Ara	6.42 (дд, $J = 15.8, 4.5$) [84.41]	5.24 (дт, $J = 52.5, 3.6, 3.6$) [96.84, $J_{C,F} = 191.9$]	4.41 (уш. дт, $J = 20.5$) [73.34, $J_{C,F} = 24.0$]	3.86 (м) [83.91, $J_{C,F} = 4.2$]	3.69 (дт, $J = 11.6, 5.0, 5.0$), 3.75 (дт, $J = 11.9, 3.8, 4.3$) [60.4]
	8.46 (с 1H, H2) [144.37], 7.56 (дд, $^3J_{H7,F6} = 9.1, ^5J_{H7,F4} = 1.5, H, H7$) [95.84, д, $J = 28.2$], 7.13 (дт, $J = 10.5, 1.5, H, H5$) [98.24, д, $J = 29.2, 22.0$], 5.98 (м, 1H, 3'-OH), 5.18 (м, 1H, 5'-OH), [158.66 (дд, $J = 238.1, 10.8, C4$ или C6), 152.87 (дд, $J = 252.4, 15.2, C6$ или C4), 135.91 (дд, $J = 15.8, 11.1, C8$), 128.89 (д, $J = 16.6, C9$)], {237.5 (N3), 161.2 (N1)}				
29b 5,7-diF-F-Ara	6.50 (дд, $J = 12.4, 4.7$) [84.21]	5.25 (дт, $J = 52.6, 4.4, 4.4$) [95.90, $J_{C,F} = 192.0$]	4.36 (ддд, $J = 19.5, 5.7, 4.0$) [72.01, $J_{C,F} = 29.9$]	3.88 (м) [83.3]	3.65, 3.77 (м) [59.88]
	8.61 (с, 1H, H2) [144.51], 7.41 (дд, $J_{H4,F5} = 9.1, ^5J_{H4,F7} = 2.2, 1H, H4$) [101.77], 7.23 (дт, $J = 9.85, 2.2, 1H, H6$) [101.77], 5.98 (м, 1H, 3'-OH), 5.39 (м, 1H, 5'-OH), [146.40 (д, $J = 12.4, C8$), 118.42 C9]				
30a 4,5,6-triF-F- Ara	6.45 (дд, $J = 4.2, 16.0$) [84.02, $J_{C,F} = 17.4$]	5.26 (м, $J = 3.1, 3.1, 44.9$) [96.30, $J_{C,F} = 191.7$]	4.40 (м, $J = 20.8, \sim 2$) [72.73, $J_{C,F} = 24.1$]	3.86 (м) [83.49]	3.68, 3.74 (м) [59.80]
	8.53 (с, 1H, H2) [144.90], 7.82 (дд, $^3J_{H7,F6} = 9.0, ^4J_{H7,F5} = 6.5, 1H, H7$) [96.07, д, $J_{C,F} = 23.5$], 5.97 (м, 1H, 3'-OH), 5.19 (уш. т, $J \sim 4.2, 1H, 5'-OH$) [147.35 (дд, $J_{C,F} = 240.5, 11.9, C6$), 140.95 (д, $J_{C,F} = 256.4, 12.5, C4$), 135.7 (ддд, $J_{C,F} = 241.9, 18.7, 18.7 C5$), 129.16 (дд, $J_{C,F} = 12.5, 10.0, C8$), 128.3 (д, $J_{C,F} = 13.4, C9$)], {237.4 (N3), 161.3 (N1)}				
30b 5,6,7-triF-F- Ara	6.50 (дд, $J = 4.6, 12.2$) [84.08, $J_{C,F} = 17.1$]	5.28 (м, $J = 4.1, 4.1, 52.9$) [95.93, $J_{C,F} = 192.1$]	4.36 (дт, $J = 4.5, 4.5, 19.5$) [71.91, $J_{C,F} = 23.2$]	3.89 (м) [83.23, $J_{C,F} = 5.0$]	3.67, 3.75 (м) [59.85]
	8.64 (с, 1H, H2) [144.64], 7.70 (дд, $^3J_{H4,F5} = 9.8, ^4J_{H4,F6} = 6.5, 1H, H4$) [102.7, дд, $J_{C,F} = 19.2, 2.2$], 6.00 (м, 1H, 3'-OH), 5.20 (м, 1H, 5'-OH) [146.9 (дд, $J_{C,F} = 238.6, 10.9, C5$), 138.9 (дд, $J_{C,F} = 12.3, 2.5, C9$), 118.4 (д, $J_{C,F} = 4.5, C8$)]				

НЗ-Изомер (**28b**) (4 %) был определен в реакционной смеси по данным LC/MS. Выделить НЗ-изомер из реакционной смеси в количествах, достаточных для ЯМР спектроскопии, не удалось.

Результаты экспериментальных работ, представленных в разделе, опубликованы в статье:

Chemoenzymatic Synthesis of Modified 2'-Deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl Benzimidazoles and Evaluation of Their Activity Against Herpes Simplex Virus Type 1 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. //Synthesis 2017; 49(05): 1043-1052 [160].

2.1.3 Синтез нуклеозидов бензимидазола, модифицированных по С2 положению бензимидазольного кольца

Одним из вариантов модификации структуры нуклеозидов бензимидазола является введение заместителя во второе положение имидазольного кольца. Однако синтез нуклеозидов с такой модификацией может быть ограничен структурными особенностями активного центра фермента. Такой подход может быть использован для синтеза новых модифицированных нуклеозидов бензимидазола с 2-амино заместителем, поскольку известно, что 2-аминобензимидазол является хорошим субстратом для PNP *E. coli* [130]. Использовать реакцию трансгликозилирования для синтеза нуклеозидов с 2-изопропиламино заместителем и другими объемными заместителями во 2-ом положении имидазольного кольца невозможно. Это ограничение связано с субстратной специфичностью PNP и подтверждено в отношении гетероциклических оснований пуринового ряда, имеющих объемные заместители в восьмом положении кольца [130, 162], которое соответствует второму положению бензимидазола. Мы решили изучить возможность синтеза именно 2-амино- и 2-изопропиламино производных 5,6-замещенных бензимидазолов с целью получить фторированные аналоги единственного нуклеозида бензимидазола, введенного в настоящий момент в клиническую практику в США и проходящего последние стадии клинических испытаний в Европе - Марибавира [37, 38].

Для этих целей в ИОС УрО РАН (г. Екатеринбург), был получен 2-амино-5,6-дифторбензимидазол (**37**) и его метоксианалог - 2-амино-5-фтор-6-метоксибензимидазол (**38**) (Рисунок 28). Основания (**37**) и (**38**) были получены конденсацией соответствующих *орто*-фенилендиаминов (**35**) и (**36**) с бромцианом. Реакция проходила в ацетонитриле при комнатной температуре без нагревания реакционной смеси. На втором этапе к отфильтрованному и суспендированному в воде осадку добавляли водный раствор карбоната натрия. В предложенном способе не образовывалось побочных продуктов по нитрильной группе. Выход 2-амино-5,6-дифтор-бензимидазола (**37**) составил 70 %, выход 2-амино-5-метокси-6-дифтор-бензимидазола (**38**) - 78 %.

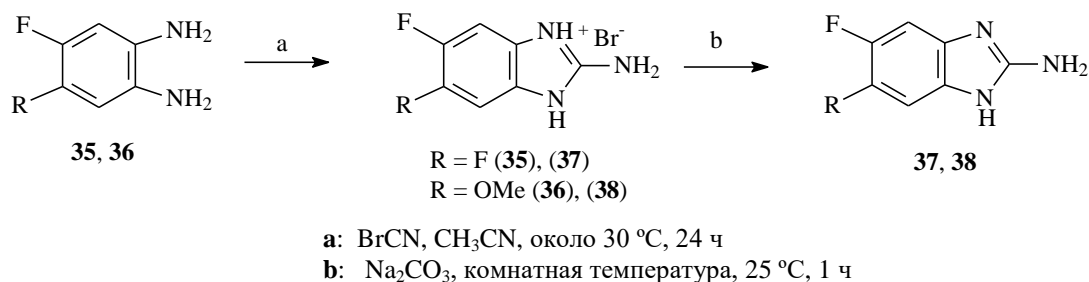


Рисунок 28 – Схема химического синтеза модифицированных оснований (**37**) и (**38**)

Кроме того для определения субстратной специфичности PNP в ИОС УрО РАН был синтезирован еще один 2-замещенный аналог бензимидазола - 2-метансульфонил-5,6-дифторбензимидазол (**42**) (Рисунок 29).

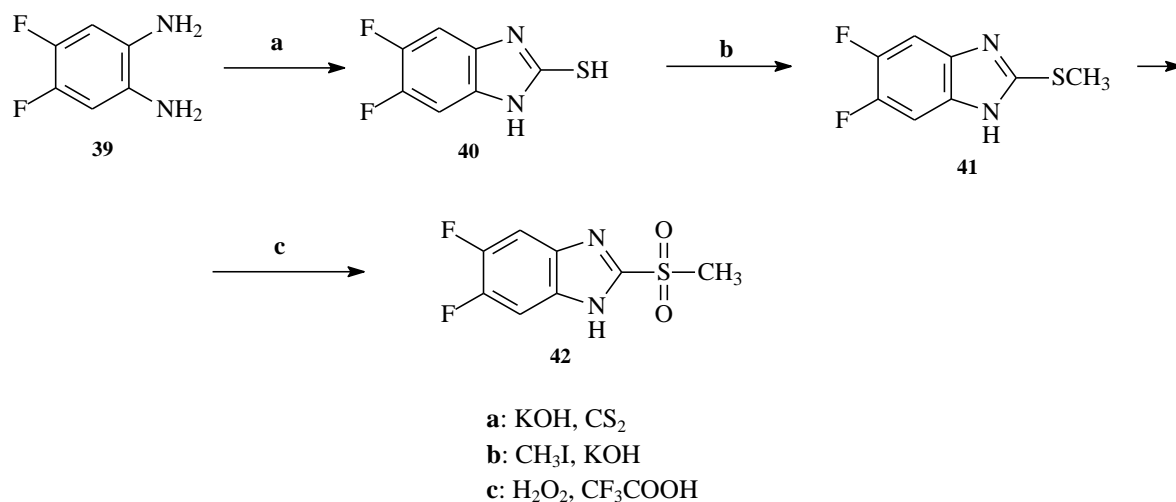


Рисунок 29 – Схема химического синтеза модифицированного основания (**42**)

На первом этапе к раствору *орто*-фенилендиамина (**39**) добавили сероуглерод и KOH в этаноле. Реакционную массу нагревали при кипении, затем при охлаждении добавили уксусную кислоту и выпавший осадок 2-мерkapто-5,6-дифторбензимидазола (**40**) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. 2-Меркапто-5,6-дифторбензимидазол (**40**) суспендировали в этаноле, при перемешивании добавляли спиртовый раствор KOH и йодистый метил, в результате чего образовался 2-метилтио-5,6-дифторбензимидазола (**41**), который использовали на следующей стадии также без дополнительной очистки. На третьей стадии к раствору 2-метилтио-5,6-дифторбензимидазола (**41**) в CF₃COOH добавили H₂O₂ при перемешивании и температуре не выше 15 °C. Выход целевого бензимидазола (**42**) составил 81 %.

Все три основания (**37**) - (**39**) были исследованы в качестве субстратов для PNP *E. coli*. Изучение субстратно-специфических свойств фермента по отношению к модифицированным бензимидазолам велось по общей методике.

Заключение о субстратной специфичности делали на основе сравнения количества гипоксантина (Нур) в контрольной и тестовой реакции, а также по появлению в тестовой реакционной смеси новых нуклеозидов. Поскольку в реакционных смесях с основаниями (**37**) и (**38**) были обнаружены новые соединения (по данным LC-MS), а скорость образования Нур в тестовых реакциях была выше, чем в контрольных (не содержащих модифицированные основания), мы сделали вывод, что эти основания являются субстратами для PNP. В тестовой реакции с основанием (**42**) не наблюдалось образования нового продукта, следовательно, основание **42** – не субстрат для PNP.

Параллельно были проведены тестовые реакции синтеза 2'-дезоксирибозидов по этой же методике с единственным отличием - в качестве источника 2'-дезоксирибозы был

использован dIno. Результаты всех тестовых реакций приведены в таблице 11. Результаты трансгликозилирования, указанные в таблице (время - 24 часа от начала реакций).

Таблица 11 – Экспериментальные данные по определению субстратной специфичности PNP по отношению к основаниям VI^{ma}

Соединение	Субстрат/не субстрат	Конверсия основания в рибозид, %	Конверсия основания в 2'-дезоксирибозид, %
37	субстрат	36.4	50.0
38	субстрат	20.5	40.0
42	не субстрат	-	-

Поскольку 2-амино-5,6-дифтор-бензимидазол (**37**) и 2-амино-5-метокси-6-дифтор-бензимидазола (**38**) оказались хорошими субстратом для PNP *E. coli*, на их основе с использованием реакции ферментативного трансгликозилирования были синтезированы новые нуклеозиды (Рисунок 30).

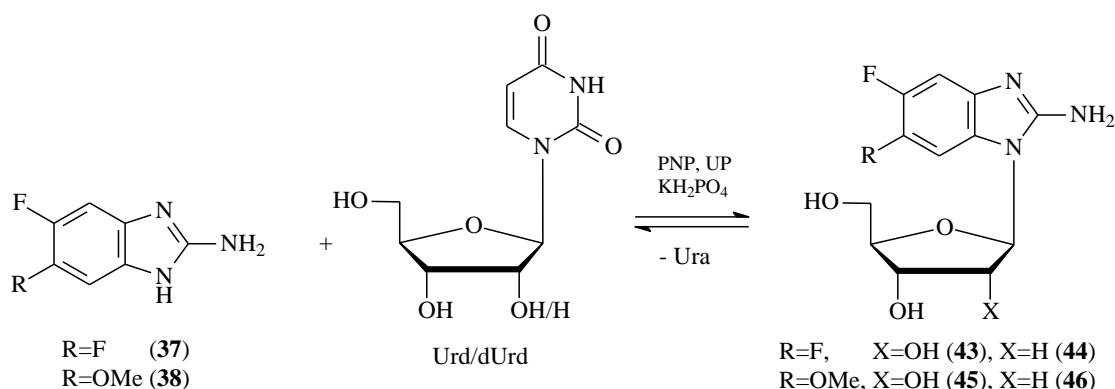
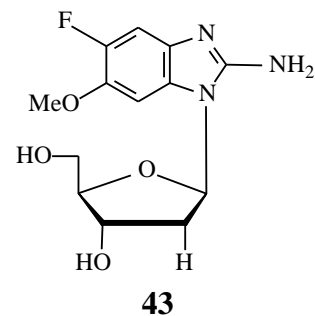
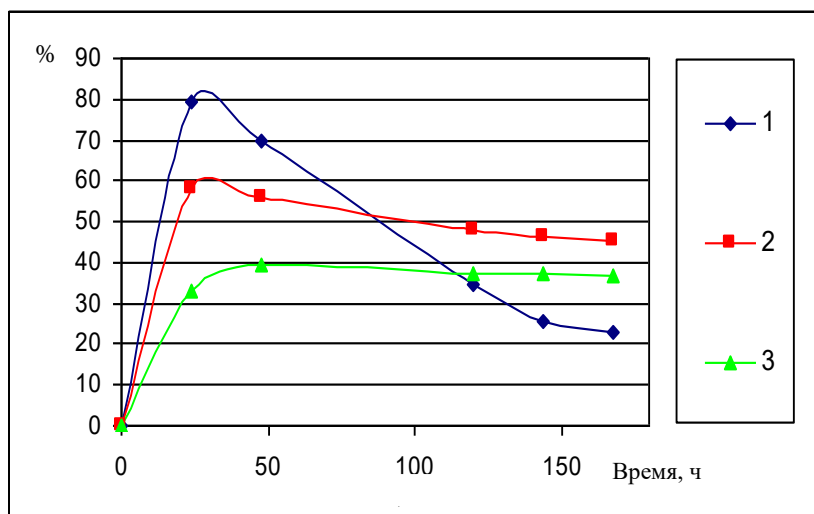


Рисунок 30 - Общая схема синтеза нуклеозидов (**43**) – (**46**)

Для того, чтобы наработать нуклеозиды (**43**) - (**46**) по стандартной методике, необходимо было оптимизировать основные условия реакции ферментативного трансгликозилирования. Все реакции по оптимизации условий проводили в KH_2PO_4 буфере при pH 7 и 50 °C. Объем реакционных смесей составлял 1 мл. Количества ферментов, добавленные в каждую тестовую реакцию указаны на подписях к рисункам 31-36.

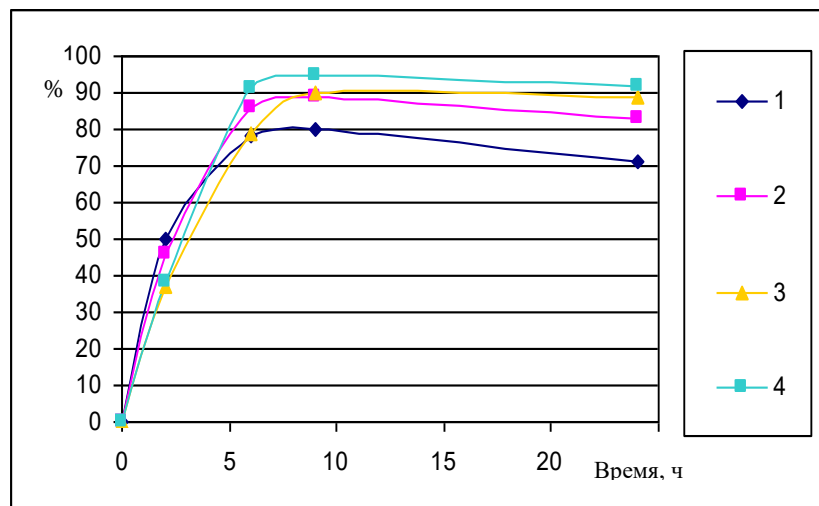
Ферментативный синтез 2-амино-5,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)-бензимидазола (**43**) был оптимизирован по следующей схеме: выбор донора рибозы (Рисунок 31), подбор соотношения исходного основания (**37**) и донора углевода (Рисунок 32), подбор оптимального количества ферментов - нуклеозидфосфорилаз (PNP и UP) (Рисунок 33). По такому же алгоритму был оптимизирован синтез (2'-дезоксирибофуранозил)бензимидазола (**44**). В результате было выяснено, что лучшим донором в реакции рибозилирования является уридин (Urd), оптимальное соотношение основания (**37**) к Urd составляло 1:5, а оптимальное количество ферментов - 2420 е.а. PNP/ммоль основания и 200 е.а. UP/ммоль Urd. В реакции

синтеза дезоксирибозид (44) лучшим донором оказался дезоксиинозин (dIno), соотношение основание/dIno составило 1:3, а количество PNP - 215 е.а./ммоль основания. На рисунках 31-33 представлены данные по оптимизации синтеза нуклеозидов на примере синтеза рибозид (43).



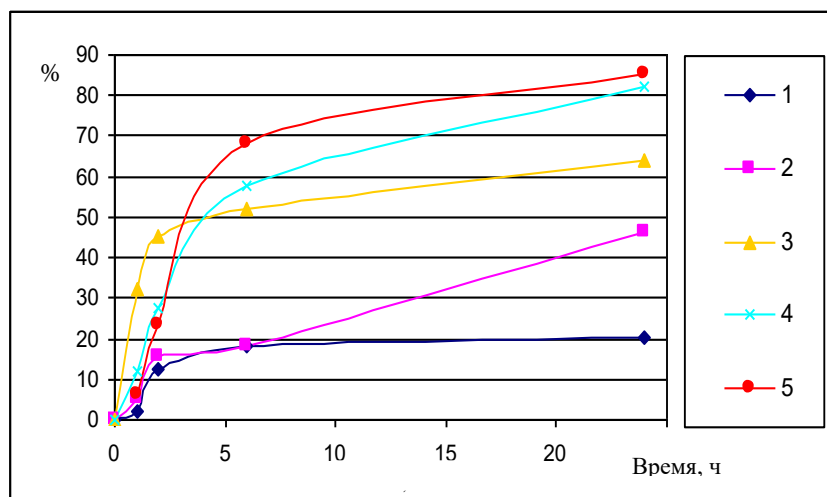
Реагенты и условия: основание (37) (2 мМ), донор остатка рибозы (4 мМ), буфер (pH 7.0, 4 мМ KН₂РO₄, 1.0 мл), 50 °С, 168 ч, рекомбинантные *E. coli* ферменты: 2900 е.а. PNP и 900 е.а. UP (только в реакции с Urd).

Рисунок 31 – Зависимость конверсии основания (37) в рибозид (43) от типа донора рибофуранозы (1-Urd, 2-Ino, 3-Guo).



Реагенты и условия: основание (37) (2 мМ), Urd (X мМ), буфер (pH 7.0; X мМ KН₂РO₄, 1.0 мл), PNP *E.coli* 3625 е.а. и 1125 е.а. UP, 50 °С, 96 ч. X = 1) 4, 2) 6, 3) 10, 4) 20 мМ

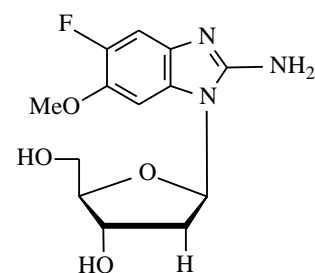
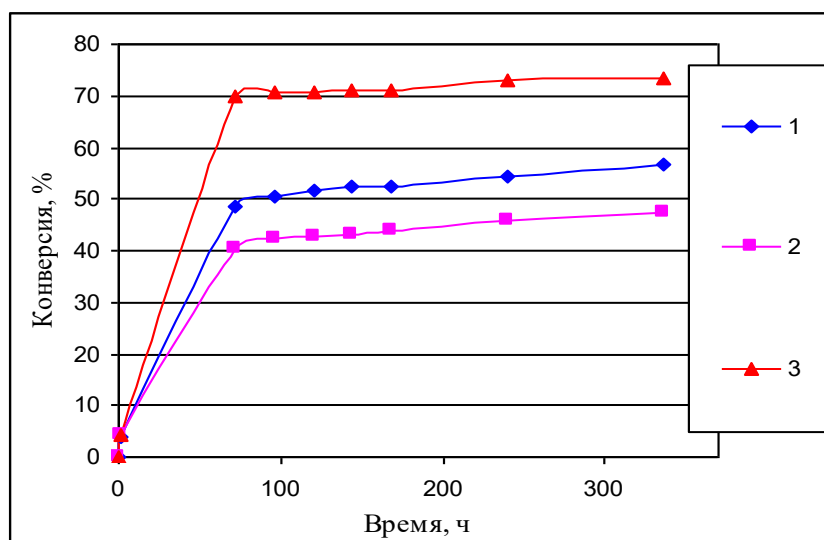
Рисунок 32 – Зависимость конверсии основания (37) в рибозид (43) от соотношения Urd/основание



Реагенты и условия: основание (37) (2 мМ), Urd (10 мМ), буфер (pH 7.0, 10 мМ KH_2PO_4 , 1 мл), X е.а. PNP *E. coli* и Y е.а. UP, 50 °С, 24 ч. X (е.а./моль основания)/ Y (е.а./ммоль Urd): 1–145/90; 2–145/450; 3–725/450; 4–1450/90, 5–2420/200.

Рисунок 33 – Зависимость конверсии основания (37) в рибозид (43) от количества NPs

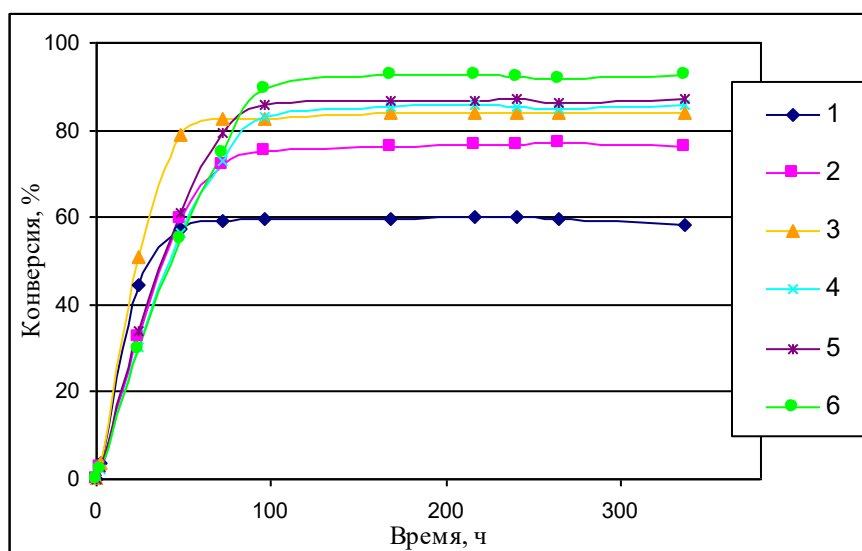
Ферментативный синтез 2-амино-5-метокси-6-фтор-1-(β-D-рибофуранозил)-бенз-имидазола (45) был оптимизирован по следующей схеме: выбор донора рибозы (Рисунок 34), подбор соотношения исходного основания (38) и донора рибозы (Рисунок 35), подбор оптимального количества ферментов - нуклеозидфосфорилаз (PNP и UP) (Рисунок 36). По такому же алгоритму был оптимизирован синтез (2'-дезоксирiboфуранозил)бензимидазола (46). Данные на рисунках 34-36 представлены на примере синтеза рибозида (45).



45

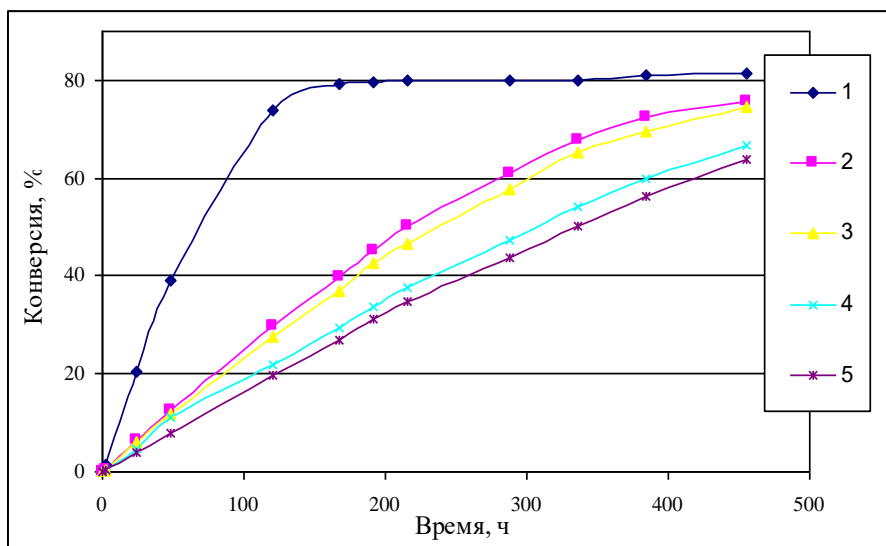
Реагенты и условия: основание (38) (2 мМ), донор рибозы (4 мМ), буфер (pH 7.0, 4 мМ KH_2PO_4 , 1.0 мл), 50 °С, 14 сут, ферменты *E. coli*: 4.35 е.а. PNP и 2.7 е.а. UP (только в реакции с Urd).

Рисунок 34 – Зависимость конверсии основания (38) в рибозид (45) от типа донора рибофуранозы (1-Ino, 2-Ado, 3-Urd)



Реагенты и условия: основание (38) (2 мМ), Urd (X мМ), буфер (pH 7.0; X мМ KH_2PO_4 , 1.0 мл), PNP *E.coli* 3625 е.а. и 1125 е.а. UP, 50 °С, 96 ч. X = 1) 1, 2) 2, 3) 3, 4) 4, 5) 5, 6) 10, 7) 20 мМ.

Рисунок 35 – Зависимость конверсии основания (38) в рибозид (45) от соотношения Urd/основание



Реагенты и условия: основание (38) (2 мМ), Urd (14 мМ), буфер (pH 7.0, 10 мМ KH_2PO_4 , 1 мл), X е.а. PNP *E. coli* и Y е.а. UP, 50 °С, 24 ч. X (е.а./моль основания)/ Y (е.а./ммоль Urd): 1–725/150; 2–145/30; 3–145/15; 4–73/30, 5–73/15.

Рисунок 36 – Зависимость конверсии основания (38) в рибозид (45) от количества NPs

Лучшим донором в реакции рибозилирования оказался уридин (Urd), оптимальное соотношение основания (38) к Urd - 1:7, а оптимальное количество ферментов - 725 е.а./ммоль основания PNP и 64 е.а./ммоль Urd UP. В реакции синтеза дезоксирибозида (46) лучшим донором оказался дезоксиуридин (dUrd), соотношение основание/dUrd составило 1:7, а количество PNP 363 е.а./ммоль основания и UP 32 е.а./ммоль dUrd.

В реакциях наработки после оптимизации условий синтеза целевой рибозид (43) был получен с конверсией 95 %. Время синтеза составило 20 часов, 2'-дезоксирiboфуранозид (44)

был получен с конверсией 50 %. Время синтеза составило 24 часа. Конверсия основания (37) в нуклеозиды (45) и (46) составила 82 и 56 %, соответственно. Реакции были проведены в калий-фосфатном буфере при pH 7 и 50 °C. Время синтеза нуклеозидов составило 8 часов для 2'-дезоксирибозид (46) и 20 дней - для рибозид (45). Реакции были проведены в калий-фосфатном буфере при pH 7 и 50 °C. Экспериментальные данные по ферментативному синтезу нуклеозидов представлены в сводной таблице 12. Реакции были остановлены добавлением этанола в момент, когда конверсия основания в нуклеозид достигала максимального значения (по данным ВЭЖХ). Растворитель удаляли в вакууме до объема 5 мл, целевые продукты выделяли с помощью обращено-фазовой колоночной хроматографии. Соединения были наработаны в количествах, достаточных для тестирования их активности и цитотоксичности *in vitro*. Выход нуклеозидов (43) и (44) составил 87 и 35 %, выход нуклеозидов (45) и (46) - 55 и 35 %, соответственно. Чистота синтезированных соединений превышала 98 %.

Таблица 12 – Экспериментальные данные синтеза β -D-нуклеозидов 2-амино-5,6-замещенных бензимидазолов (43) – (46)

Соединение, mw	Акцептор, mw	Акцептор, г (ммоль)	Донор, г (ммоль)	Соотнош. А/Д	PNP/UP, е.а. (A/B) ^a	Время, ч	Ост. акцептор (данные ВЭЖХ), %	Е ^b , %
		А	Д					
43 300.3	35 169.1	0.30 (1.77)	Urd 2.17 (8.86)	1:2.5	4280/1770 (2418/200)	20	95	30 ¹⁾
44 318.3	35 169.1	0.10 (0.6)	dIno 0.40 (1.78)	1:2	130/- (217/-)	24	50	50 ²⁾
45 313.3	36 181.2	0.05 (0.28)	Urd 0.47 (1.92)	1:7	203/123 (725/64)	480	82	50 ²⁾
46 297.3	36 181.2	0.05 (0.28)	dUrd 0.44 (1.93)	1:7	102/62 (364/32)	8	56	40 ³⁾

^a Количество PNP (A) приведено в е.а. на 1 ммоль модифицированного основания, количество UP (B) в е.а. на 1 ммоль уридина или 2'-дезоксиридина.

^b Нуклеозиды элюировали с колонки в градиенте: 1) вода - 30 % этанол (43), 2) вода - 50 % метанол (44), (45), 4) 0 – 40 % этанол (46). Е - % (объемный) спирта в воде.

Физико-химические свойства нуклеозидов представлены в таблице 13. Структура соединений охарактеризована с помощью ¹H и ¹³C ЯМР спектров, включая [¹H, ¹H] и [¹H, ¹³C]: COSY, HSQC, HMBC (Таблица 14, Приложения 24-27). В реакциях трансгликозилирования основания (37) наблюдалось образование смеси региоизомеров нуклеозидов. По данным ЯМР спектроскопии целевой продукт (45) представляет смесь N-1 и N-3-региоизомеров практически в равных количествах - 55 % по отношению к 45 %, а 2'-дезоксирибозид (46) - смесь с преобладанием N-3-региоизомера - 75 % по отношению к 25 % изомера N-1.

Таблица 13 – Физико-химические свойства нуклеозидов (43) – (46)

Соединение	Выход (%), [мг]	Чистота (%) [R _t , мин] ^a	Физическое состояние	УФ [λ _{max} , nm]	Расчет. [M+H] ⁺	MS, m/z
43	62 [87]	99.9 [R _t =15.0]	белый аморфный порошок	214, 229, 288	302.0947	302.0922 [M+H] ⁺ , 170.0522 [M-Rib+2 H] ⁺
44	35 [40]	98.8 [R _t =16.0]	белый аморфный порошок	202, 222, 284	286.1003	286.0991 [M+H] ⁺ , 170.0522 [M- dRib+2 H] ⁺
45	30 [25]	98.2 [R _t =16.4]	белый аморфный порошок	202, 228, 292	314.1152	314.113 [M+H] ⁺
46	23 [20]	99.4 [R _t =17.2]	кремовый аморфный порошок	196, 230, 292	298.1203	298.1226 [M+H] ⁺

^aПараметры ВЭЖХ приведены в разделе "Материалы и методы". Времена выхода целевых нуклеозидов, представленные в таблице 13, определены в методе элюирования (II): от 0 до 30 % В за 20 мин, скорость потока – 1 мл/мин, где В – вода-ацетонитрил, 30:70, а 0 - вода (элюент А), оба элюента содержали 0.1 % ТФУ.

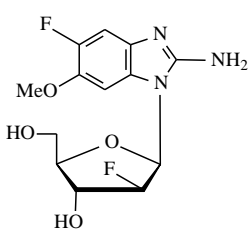
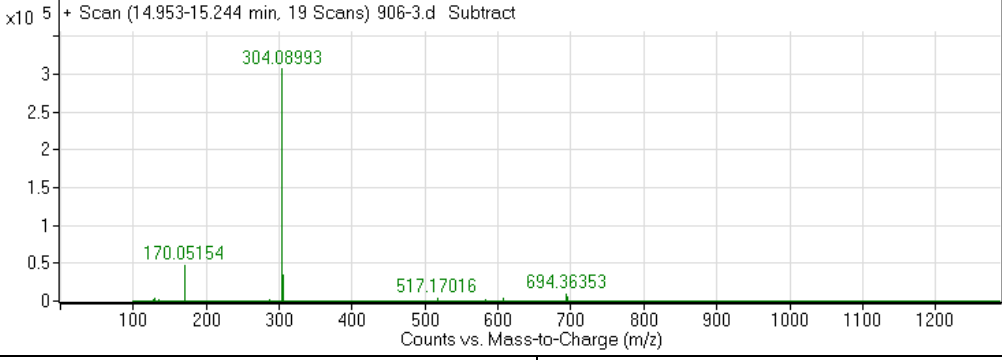
Таблица 14 - ¹H и ¹³C ЯМР спектры нуклеозидов бензимидазола (ДМСО-*d*6, δ, м.д., J, Гц)

Соединение	H-1' [C1']	H-2' [C2']	H-3' [C3']	H-4' [C4']	H-5'a/H-5'b [C5']
	Другие [¹³ C]{ ¹⁵ N}				
43	5.70 (д, J = 7.6) [88.04]	4.32 (м) [71.62]	4.09 (м) [70.41]	3.96 (м) [86.09]	3.76, 3.70 (2м) [61.56]
	7.53 (дд, J _{H4,F} = 7.6, 11.4, 1H, H4) [102.76 (д, J = 20.0, C4)], 7.10 (дд, J = 7.4, 11.4, 1H, H7) [98.88 (д, J = 24.0, C7)], 6.64 (уш. с, 2H, NH ₂), 5.46 (т, J = 4.6, 1H, 5'-OH), 5.19 (д, J = 3.1, 1H, 2'-OH), 5.18 (уш. с, 1H, 3'-OH), [156.32 (с, C2), 146.1 (дд, J = 235.0, 15.4, C5), 144.15 (дд, J = 231.6, 15.4, C6), 139.11 (д, J = 11.7, C9), 128.99 (д, J = 11.0, C8)], {309.7 (NH ₂), 194.9 (N3), 132.12 (N1)}				
44	6.19 (дд, J = 6.3, 8.7) [83.77]	2.41 (ддд, J = 7.3, 8.4, 13.3), 2.04 (ддд, J = 1.3, 5.8, 13.2) [37.90]	4.41 (м) [70.09]	3.82 (м) [86.75]	3.69 (2м) [60.72]
	7.56 (дд, J = 7.5, 11.3, 1H, H4), 7.09 (дд, J = 7.5, 11.3, 1H, H7), 6.67 (с, 2H, NH ₂), 5.33 (т, 1H, 5'-OH) перекрыт с сигналом 5.30 (д, 1H, 2'-OH) [155.40 (с, C2), 145.6 (дд, J = 233.6, 14.3, C5), 143.5 (дд, J = 232.8, 14.2, C6), 138.56 (д, J = 11.1, C9), 127.74 (д, J = 11.4, C8), 102.23 (д, J = 20.0, C4), 98.40 (д, J = 24.1, C7)], {194.6 (N3), 135.1 (N1), 60.1 (NH ₂)}				
45a 55 %	5.72 (д, J = 7.6) [87.35]	4.36 (дд, J = 5.9, 7.4) [70.99]	4.11 (дд, J = 2.3, 5.7) [69.85]	3.95 (м) [85.29]	3.68 и 3.70 (2м) [60.99]
	7.29 (д, J = 7.8, 1H, H7), 6.95 (д, J = 11.8, 1H, H4), 6.38 (уш. с., 2H, NH ₂), 5.1-5.5 (уш. сигн., 3H, OH рибозы), 3.79 (с, 3H, OCH ₃), [154.46 (с, C2), 148.08 (д, J = 233.0, C5), 140.51 (д, J = 13.1, C6), 135.5 (д, J = 10.5, C9), 128.8 (с, C8), 102.0 (д, J = 21.4, C4), 96.4 (с, C7)], {307.93 (NH ₂), 194.7 (N3), 131.80 (N1)}				
45b 45 %	5.65 (д, J = 7.5) [87.42]	4.31 (дд, J = 5.8, 7.3) [71.03]	4.08 (дд, J = 2.5, 5.8) [69.79]	3.93 (м) [85.19]	3.68 и 3.66 (2м) [60.99]
	7.33 (д, J = 11.8, 1H, H7), 6.91 (д, J = 7.9, 1H, H4), 6.41 (уш. с., 2H, NH ₂), 5.1-5.5 (уш. сигн., 3H, OH рибозы), 3.789 (с, 3H, OCH ₃), [154.71 (с, C2), 146.36 (д, J = 232.0, C6), 142.35 (д, J = 12.4, C5), 138.51 (с, C9), 125.68 (д, J = 12.9, C8), 100.61 (с, C4), 97.8 (д, J = 25.84, C7)], {308.09 (NH ₂), 195.32 (N3), 130.90 (N1)}				

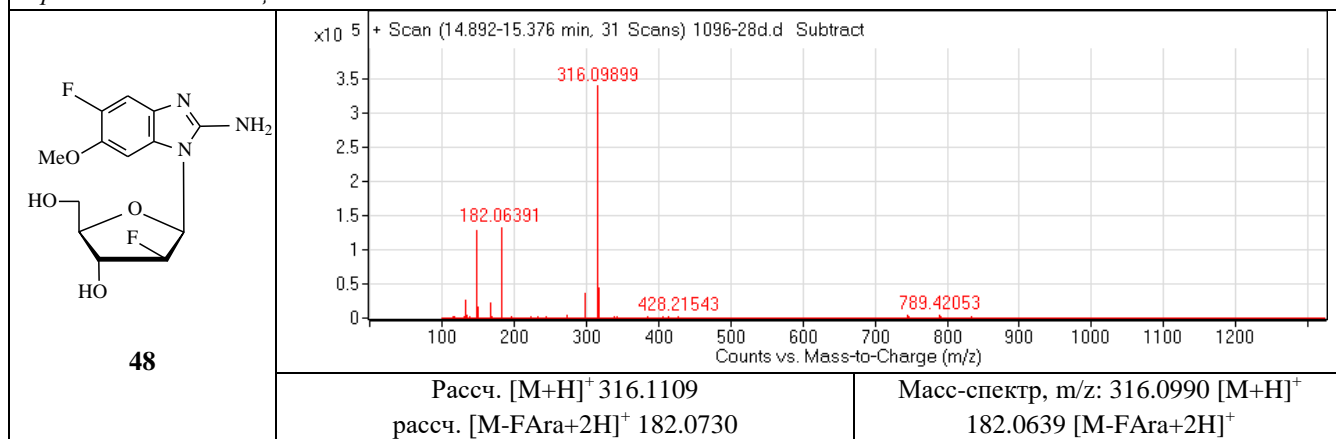
Соединение	H-1' [C1']	H-2' [C2']	H-3' [C3']	H-4' [C4']	H-5'a/H-5'b [C5']
	Другие [¹³ C]{ ¹⁵ N}				
46a 25 %	6.14 (дд, $J = 6.1$, 8.8) [83.63]	2.42 (ддд, $J = 7.0, 8.8, 13.2$), 2.01 (ддд, $J = 2.2, 6.1, 13.2$) [37.84]	4.39 (м) [70.11]	3.796 (м) [86.52]	3.68 (м) [60.79]
	7.34 (д, $J = 11.7$, 1H, H7), 6.90 (д, $J = 7.8$, 1H, H4), 6.44 (с, 2H, NH ₂), 5.30 - 5.28 (2м, 2H, OH _{3'} и OH _{5'}), 3.78 (с, 3H, OCH ₃), [154.43 (с, C2), 146.34 (д, $J = 232.6$, C6), 142.38 (д, $J = 12.8$, C5), 138.58 (с, C9), 125.0 (д, $J = 11.5$, C8), 100.66 (с, C4), 97.88 (д, $J = 25.6$, C7)], {308.0 (NH ₂), 195.3 (N3), 134.4 (N1)}				
46b 75 %	6.21 (дд, $J = 6.1$, 8.8) [83.63]	2.46 (ддд, $J = 7.0, 8.8, 13.27$), 2.03 (ддд, $J = 2.2, 6.1, >10.5$) [37.84]	4.43 (м) [70.135]	3.817 (м) [86.61]	3.70 (м) [60.70]
	7.29 (д, $J = 7.9$, 1H, H7), 6.95 (д, $J = 11.9$, 1H, H4), 6.41 (с, 2H, NH ₂), 5.32 (м, 2H, OH _{3'} и OH _{5'}), 3.795 (с, 3H, OCH ₃), [154.17 (с, C2), 148.07 (д, $J = 232.6$, C5), 140.54 (д, $J = 11.8$, C6), 135.5 (д, $J = 11$, C9), 128.16 (с, C8), 102.07 (д, $J = 20.07$, C4), 96.43 (с, C7)], {307.9 (NH ₂), 194.7 (N3), 135.0 (N1)}				

Арабинозиды 5,6-дифторбензимидазола (**37**) и 5-фтор-6-метоксибензимидазола (**38**) с помощью реакции ферментативного трансгликозилирования синтезировать не удалось. Реакции с 1-фосфат-2-дезоксид-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 (**47**) и (**48**) было подтверждено данными LC-MS (Таблица 15).

Таблица 15 - Результаты хромато-масс-спектрометрии для нуклеозидов (**47**) и (**48**)

 <p>47</p>		
	<p>Рассч. $[M+H]^+$ 304.0909</p> <p>рассч. $[M-FAr+2H]^+$ 170.1401</p>	<p>Масс-спектр, m/z: 304.0899 $[M+H]^+$</p> <p>170.0515 $[M-FAr+H]^+$</p>

Продолжение Таблицы 15



На основе синтезированного 5,6-дифтор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазола (**43**) мы решили синтезировать 5,6-дифтор-аналог марибавира - 2-изопропиламино-5,6-дифтор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (**49**). Для того, чтобы синтезировать нуклеозид (**49**) с использованием изопропилбромид, прежде всего нам необходимо было проверить возможность алкилирования 2-аминогруппы VI изопропилбромидом на более простой модели. В качестве модели мы выбрали 2-амино-1*H*-бензимидазол (**50**), в качестве основания - диизопропилэтиламин (DIEA), и в качестве растворителя - DMF (Рисунок 37). Реакцию проводили при 100 °С.

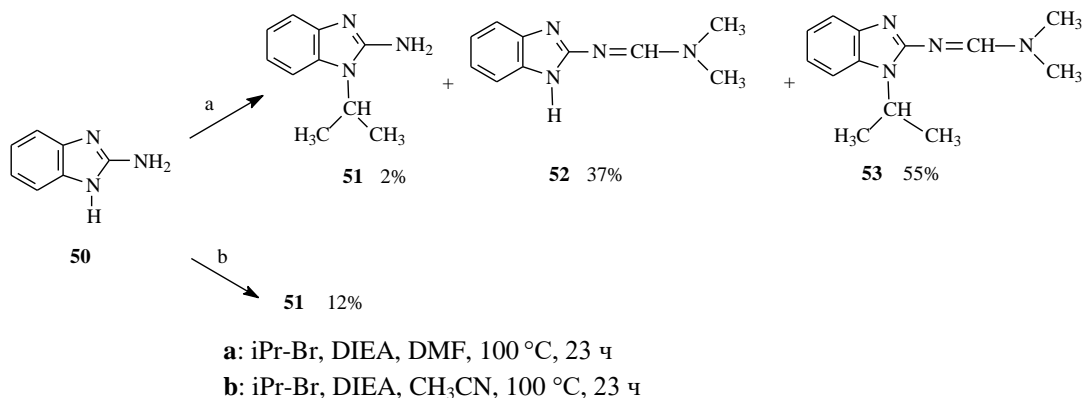


Рисунок 37 - Конверсия 2-амино-1*H*-бензимидазола (**50**) в целевой и побочные продукты в реакции с изопропилбромидом в DMF

Через 23 ч реакционная смесь содержала (по данным LC-MS) кроме исходного основания три соединения: 2 % соединения (**51**), 37 % соединения (**52**), и 55 % соединения (**53**). Два продукта реакции (**52**) и (**53**) были выделены из смеси колоночной хроматографией с выходом 7 и 38 %, соответственно, и охарактеризованы с помощью LC-MS и ЯМР-спектроскопии. Наличие в смеси соединения (**51**) было подтверждено данными LC-MS. Интересно, что конверсия продукта (**51**) составлял 30 % через 3 часа от начала реакции, но со временем он переходил в амидин (**53**). Мы сделали выводы, что DMF не может быть

использован в качестве растворителя при алкилировании 2-амино-1*H*-бензимидазола в выбранных условиях. Без изопропилбромид в реакционной смеси не происходило образования оснований (**51**) - (**53**). Вероятный механизм формирования N,N-диметилформамидинов (**52**) и (**53**) показан на рисунке 38.

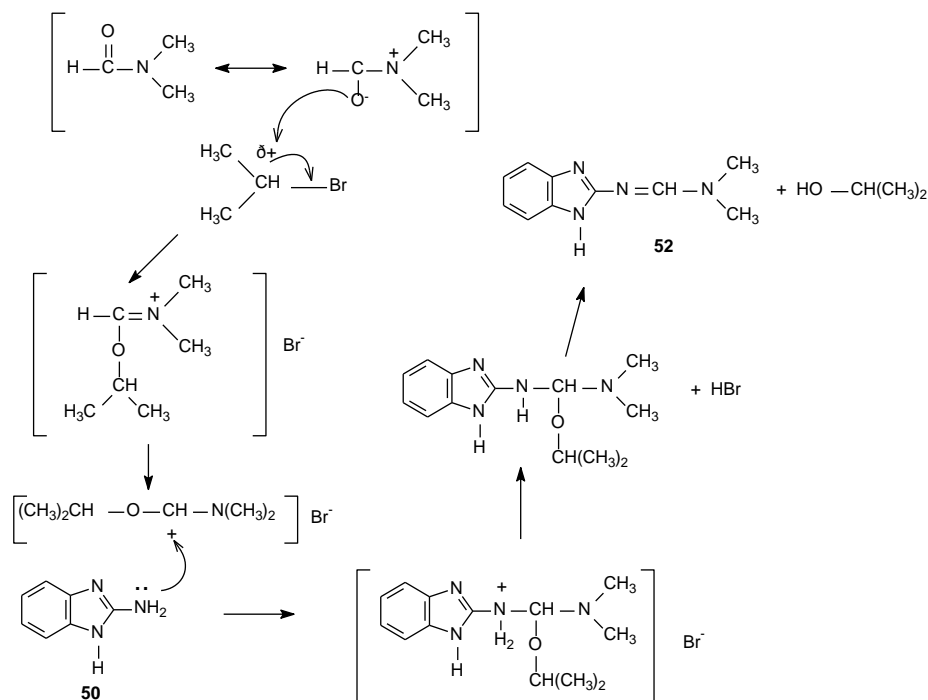
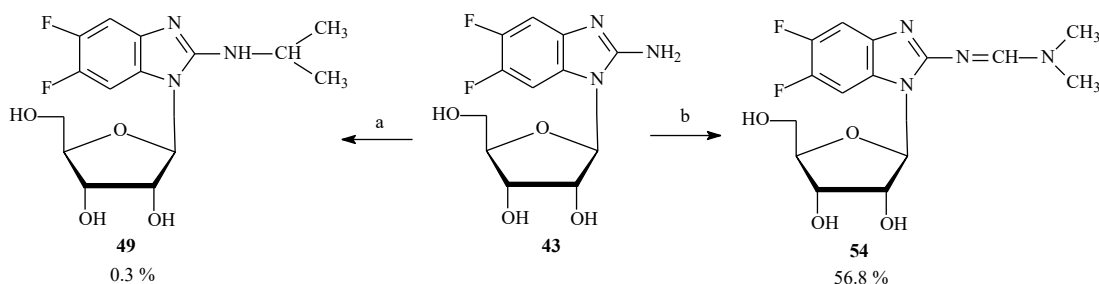


Рисунок 38 - Возможный механизм образования N,N-диметилформамидина (**52**) из DMF и 2-амино-1*H*-бензимидазола (**50**)

Известно, что использование DMF в качестве растворителя в реакциях, которые проводятся при высокой температуре долгое время в присутствии аминов ограничено из-за образования высоко реакционно-способных иминовых комплексов [163]. При замене DMF на ацетонитрил и прежней температуре реакции (100 °C), конверсия целевого 1-изопропил-2-амино-1*H*-бензимидазола (**51**) составляла уже 12 %. Именно такие условия были использованы для синтеза рибозида 2-изопропиламино-5,6-дифторбензимидазола (**49**) (Рисунок 39). Однако, только 0.3 % нуклеозида (**49**) было получено в таких условиях. При проведении реакции в DMF был получен нуклеозид (**54**) с конверсией 56.8 %.



a: iPr-Br, DIEA, CH₃CN, 100 °C, 12 ч.

b: iPr-Br, DIEA, DMF, 100 °C, 12 ч.

Рисунок 39 - Конверсия нуклеозида (**43**) в 2-замещенные рибозиды (**49**) и (**54**)

Мы пробовали использовать 1,5-диазабисцикло[5.4.0]ундец-5-ен (DBU) вместо DIEA для синтеза нуклеозида (**49**). Температура в 60 °С оказалась недостаточной для протекания реакции, однако увеличение температуры до 100 °С приводило к разрыву гликозидной связи.

Можно сделать выводы, что несмотря на смену растворителя и основания, такой подход непригоден для синтеза рибозида 2-изопропиламино-5,6-дифторбензимидазола, однако возможно его использование для получения нуклеозида (**54**), который может обладать интересными противовирусными свойствами.

По результатам исследований опубликована работа:

New modified 2-aminobenzimidazole nucleosides: Synthesis and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1. M.I. Kharitonova, A.O. Denisova, V.L. Andronova, A.L. Kayushin, I.D. Konstantinova, S.K. Kotovskaya, G.A. Galegov, V.N. Charushin, A.I. Miroshnikov // *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 2017, 27 (11), p. 2484-2487 [164].

2.2 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*, благодаря широкой субстратной специфичности, способна воспринимать в качестве субстрата гликозилирования различные структурные аналоги пуринового основания (**55**), в том числе 8-аза-7-дезаза-пурины (**56**) [101-104, 130, 139, 165, 166], а также замещенные бензимидазолы (**57**) [40, 59, 74, 143]. (Рисунок 40). Незамещенный бензимидазол (**58**) и 2-аминобензимидазол (**50**) являются очень хорошими субстратами для PNP со степенью конверсии в рибозиды 80 и 70 % соответственно [59].

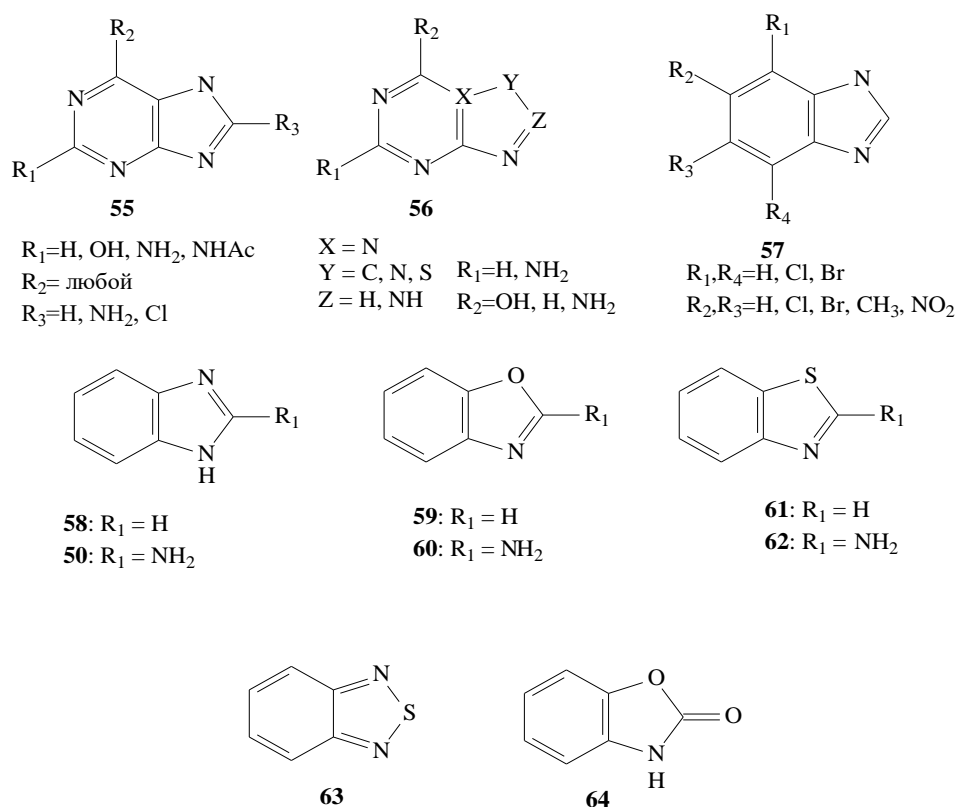


Рисунок 40 – Основания, перспективные в качестве субстратов для PNP

Мы решили исследовать возможность образования нуклеозидов в активном центре PNP, когда в качестве субстрата используются основания, содержащие в кольце один или два атома азота, а также один или два дополнительных гетероатома (сера, кислород) (**59**) – (**64**), и их производные (**60**), (**62**) с 2-аминогруппой во втором положении пятичленного кольца (Рисунок 34). Основания (**50**), (**58**) – (**64**) были получены из коммерческих источников, их чистота оказалась достаточной для проведения экспериментов. Физико-химические свойства исходных оснований приведены в таблице 16.

Изучение субстратно-специфических свойств PNP в реакции гликозилирования (схема представлена на рисунке 41) осуществлялось по общей методике. В качестве источника рибозы

для синтеза рибонуклеозидов были использованы инозин (Ino) или уридин (Urd), в качестве источника 2'-дезоксирибозы – дезоксиуридин (dUrd) или тимидин (Thd).

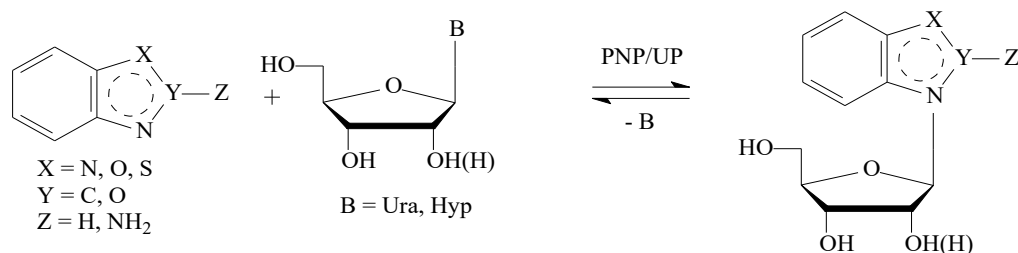


Рисунок 41 – Схема реакции гликозилирования гомологов бензимидазола

Таблица 16 – Физико-химические свойства оснований (59) – (65)

Соединение	Т.пл. (°C), физическое состояние	Чистота (%) [R_f , мин] ^a	Соединение	Т.пл. (°C), физическое состояние	Чистота (%) [R_f , мин] ^b
 (58)	169-171 Белый кристаллический порошок	98.0 [R_f = 5.1]	 (61)	2 Темная жидкость	96.0 [R_f = 11.8]
 (50)	226-230 Белый кристаллический порошок	97.0 [R_f = 5.6]	 (62)	126-129 Белый кристаллический порошок	97.0 [R_f = 6.7]
 (59)	27-30 Желто-оранжевая твердая масса	98.0 [R_f = 10.1]	 (63)	42- 44 Белый кристаллический порошок	98.0 [R_f = 12.1]
 (60)	128-133 Белый кристаллический порошок	97.0 [R_f = 5.6]	 (64)	137-139 Бежевый порошок	98.0 [R_f = 8.4]

^a Параметры ВЭЖХ приведены в разделе "Материалы и методы". Метод элюирования (I): от 0 до 70 % В за 20 мин, скорость потока – 1 мл/мин, элюент А – вода:0.1 % TFA, элюент В - вода-ацетонитрил-TFA, 30:70:0.1 %.

Параллельно были поставлены контрольные реакции - синтеза рибо- (65) и 2'-дезоксирибонуклеозидов бензимидазола (66) и 2-амино аналогов (67) и (68) (Рисунок 42). Тестовые реакции с «нетипичными» основаниями (59) – (64) и контрольные реакции проводились в одинаковых условиях. Реакции проводились при pH 7 при 50 °C в калий-фосфатном буфере с добавлением ферментов: только PNP (в реакции с Ino), PNP и тимидинфосфорилазы (TP) в реакции с Thd, PNP и уридинфосфорилазы (UP) в реакциях с Urd (dUrd).

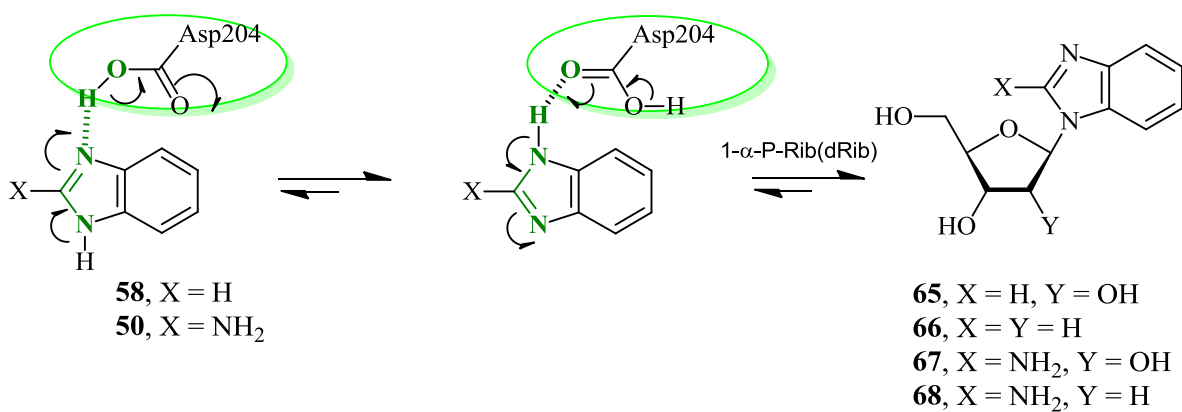
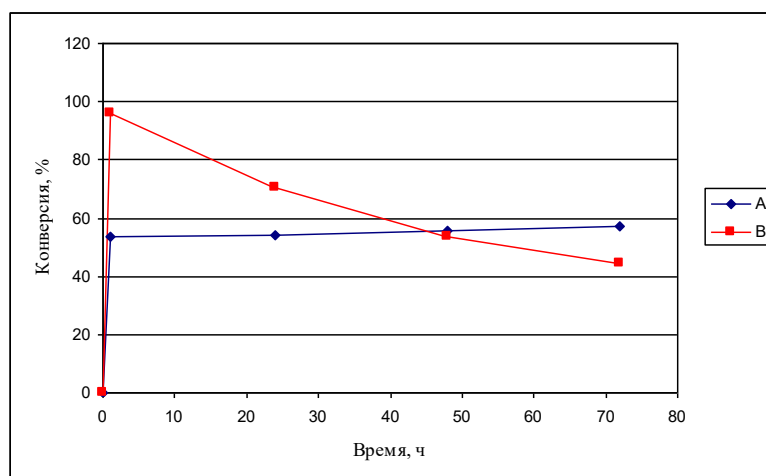
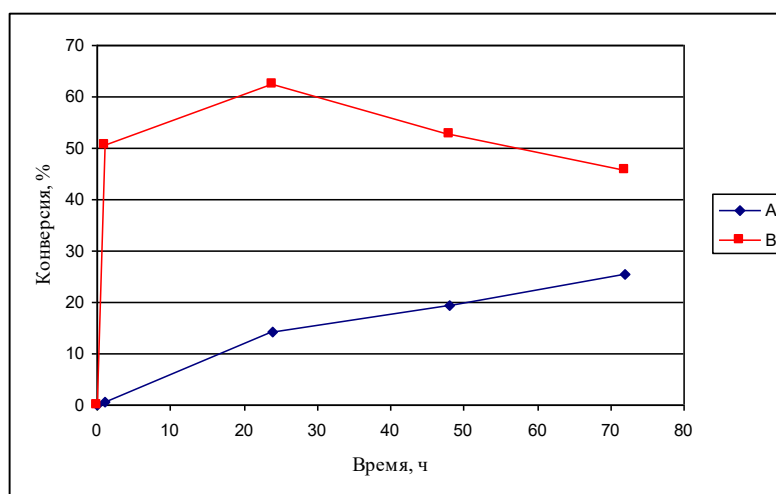


Рисунок 42 – Возможная схема взаимодействия бензимидазола (**58**) и 2-амино-бензимидазола (**50**) с активным центром PNP и образования нуклеозидов (**58**) и (**50**)

В контрольных реакциях наблюдалось (по данным LC-MS) образование продуктов (**65**) – (**68**) (Рисунок 43ab, Таблица 17).



а



б

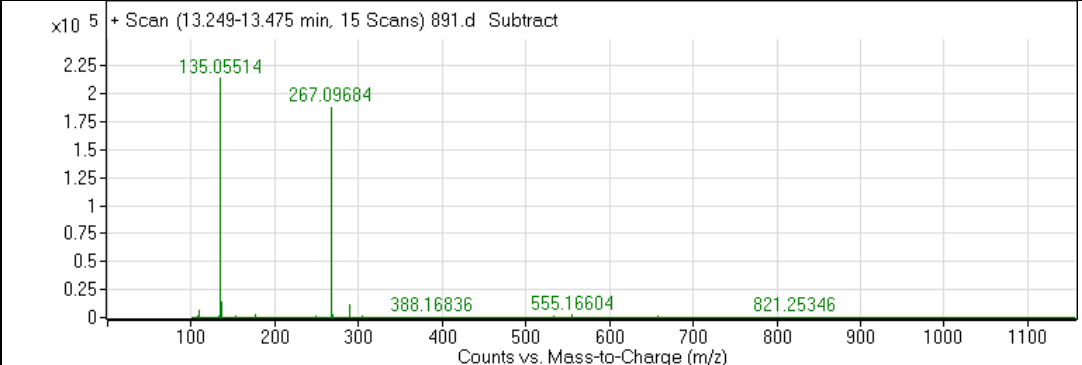
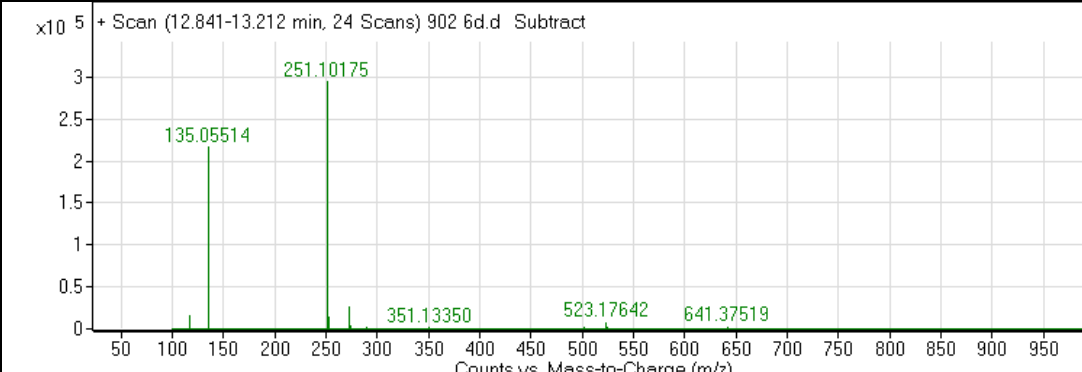
Рисунок 43 – (а) Конверсия бензимидазола (**58**) в нуклеозиды (**65**) - линия 1, и (**66**) - линия 2; (б) конверсия 2-аминобензимидазола (**50**) в нуклеозиды (**67**) - линия 1, и (**68**) - линия 2

Таблица 17 - Данные LC-MS для нуклеозидов (**65**) - (**68**), полученных в контрольных реакциях

Соединение	Расчет. $[M+H]^+$	MS, m/z
65	251.1032	251.0998 $[M+H]^+$ 119.0595 $[M-Rib+2H]^+$
66	235.1074	235.1074 $[M+H]^+$ 119.0595 $[M-dRib+2H]^+$
67	266.1141	266.0716 $[M+H]^+$ 134.0502 $[M-Rib+2H]^+$
68	250.1192	250.1180 $[M+H]^+$ 134.0502 $[M-Rib+2H]^+$

Оказалось, что бензоксазол (**59**) и бензотиазол (**61**) не субстраты для PNP. В реакциях с основаниями (**63**) и (**64**) также не было обнаружено продуктов по данным ВЭЖХ и LC-MS. При длительной экспозиции бензоксазол (**59**) разрушался в водной среде с образованием *о*-аминофенола даже без добавления в реакцию PNP. И только в реакции с 2-амино-1,3-бензоксазолом (**60**) были получены нуклеозиды (Таблица 18). При этом, в реакции с 2-амино-1,3-бензотиазолом (**62**) продуктов обнаружено не было. Следовательно, для синтеза нуклеозидов мы использовали только одно основание - 2-амино-1,3-бензоксазол (**60**).

Таблица 18 - Результаты LC-MS для рибозида (**69**) и 2'-дезоксирибозида (**70**) 2-амино-1,3-бензоксазола

69		
	Расчет. $[M+H]^+$ 267.09810 135.05510 $[M-Rib+2H]^+$	MS, m/z: 267.09684 $[M+H]^+$ 135.05514 $[M-Rib+2H]^+$
70		
	Расчет. $[M+H]^+$ 251.1001 135.0540 $[M-dRib+2H]^+$	Масс-спектр, m/z: 251.10175 $[M+H]^+$ 135.0551 $[M-dRib+2H]^+$

После оптимизации условий синтеза в реакциях наработки конверсия 2-амино-1,3-бензоксазола (**60**) в рибозид (**69**) составила 27 % за 31 дней, в 2'-дезоксирибозид (**70**) – 11 % за такое же время (Рисунок 44).

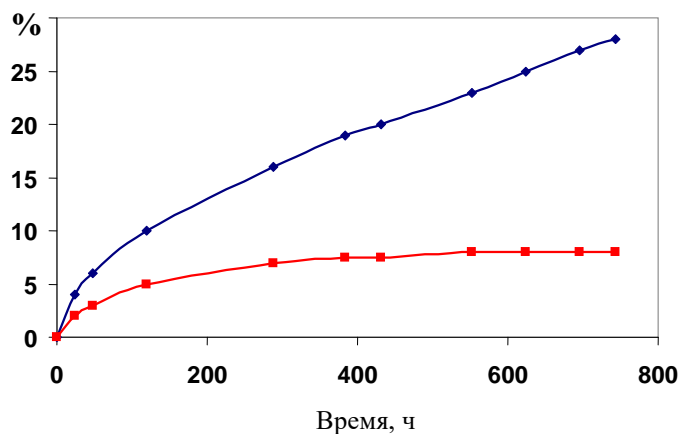


Рисунок 44 – Конверсия 2-амино-1,3-бензоксазола (**60**) в рибозид – линия A и 2'-дезоксирибозид – линия B, (%)

Целевой рибозид 2-амино-1,3-бензоксазола был выделен колоночной обращенно-фазовой хроматографией и охарактеризован с помощью ЯМР спектроскопии. Наше удивление было велико, когда мы идентифицировали основной продукт: образование гликозидной связи произошло через 2-амино-группу и вместо искомого рибофуранозида 2-аминобензоксазола (**69**) образовалось пиранозное производное (**71**). В случае синтеза 2'-дезоксирибозида 2-амино-1,3-бензоксазола наблюдалась аналогичная ситуация (Рисунок 45).

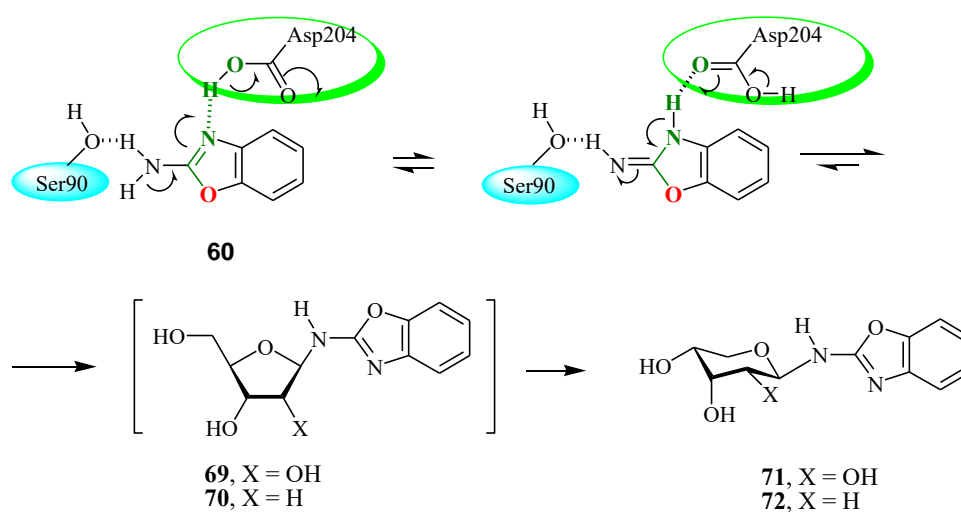


Рисунок 45 – Возможный механизм образования водородных связей между 2-амино-1,3-бензоксазолом (**60**) и аминокислотами активного центра фермента *E. coli*, приводящий к образованию продуктов гликозилирования (**71**) и (**72**)

По литературным данным известно, что рибофуранозные производные по ароматической аминогруппе нестабильны в водных растворах и быстро перегруппировываются в соответствующие пиранозиды. Этот эффект описали Монтгомери и МакКормак при синтезе модифицированных пуриновых нуклеозидов в подобных нашим условиях [167, 168]. По всей вероятности мы наблюдали аналогичный процесс. Причем, похоже, что скорость перегруппировки фуранозидов в пиранозиды (**71**) и (**72**) была настолько высока, что мы не смогли идентифицировать в реакционной среде искомые фуранозиды (**69**) и (**70**). В результате мы выделили именно пиранозиды (**71**) и (**72**), они были получены с выходами 25 и 8 % и чистотой 93 и 94 %.

В результате, мы вынуждены были констатировать, что наличие второго атома азота в гетероциклической системе (как в бензимидазольном или пуриновом кольце) является необходимым и жестким требованием к структуре модифицированного основания для того, чтобы оно являлось субстратом для активного центра PNP *E. coli*.

Результаты исследований опубликованы в работе:

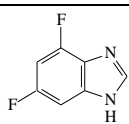
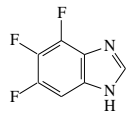
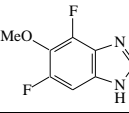
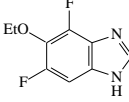
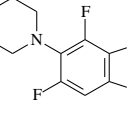

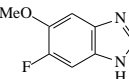
Recognition of Artificial Nucleobases by *E. coli* Purine Nucleoside Phosphorylase versus its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base-Modified Nucleosides. Fateev I.V., Kharitonova M.I., Antonov K.V., Konstantinova I.D., Stepanenko V.N., Esipov R.S., Seela F., Temburnikar K.W., Seley-Radtke K.L., Stepchenko V.A., Sokolov Y.A., Miroshnikov A.I., Mikhailopulo I.A. // *Chem. Eur. J.*, 2015. V. 21, pp. 13401–13419 [169].

2.3 Определение активности *in vitro* синтезированных нуклеозидов бензимидазола

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

Для первичной оценки противовирусной активности и цитотоксичности нуклеозидов **8-**(**19**) и (**27**) – (**30**) в отношении вируса простого герпеса 1-го типа эталонного штамма L₂ (HSV-1/L₂) использовали культуру клеток Vero E6. Максимальная исследованная концентрация нуклеозидов составляла 1000 мкг/мл (Таблица 19).

Таблица 19 - Результаты двух независимых опытов по определению противовирусной активности и цитотоксичности нуклеозидов (**8**) – (**19**) и (**27**) – (**30**) на модели вируса HSV-1/L₂ в культуре клеток Vero E6

Основание	Нуклеозид, <i>Pfr</i>	МПК ^a	ЦД ₅₀ ^b , мкг/мл	ИД ₅₀ ^c , мкг/мл		ИД ₉₅ , мкг/мл		ХТИ ^d	
				м. и., БОЕ/мл ^f					
				0.1	0.01	0.1	0.01	0.1	0.01
	Ribavirin	>500	>500	250	125	>500	500	>2	>4
	(8), <i>Rib</i>	500	735±10	>500	500	>500	>500	0	1.5
	(9), <i>dRib</i>	500	707.5±2.5	>500	>500	>500	>500	0	0
	(29), <i>FAra</i>	>1000	>1000	500	125	1000	500	>2	>8
	(10), <i>Rib</i>	125	542.5±52.5	250	62.5	>500	500	2	9
	(11), <i>dRib</i>	>500	662.5±17.5	>500	>500	>500	>500	0	0
	(30), <i>FAra</i>	500	763.23±10.29	250	125	500	500	3	6
	(12), <i>Rib</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0	0
	(13), <i>dRib</i>	500	745±5	500	187.5	>1000	1000	1.5	4
	(28), <i>FAra</i>	125	487.5±2.5	>500	>500	>500	>500	0	0
	(14), <i>Rib</i>	500	727.5±12.5	>500	375	>500	>500	0	2
	(15), <i>dRib</i>	500	742.5±27.5	>500	500	>500	>500	0	1.5
	(16), <i>Rib</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0	0
	(17), <i>dRib</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0	0
	(18), <i>Rib</i>	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	0	0
	(19), <i>dRib</i>	250	512.5±12.5	500	250	>500	500	1	2
	(27), <i>FAra</i>	125	245±5	125	31.2	>250	250	2	8

^a МПК – максимально переносимая концентрация соединения, в присутствии которой не наблюдается видимых под микроскопом изменений клеточного монослоя;

^b ЦД₅₀ - концентрация соединения, вызывающая гибель 50 % клеток;

^c ИД₅₀ и ИД₉₅ - концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта на 50% и практически полностью;

^d ХТИ – химиотерапевтический индекс (ХТИ=ЦД₅₀/ИД₅₀);

^f м. и. - множественность инфицирования, БОЕ - бляшкообразующая единица;

«>» - эффект не достигается при использовании соединения в максимальной исследованной концентрации.

Соединения (**12**), (**16**) – (**18**) и (**29**) не обладали цитотоксичностью, остальные соединения проявляли цитотоксичность в предложенных условиях, на что указывало

увеличение количества мертвых клеток в экспериментальной системе по сравнению с контрольной клеточной культурой. Минимальной токсичностью обладали нуклеозиды (30), (13) - (15), а максимальной - 2'-фторарабинозиды (27) и (28).

При изучении противовирусной активности соединений были получены следующие результаты: соединения (12), (16) - (18) не проявляли антивирусного эффекта даже при использовании в максимальной исследованной концентрации. Соединения (9), (11), (28) не ингибировали развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ) в диапазоне концентраций, нетоксичных для культуры клеток. Нуклеозиды (8), (14) и (15) проявляли минимальный антивирусный эффект при низкой м. и. (0.01 БОЕ/кл). Соединение (19) проявляло минимальную активность в субтоксических концентрациях 250 - 500 мкг/мл (при м.и. 0.01 и 0.1 БОЕ/кл, соответственно) (Таблица 19). Антивирусный эффект 4-метокси-5,6-дифтор-1-(β-D-дезоксирибофуранозил)-бензимидазола (13) носил выраженный селективный характер, что подтверждается величинами ХТИ, равными 1.5 (при 0.1 БОЕ/мл) и 4 (при 0.01 БОЕ/мл). Более высокую активность против вируса герпеса проявил 4,5,6-трифтор-1-(β-D-2'-дезоксидеозирибофуранозил)-бензимидазол (30), (ИД₅₀ = 187.5 мкг/мл, ХТИ = 6 при м. и. 0.01). Наиболее выраженную селективную антигерпетическую активность проявили три соединения: 4,5,6-трифтор-1-(β-D-рибофуранозил)-бензимидазол (10) и два 2'-дезоксидеозирибофуранозиды (27) и (29) (Таблица 19).

Строгую корреляцию между структурой соединений и их активностью установить не удалось. Некая закономерность наблюдается только при рассмотрении нуклеозидов с объемными заместителями в 5 положении бензимидазольного кольца. Так рибо- и 2'-дезоксидеозирибонуклеозиды морфолинового производного (самый объемный заместитель) оказались абсолютно неактивны и нецитотоксичны (ХТИ = 0), так же как и рибозид 5-пирролидино-замещенный бензимидазол (18). А его 2'-дезоксидеозирибозид (19) и нуклеозиды 5-этокси-замещенного бензимидазола (14, 15) проявили минимальную активность только при использовании в субтоксичных концентрациях при низкой м. и. 0.01 БОЕ/кл (ХТИ 1,5 - 2).

В ряду 5-метокси-4,6-дифтор-производных наибольшую активность проявил 2'-дезоксидеозирибозид (13), в то время как 2'-дезоксидеозирибофуранозид (28) оказался неактивным. 2'-Дезокси-2'-фторарабинозид 5-метокси-6-фтор-бензимидазола (27) проявил достоверную селективную активность в нетоксичных концентрациях (ХТИ = 8). При этом данный нуклеозид является самым цитотоксичным соединением из двух серий нуклеозидов бензимидазола. Среди нуклеозидов ди- и три-фторированного бензимидазола активными оказались два 2'-фторарабинозиды (29), (30) и один рибозид (10). При этом у 2'-фторарабинозидов бензимидазола (29), эффект, соответствующий ЦД₅₀, не достигался даже в присутствии соединения в высокой концентрации 1000 мкг/мл (ХТИ > 8). Такой низкий

уровень цитотоксичности более характерен для нуклеозидов с природными остатками УГЛЕВОДОВ.

Таким образом, все модифицированные нуклеозиды бензимидазола серий рибо-, 2'-дезоксирибо- и 2'-дезоксид-2'-фторарабино- несмотря на введение дополнительного атома фтора в остаток углевода, показали низкую токсичность для культуры клеток Vero Е6. Пять из синтезированных нами соединений проявляли достоверную активность против HSV-1. Три из них (один рибозид и два 2'-фторарабинозида) имеют ХТИ > 8: 4,5,6-трифтор-1-(β-*D*-рибофуранозил)бензимидазол (10), 5-метокси-6-фтор-1-(β-*D*-2'-дезоксид-2'-фторарабинофуранозил)бензимидазол (27) и 4,6-дифтор-1-(β-*D*-2'-дезоксид-2'-фторарабинофуранозил)бензимидазола (29); один 2'-фторарабинозид с ХТИ = 6: 4,5,6-трифтор-1-(β-*D*-2'-дезоксид-2'-фторарабинофуранозил)бензимидазол (30) и один 2'-дезоксирибозид с ХТИ = 4: 5-метокси-4,6-фтор-1-(β-*D*-2'-дезоксидрибофуранозил)бензимидазол (13).

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

Противовирусная активность *in vitro* соединений **43** - **46** была исследована на эталонном штамме L₂ вируса простого герпеса (HSV-1/L₂) в культуре клеток Vero E6. В качестве препаратов сравнения использовали рибавирин (известный коммерческий препарат широкого спектра действия, в том числе активный в отношении HSV-1) и марибавир (ближайший структурный аналог исследуемых соединений, который обладает доказанной активностью против HCMV). Все нуклеозиды показали низкую цитотоксичность. Нуклеозиды (**45**), (**46**) оказались неактивны (ХТИ = 0). 2'-Дезоксирибозид (**44**) не проявил селективного действия (ХТИ = 2) и уступил по активности рибавирину (ХТИ > 4). Рибозид (**43**) показал значительную селективную активность в отношении HSV-1 (ХТИ > 32). В нецитотоксичной концентрации 250 мкг/мл (ИД₉₅) рибозид (**43**) практически полностью ингибировал развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ). ИД₅₀ рибозида (**43**) составила всего лишь 31.2 мкг/мл, что в 4 раза ниже ИД₅₀ рибавирина и в 8 раз ниже, чем у марибавира (Таблица 20).

Поскольку противовирусная активность рибозида (**43**) на модели эталонного штамма HSV-1 носила выраженный селективный характер и значительно превосходила активность остальных синтезированных нами соединений, он был исследован более подробно в отношении пяти штаммов HSV-1, резистентных к действию ацикловира (ACV), цидофовира (CDV) и тринатриевой соли фосфономуравьиной кислоты (PFA).

Таблица 20 - Результаты двух независимых опытов по определению цитотоксических свойств и противовирусной активности соединений (**43**) - (**46**) на модели HSV-1/L2 в культуре клеток Vero E6

Соединение	МПК, ^a мкг/мл	ЦД ₅₀ , ^b мкг/мл	ИД ₅₀ , ^c мкг/мл	ИД ₉₅ , мкг/мл	ХТИ ^d
43	> 500	> 500	15.6	250	> 32
44	> 500	> 500	250	> 500	> 2
45	> 757.6	> 757.6	> 757.6	> 757.6	0
46	> 757.6	> 757.6	> 757.6	> 757.6	0
Рибавирин	> 500	> 500	125	500	> 4
Марибавир	250	283.08±25.06	250	> 250	1

^a МПК – максимально переносимая концентрация соединения, в присутствии которой не наблюдается видимых под микроскопом изменений клеточного монослоя;

^b ЦД₅₀ - концентрация соединения, вызывающая гибель 50 % клеток;

^c ИД₅₀ и ИД₉₅ - концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта на 50 % и практически полностью;

^d ХТИ – химиотерапевтический индекс (ХТИ=ЦД₅₀/ИД₅₀).

«>» - эффект не достигается при использовании соединения в максимальной исследованной концентрации.

В таблице 21 представлены установленные аминокислотные замены в ДНК-полимеразе и тимидинкиназе (ТК) вирусов относительно эталонного штамма (HSV-1/L₂). Жирным шрифтом выделены аминокислотные замены, которые могут быть ассоциированы с изменением лекарственной чувствительности (описанные в литературе или локализованные в консервативных участках фермента) [170-174].

Таблица 21 - Аминокислотные замены в ДНК-полимеразе и ТК резистентных штаммов HSV-1 относительно эталонного штамма HSV-1/L₂.

Резистентные штаммы HSV-1	ДНК-полимераза	Тимидинкиназа
<i>HSV-1/L₂/R_{ACV}</i>	D46N, D151G, A346T, D741N, S866F, N871D, G1085E	V12A, W88R , R220H
<i>HSV-1/L₂/R_{P-ACV}/2</i>	A346Thr, D741N, N871D, G1085E, T1121A	V12A, G59R , 281-stop
<i>HSV-1/F(+)/R_{PFA}</i>	D46N, A346T, L802F , S866F, N871D, D1027N, G1085E, Q1199R	V12A, L340P, E374R, A375L, N376T, stop377E
<i>HSV-1/Avd</i>	D46N, A136T , A346T, I529M , E545D , S866F, N871D, M880T , G1085E	V12A, ΔT66 , P155Q, M372I

* Штамм **HSV-1/L₂/R_{ACV+PFA}** получен с помощью методов генной инженерии (делетирован ген ТК).

Важно подчеркнуть, что механизм формирования резистентности у различных штаммов HSV-1 связан с различными генами - UL23 (тимидинкиназа, ТК) и/или UL30 (каталитическая субъединица ДНК-полимеразы, pol-ген). При этом мутации в гене ТК штамма

HSV-1/L₂/R_{ACV} приводят к полной потере активности фермента, у штамма *HSV-1/L₂/R_{P-ACV/2}* изменена субстратная специфичность фермента (он сохраняет способность фосфорилировать тимидин, но не фосфорилирует ACV). В геноме штамма *HSV-1/Avd* обнаружены мутации, ассоциированные с резистентностью к CDV (pol-ген) и ACV (TK-ген). *HSV-1/L₂/R_{ACV+PFA}* был получен генно-инженерным путем (TK-ген делектирован), кроме того он резистентен к PFA, что может быть связано только с мутациями по pol-гену. Соответственно, *HSV-1/F(+)/R_{PFA}*, также резистентный к PFA, имеет измененный pol-ген.

Результаты изучения противогерпетической активности рибозида (43) и референсных препаратов в отношении шести различных штаммов HSV-1 (эталонного штамма и пяти штаммов с лекарственной устойчивостью) приведены в таблице 22. Значимых отличий в активности рибозида (43) по отношению к штаммам с различной лекарственной чувствительностью не выявлено.

Таблица 22 - Цитотоксические свойства и противовирусная активность рибозида (43) на модели штаммов HSV-1 с различной лекарственной чувствительностью в культуре клеток Vero E6

Соединение/ MW	МПК ^а		Штамм HSV-1					
			<i>HSV-1/L₂</i>	<i>HSV-1/L₂/R_{ACV}</i>	<i>HSV-1/L₂/R_{P-ACV/2}</i>	<i>HSV-1/F(+)/R_{PFA}</i>	<i>HSV-1/L₂/R_{ACV+PFA}</i>	<i>HSV-1/Avd</i>
33 301.3	> 3319	ИД ₅₀ ^б	104	104	104	208	208	208
		ИД ₉₅ ²	830	830	830	830	830	830
		ХТИ ^с	>32	>32	>32	>16	>16	>16
Рибавирин 244.2	> 4095	ИД ₅₀	512	1024	1024	1024	1024	1024
		ИД ₉₅	2048	>4095	>4095	>4095	>4095	>4095
		ХТИ	>8	>4	>4	>4	>4	>4
Ацикловир 225.2	> 444	ИД ₅₀	1.73	>444	27.8	3.5	>444	17.3
		ИД ₉₅	6.9	>444	111	13.9	>444	138.8
		ХТИ	>256	>1	16	>128	>1	>26
Фоскарнет (натриевая соль) 300.0	833	ИД ₅₀	104	104	52	833	417	104
		ИД ₉₅	208	208	104	> 833	> 833	208
		ХТИ	8	8	16	1	2	8
Цидофовир 279.2	> 358	ИД ₅₀	14	14	1.8	27.9	7	111.9
		ИД ₉₅	55.9	55.9	27.9	447.7	27.9	895.4
		ХТИ	>26	>26	>204	>13	>51	>6.4

Множественность инфицирования 0.1 БОЕ/кл, продолжительность инкубации 48 ч; штамм *HSV-1/L₂* был использован в качестве референсного; Представлены результаты двух независимых опытов.

^а МПК – максимальная концентрация соединения, в присутствии которой не наблюдается видимых под микроскопом изменений клеточного монослоя после 72 ч инкубации (μМ);

^б ИД₅₀ и ИД₉₅ – концентрации соединений, в присутствии которых ингибировалось развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ) соответственно на 50% или практически полностью при 95-100 % ЦПЭ в контроле вируса (μМ);

^с Величина ХТИ вычислялась как отношение МПК к ИД₅₀.

Как видно из данных, приведенных в таблице 22, селективность противогерпесвирусного действия рибозида (**43**) превосходит активность рибавирина [175, 176]. Кроме того, исследуемый рибозид проявляет активность по отношению к штаммам вируса, устойчивым к PFA, которая в соответствии с рекомендациями ВОЗ, является препаратом выбора в случаях клинической неэффективности препаратов первого ряда (ACV, валацикловира, фамцикловира) [177]. Таким образом, данное соединение сравнимо по активности с PFA или даже превосходит ее по активности. Также установлено, что ACV-резистентные штаммы HSV-1 сохраняют чувствительность к рибозиду (**43**).

Более подробные исследования выявили, что рибозид (**43**) эффективно ингибирует репродукцию всех включенных в исследование вариантов HSV-1, не зависимо от их лекарственной чувствительности (Таблица 23).

Таблица 23 - Влияние 2-амино-5,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазола (**43**) на репродукцию штаммов HSV-1 с различной лекарственной чувствительностью в культуре клеток *Vero E6*.

Концентрация соединения (μM)	Штаммы HSV-1					
	HSV-1/L ₂	HSV-1/L ₂ /R _{ACV}	HSV-1/L ₂ /R _{PFA} ACV/2	HSV-1/F(+)/R _{PFA}	HSV-1/L ₂ /R _{ACV+PFA}	HSV-1/Avd
	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл					
- (Контроль вируса)	6.91±0.05	5.95±0.03	6.05±0.03	6.60±0.10	5.92±0.11	6.52±0.11
52	6.11±0.02	5.04±0.03	5.32±0.09	5.90±0.04	5.40±0.11	5.71±0.04
104	5.63±0.05	4.44±0.13	4.76±0.06	5.32±0.09	4.80±0.04	5.39±0.12
207	5.16±0.09	4.15±0.03	4.55±0.09	4.87±0.03	4.47±0.07	5.06±0.04
415	4.38±0.08	3.45±0.11	4.06±0.23	3.90±0.08	4.02±0.10	4.61±0.07

Множественность инфицирования – 0.1 БОЕ/мл, время инкубации – 48 ч.

Представлены результаты двух независимых экспериментов.

Способность рибозиды (**43**) супрессировать репродукцию HSV-1 оценивали по снижению величины инфекционного титра вируса в присутствии испытуемого соединения по сравнению с контрольной культурой, инфицированной в тех же условиях, но инкубированной без препарата в среде поддержки. За минимальную активную концентрацию (МАК) принимали концентрацию соединения, в присутствии которой снижение титра вируса в опытном образце по сравнению с контролем вируса составляло не менее 1 lg. Как следует из данных таблицы 23, достижение эффекта, соответствующего МАК, обеспечивается при использовании нецитотоксичных концентраций испытуемого соединения (**43**), равных 1/16 ÷ 1/32 ЦД₅₀. Антивирусная активность носит дозозависимый характер, а уровни снижения инфекционного титра всех

исследованных штаммов HSV-1 хорошо сопоставимы. Концентрацию рибозидов (43) 104 мМ, в присутствии которой инфекционный титр вируса во всех вирусных моделях, включенных в исследование, снижается не менее, чем на 1 lg, можно принять за МАК.

Можно с уверенностью заключить, что рибозид (43) в нецитотоксичных концентрациях проявляет выраженный селективный противовирусный эффект в отношении HSV-1, включая штаммы с лекарственной резистентностью. Кроме того, получены принципиально новые данные о том, что выраженность противовирусного эффекта у рибозидов (43) не зависит от функциональной активности ТК вируса. Мутации в гене ДНК-полимеразы, связанные с лекарственной резистентностью к АСВ, РФА или СДВ, также не влияют на выраженность его противовирусной активности. Таким образом, соединение (43) эффективно преодолевает барьер лекарственной резистентности к АСВ на модели герпетической инфекции, что указывает на возможную перспективность его использования в качестве препарата выбора для лечения герпетических инфекций в случаях неэффективности АСВ.

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

Противовирусная активность нуклеозидов бензимидазола (8) – (19), (43), (44) исследовалась *in vitro* на экспериментальной модели инфекции, вызванной штаммом Абсеттаров вируса клещевого энцефалита (КЭ) в перевиваемой линии клеток почки зеленой мартышки Vero-V.

Первым делом была исследована цитотоксичность всех соединений по отношению к культуре клеток. Исследовались концентрации в диапазоне от 100 до 1.55 мкг/мл. Подсчитывали процент жизнеспособных клеток, и рассчитывали ЦД₅₀ – минимальную концентрацию препарата, которая вызывает гибель 50 % клеток монослоя (Таблица 24). В результате было выявлено, что все используемые концентрации соединений (до 100 мкг/мл) не обладают цитотоксической активностью для культур клеток Vero-V.

Противовирусный эффект нуклеозидов бензимидазола определяли по влиянию разных концентраций соединений защищать клетки Vero-V от цитодеструктивного действия вируса: если монослой клеток обрабатывали соединениями за 6 часов до заражения клеток, в момент заражения клеток и через 6 часов после заражения. Рассчитывали величину ИД₅₀ – минимальную концентрацию препаратов, которая обеспечивала жизнеспособность 50% клеткам монослоя, инфицированного вирусом КЭ.

Таблица 24 - Цитотоксические свойства нуклеозидов бензимидазола (8) – (19), (43), (44) и препарата сравнения (рибавирина) для культур клеток Vero-V

Соединение	Концентрация соединений (мкг/мл)							Контроль (без соединения)
	100	50	25	12.5	6.25	3.1	1.55	
	Количество выживших клеток (%)							
8	95	95	98	97	97	97	95	95
9	98	98	95	99	99	99	95	95
10	95	95	97	95	95	95	98	98
11	97	95	99	95	95	95	95	95
12	99	98	95	98	97	98	98	98
13	95	95	95	95	99	95	95	95
14	95	97	98	98	95	98	97	97
15	98	99	95	95	95	95	95	98
16	95	95	98	97	98	97	95	95
17	95	95	95	99	95	99	99	97
18	98	98	97	97	95	97	97	99
19	95	95	99	99	98	99	99	97
43	99	98	95	99	97	99	98	97
44	95	95	98	95	99	95	95	95
Рибавирин	85	86	84	85	85	86	85	95

Инкубация обработанного монослоя клеток проводилась в течение 72 часов при 37° С

Первичный скрининг противовирусной активности был проведен в диапазоне концентраций исследуемых соединений от 100 до 1.55 мкг/мл при обработке клеток соединениями сразу же после заражения клеток вирусом КЭ. Данные исследования были направлены на определение способности соединений защищать клетки от гибели, вызванной заражением вирусом КЭ. Результаты приведены в таблице 25. В частности, было показано, что в этих условиях субстанция препарата сравнения (рибавирина) характеризовалась максимальной противовирусной активностью в отношении инфекции, вызванной вирусом КЭ. Рибавирин в минимальной дозе 1.55 мкг/мл оказался способным защитить 50% монослоя клеток Vero-V от цитопатогенного действия вируса КЭ при внесении его в момент заражения клеток вирусом.

Иные результаты были получены при первичном скрининге новых нуклеозидов. В частности, у ряда соединений - (9), (10), (16), (17) - была обнаружена противовирусная активность, однако отсутствовала зависимость противовирусного эффекта от используемой дозы соединений, что требовало снижение множественности заражения вируса на клетку (заражающая доза вируса). И, тем не менее, данные, приведенные в таблице 25 позволили отобрать нуклеозиды для дальнейшего изучения их противовирусной активности.

Результаты исследования отобранных нуклеозидов приведены в таблице 26. Полученные данные свидетельствуют о том, что из пяти отобранных нуклеозидов устойчивой противовирусной активностью характеризовались 4 соединения (10), (13), (16), (17). Выявлено, что максимальной противовирусной активностью во всех вариантах опытов характеризовался

препарат сравнения - рибавирин и, на втором месте - нуклеозид (16), ИД₅₀ которых составляла 12.5 - 25.0 мкг/мл, соответственно.

Таблица 25 - Противовирусные свойства нуклеозидов (8) – (19), (43), (44), полученные при первичном скрининге в культуре клеток Vero-V, инфицированных штаммом Абсеттаров вируса КЭ.

Соединение	Концентрация соединений (мкг/мл)							Контроль (без соединений)
	100	50	25	12.5	6.25	3.1	1.55	
	Количество выживших клеток (%)							
8	2	3	2	2	2	2	3	3
9	3	2	50	75	3	4	2	2
10	2	2	50	50	0	50	15	2
11	2	2	5	2	75	5	3	2
12	15	3	3	2	4	0	2	3
13	0	2	5	3	2	0	3	2
14	4	2	3	2	3	5	0	2
15	3	2	5	2	3	5	0	2
16	0	50	90	2	3	5	0	50
17	3	5	75	2	50	75	50	5
18	2	3	2	2	4	4	3	3
19	2	5	2	3	50	15	2	5
43	50	2	3	3	5	2	50	2
44	3	0	5	0	3	2	3	2
Рибавирин	90	95	90	85	90	80	50	3

Из приведенных в таблице данных следует, что противовирусные свойства нуклеозидов проявлялись при обработке монослоя клеток за 24 часа до заражения, а также в момент инфицирования клеток Vero-V, и фактически исчезали при обработке монослоя клеток через 24 часа после заражения клеток. Исключение составляли лишь рибавирин и нуклеозид (16), проявляющие активность в этих условиях (ИД₅₀ достигала 25.0 мкг/мл). Достаточно выраженными свойствами защищать клетки от цитопатогенного действия вируса КЭ характеризовался также нуклеозид (13) как при обработке клеток за 24 часа до заражения, так и в момент инфицирования клеток.

Таблица 26 - Противовирусное действие отобранных нуклеозидов (9), (10), (13), (16), (17) в отношении инфекции, вызванной штаммом Абсеттаров вируса КЭ в культурах клеток Vero-V

а) обработка монослоя клеток за 24 часа до заражения

№ п/п	Концентрация соединений (мкг/мл)								ИД ₅₀ (мкг/мл)
	100	50	25	12.5	6.25	3.1	1.55	контроль	
	Количество погибших клеток (%)								
9	100	100	100	100	100	100	100	100	>100.0
10	0	80	100	100	100	100	100	100	>50.0
13	0	0	50	100	100	100	100	100	25.0
16	20	20	50	100	100	100	100	100	25.0
17	10	50	100	100	100	100	100	100	50.0
Рибавирин	0	0	0	30	50	100	100	100	6.25

Продолжение таблицы 26

б) обработка монослоя клеток в момент заражения клеток

№ п/п	Концентрация соединений (мкг/мл)								ИД ₅₀ (мкг/мл)
	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	контроль	
	Количество погибших клеток (%)								
9	100	100	100	100	100	100	100	100	>100.0
10	20	50	100	100	100	100	100	100	50.0
13	0	50	100	100	100	100	100	100	50.0
16	0	0	20	50	100	100	100	100	12.5
17	70	100	100	100	100	100	100	100	>100.0
Рибавирин	0	0	20	50	100	100	100	100	12.5

в) обработка монослоя клеток через 24 часа после заражения

№ п/п	Концентрация соединений (мкг/мл)								ИД ₅₀ (мкг/мл)
	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	контроль	
	Количество погибших клеток (%)								
9	100	100	100	100	100	100	100	100	>100.0
10	85	100	100	100	100	100	100	100	>100.0
13	100	100	100	100	100	100	100	100	>100.0
16	0	0	50	100	100	100	100	100	25.0
17	100	100	100	100	100	100	100	100	>100.0
Рибавирин	0	0	50	100	100	100	100	100	25.0

Таким образом, изучение нуклеозидов бензимидазола позволило установить их избирательную противовирусную активность в отношении инфекции, вызванной штаммом Абсеттаров вируса КЭ *in vitro*. В исследуемых концентрациях ни один из нуклеозидов не проявил цитотоксических свойств по отношению к культуре клеток Vero-V, однако лишь 4 нуклеозида (**10**), (**13**), (**16**), (**17**) обладали способностью защищать культуры клеток Vero-V от литического действия вируса КЭ, причем максимальной противовирусной активностью характеризовался 5-морфолино-4,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (**16**). Противовирусные свойства нуклеозидов преимущественно проявлялись при обработке монослоя клеток за 24 часа до заражения вирусом КЭ и в момент инфицирования клеток Vero-V. Поэтому эти нуклеозиды были отобраны для дальнейшего изучения в качестве перспективных соединений для дальнейшего изучения их противовирусной активности по отношению к КЭ.

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

Для исследования противоопухолевой активности нуклеозидов бензимидазола использовались клетки лейкемической моноцитарной лимфомы человека линии U937. В исследовании участвовали пять новых синтезированных нуклеозидов бензимидазола (**10**), (**27**) - (**30**), отобранных на основании данных о цитотоксичности, полученных при первичном скрининге их противовирусной активности. Отбор проводили исходя из трех показателей: первый - структура остатка углевода в молекуле нуклеозида, второй - цитотоксичность исследованных соединений, третий - их химиотерапевтический индекс (ХТИ). Таким образом, в исследование противоопухолевой активности были включены нуклеозиды с неприродным остатком углевода - 2'-фторарабинозиды (**27**) - (**30**). Ряд снижения цитотоксичности (с учетом IC_{50}) по отношению к культуре клеток Vero Еб, отобранных для исследования нуклеозидов выглядит следующим образом: 245 мкг/мл (**27**) > 487.5 мкг/мл (**28**) > 542.5 мкг/мл (**10**) > 763.23 мкг/мл (**30**) > 1000 мкг/мл (**29**).

Цитотоксическую активность оценивали по влиянию соединений на выживаемость клеток U937 с помощью МТТ-теста. В качестве стандарта сравнения использовали препарат атрианс (Неларабин). Результаты выражали в виде средних значений для 4-х параллельных измерений как выживаемость клеток в % (опыт/контроль×100). Соединение считали активным, если его концентрация, вызывающая ингибирование роста клеток на 50% (ID_{50}) была меньше или равна ID_{50} для неларабина (Таблица 27). Результаты проведенных экспериментов даны в таблице 28.

Таблица 27 - Влияние препарата атрианс (неларабин) на выживаемость клеток линии U937.

Соединение	Выживаемость клеток, %					ИД50, мкМ
	Концентрация, мкМ					
Атрианс (неларабин)	0.1	0.5	1	2.5	5	1.4
	77.0	65.1	53.1	41.7	12	

Как видно из данных, приведенных в таблице 27 атрианс (неларабин) подавлял рост клеток линии U937 в диапазоне концентраций от 0.1 до 5.0 мкМ. Причем видна очевидная зависимость эффекта от концентрации соединения. Значение ID_{50} для препарата атрианс составило 1.4 мкМ. Значение ID_{50} для нуклеозидов бензимидазола в пределах исследуемых концентраций точно установить не удалось ($ID_{50} > 100$ мкМ).

Таблица 28 - Влияние нуклеозидов бензимидазола (**10**, **27** - **30**) на выживаемость клеток линии U937.

Соединение	Концентрация, мкМ			ИД ₅₀ , мкМ
	10	50	100	
	Выживаемость клеток, %			
10	103.8	92.9	88.9	> 100
27	99.7	71.8	75.9	> 100
28	98.7	98.2	60.3	> 100
29	105.1	100	86.8	> 100
30	100.9	99.1	78.0	> 100

Наиболее перспективным из данного ряда соединений является 2'-фторарабинозид (**28**), при концентрации которого в 100 мкМ выживаемость клеток по сравнению с контролем составляет около 60 % (Таблица 28). В целом, изученные нуклеозиды бензимидазола следует оценивать как неактивные в соответствии с заданными критериями активности при испытании на клеточной линии U937.

3. Материалы и методы

В работе использовали коммерческие растворители и реактивы отечественного производства со степенью чистоты «хч» и выше, а также реактивы Sigma-Aldrich (США), не требующие дополнительной очистки.

Модифицированные основания (2) - (7), (20), (37), (38) и (42) были синтезированы в ИОС УрО РАН (г. Екатеринбург) и переданы для проведения экспериментальных работ. Все основания, кроме (38), использовались без дополнительной очистки (Приложение 32). Основание (38) дополнительно очищали обращено-фазовой хроматографией.

Для колоночной хроматографии использовали Silica gel 60 (Fluka) или Separon SGX C18 60 (Tessek Ltd, Czech Republic).

Пуриннуклеозидфосфорилаза (концентрация белка, определенная по методу Бредфорд - 29 мг/мл, активность 54 е.а./мг белка) и уридинфосфорилаза (концентрация белка, определенная по методу Бредфорд - 9 мг/мл, активность 100 е.а./мг белка) были получены ранее по методике [148].

УФ спектры были записаны на УФ-спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония). Масс-спектры записывали на приборе Agilent 6224, ESI-TOF, LC/MS (США) в положительном поле (ESI+) (если не указано иное).

Спектры ЯМР регистрировали в DMSO- d_6 (если не указано иное) на приборе Bruker Avance-700-DRX (Германия) с рабочей частотой 700 МГц, при 30 °С.

ВЭЖХ: система Waters (Waters 1525, Waters 2487, Breeze 2; США), колонка Nova Pack C₁₈, 4 μ m, 4.6 \times 150 мм, элюент А - 0.1% TFA-H₂O, элюент В - 0.1 % TFA-70 % MeCN в H₂O, скорость потока - 1 мл/мин или 0.5 мл/мин (указывается дополнительно), детектирование осуществляли при 254 и 280 нм.

Градиент элюента В:

метод (I): 0 – 70 % за 20 мин,

метод (II): 0 – 30 % за 20 мин,

метод (III): 7 % В, изократический,

метод (IV): 0 – 70 % за 15 мин, скорость потока 0.5 мл/мин,

метод (V): 5 % В, изократический,

метод (VI): 0 – 80 % за 14 мин, скорость потока 0.3 мл/мин.

Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластинки с силикагелем (TLC Slica gel 60 F₂₅₄, Merck, Germany), если не указано иное.

Методика определения субстратной специфичности

При изучении субстратной специфичности готовили два типа реакционных смесей: тестовую и контрольную. Тестовая смесь содержала модифицированное основание в концентрации 2 мМ и инозин (Ino) в концентрации 4 мМ. Контрольная смесь содержала только 4 мМ инозина. Объем реакционных смесей - 1 мл, компоненты растворяли в 4 мМ KH_2PO_4 (pH 7). В каждую реакционную смесь добавляли по 4.35 ед. акт. PNP *E. coli* и термостатировали при температуре 50 °С. Время проведения реакций – до 2 суток. Контроль реакции - ВЭЖХ (метод (I) и LC-MS через полчаса, 1 ч, 24 ч и 48 ч после начала реакции).

Общая методика синтеза β -D-рибо-, β -D-2'-дезоксирибонуклеозидов 4,6,5-замещенных бензимидазолов (8) - (19)

Реакции ферментативного трансгликозилирования: параметры синтеза (соотношения реагентов, количество PNP и UP, молярность буферного раствора, время проведения процесса, процент непрореагировавшего основания - акцептора и условия элюирования целевых нуклеозидов) указаны в сводной таблице 3.

Реакции проводили по следующей схеме: навеску модифицированного основания (2) – (7) (акцептор) и навеску нуклеозида - донора остатка углевода (Urd или dUrd) растворяли в буферном растворе дигидрофосфата калия (pH = 7.0) при нагревании до 40-50 °С и постоянном перемешивании; затем в реакции добавляли необходимое количество ферментов (PNP/PNP и UP) и термостатировали реакционные смеси при 50 °С в течение указанного времени (контролировали ход реакций с помощью ВЭЖХ); когда конверсия оснований в нуклеозиды достигала максимального значения, добавляли в реакционные смеси этанол (50 % v/v); объем реакционных смесей минимизировали до 5 мл и выделяли целевые нуклеозиды с помощью колоночной хроматографии на силикагеле C_{18} (колонка 20×100 мм) в градиенте вода - ацетонитрил, этанол или метанол (соотношения указаны в таблице 3). Нуклеозиды (10) и (11) выделяли кристаллизацией из упаренной примерно в 5 раз от начального объема реакционной смеси, промывали водой (2×3 мл). Данные о выходе нуклеозидов (8) - (19), чистоте, а также физико-химические свойства и спектральные характеристики приведены в таблицах 4 и 5.

1-(β -D-арабинофуранозил)бензимидазол (26). 300 мг (2 ммоль) D-арабинозы (21) суспендировали в 10 мл сухого дихлорметана, охлаждали до 8 °С и прикапывали 1.5 мл (8.6 ммоль) этил-диизопропиламина (EDIPA) и 0.65 мл (8.6 ммоль) метоксиметилхлорида. Смесь выдерживали при этой температуре 20 часов, добавляли еще 0.15 мл (2 ммоль) метоксиметилхлорида и продолжали реакцию еще 6 часов. Гомогенный светло-желтый раствор промывали водой (30 мл) и водой с 1.5 мл 2N HCl (30 мл). Упаривали, остаток (390 мг) сушили

16 часов в вакууме над пятиокисью фосфора. Полученное масло растворяли в 10 мл сухого дихлорметана, охлаждали льдом и добавляли 0.175 мкл (2.3 ммоль) диметилформамида и, по каплям, 0.225 мл (2.7 ммоль) оксалилхлорида. Охлаждение снимали и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Промывали смесь холодным насыщенным раствором бикарбоната натрия до щелочного pH промывного раствора (3 раза), сушили органическую фазу безводным сульфатом натрия и добавляли молекулярные сита 4А. Через 2 часа приливали раствор 125 мг (1.1 ммоль) бензимидазола и 0.21 мл (1.1 ммоль) *N*-метил-*N*-триметилсилил трифторацетамида в 3 мл дихлорметана. Смесь выдерживали 24 часа при комнатной температуре. Процесс контролировали с помощью ТСХ в системе хлороформ-этанол 9:1.

Сита отфильтровывали, раствор упаривали, остаток наносили на колонку (30 × 130 мм) с силикагелем (Kieselgel 60). Элюировали 50 мл хлороформа, 100 мл 1 % этанола в хлороформе и 200 мл 2 % этанола в хлороформе. Фракции, содержащие целевой продукт объединили, упарили и высушили. В результате получили 120 мг гомогенного (по данным ТСХ) продукта - смесь пиранозной и фуранозной форм (**25**). Полученную смесь (60 мг) растворяли в 1 мл метанола, добавляли 0.020 мл (0.2 ммоль) трифторметансульфокислоты и выдерживали 6 часов при 50 °С. Нейтрализовали водным аммиаком, упаривали.

Целевой продукт (**26**) выделяли обращенно-фазовой колоночной хроматографией (C₁₈, 250×20 мм, 5μm, градиент метанола в воде - 5 - 50 %). Выход: 20 мг (0.08 ммоль, 40 %), чистота 95 % по данным ВЭЖХ (метод (I)). Данные ЯМР спектра нуклеозида (**26**) приведены в таблице 10, ЯМР спектры приведены в *Приложениях 17 и 18*.

2-Дезокси-2-фтор-α,β-D-арабинофуранозил-1-фосфат (×2Li⁺) (31**).** Кристаллическую фосфорную кислоту (>99%; 2.0 г, 20.41 ммоль) расплавляли в стеклянной колбе на глицериновой бане. К получившейся вязкой массе добавляли ацетилбромид (0.35 мл, 4.73 ммоль) и затем 2-дезоксид-2-фтор-1,3,5-три-*O*-бензоил-α-D-арабинофуранозу (**32**) (2.0 г, 4.31 ммоль) при осторожном перемешивании при 50 °С. Реакционная смесь постепенно гомогенизировалась и становилась темной, процесс образования 2-дезоксид-2-фтор-3,5-ди-*O*-бензоил-α-D-арабинофуранозил бромида (**33**) контролировали с помощью ТСХ [гексан-этилацетат, 4:1 (vol); R_f величины исходного (**32**) и бромида (**33**) - 0.3 и 0.4, соответственно); после выдерживания в течение 5 ч при 50 °С, исходный (**32**) перешел в бромид (**33**).

Темный вязкий остаток растворили в безв. диоксане (20 мл), охладили до 0 °С, добавили три-*n*-бутиламин (14 мл, 58.92 ммоль) и реакционную смесь оставили при комнатной температуре на ночь. К реакционной смеси при перемешивании добавили 20 мл воды и порошок LiOH (2 г, 83.52 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре 1 ч. Осадок фосфата лития удалили фильтрованием, pH водной фазы довели до 11.0 добавлением водного раствора LiOH. Три-*n*-

бутиламин экстрагировали хлороформом (2×25 мл). Гомогенный водный раствор отделили и оставили на ночь для образования фосфата (**31**). Контроль процесса осуществляли с помощью ТСХ в системе диоксан – водный аммиак, 1:1 (vol); R_f 0.5. pH реакционной смеси довели до 7.5 добавлением HCl (1.0 M), смесь концентрировали *in vacuo* до 10 мл, добавляли MeOH (20 мл) и ацетон (30 мл), и оставили при 4 °C на 48 ч. Осадок отделяли центрифугированием, промывали MeOH (2×10 мл), ацетоном (2×10 мл), диэтиловым эфиром (2×10 мл), сушили *in vacuo* над P_2O_5 . Выход 0.45 г (1.84 ммоль; 42.7 %) фосфата (**31**) в виде белой пудры (смесь α - и β -аномеров, в соотношении примерно *ca.* 1:1 согласно данным 1H ЯМР, Приложение 23).

(ESI⁻) Масс-спектр, m/z : 231.0046 (рассч. для $C_5H_9O_7P_1F_1$ 231.0070) $[M-H]^-$.

(ESI⁺) Масс-спектр, m/z : 239.0326 (рассч. для $C_5H_{10}O_7P_1F_1Li_1$ 239.0308) $[M+H]^+$; 245.0452 (рассч. для $C_5H_9O_7P_1F_1Li_2$ 245.0390) $[M+H]^+$. Данные ЯМР приведены в таблице 10.

Определение кинетических параметров фосфорилиза инозина с помощью PNP в присутствии of 1-(β -D-арабинофуранозил)бензимидазола (26**)**

Кинетические параметры фосфорилиза инозина измерялись в 10 mM KH_2PO_4 буфере (pH 7), содержащем от 0.02 до 1.0 mM инозина, 0.15 мкг/мл PNP и 0.1, 0.2 и 0.3 mM ингибитора - 1-(β -D-арабинофуранозил)бензимидазола (**26**). Для каждого эксперимента (один без ингибитора и три с различными концентрациями ингибитора) было приготовлено 14 реакционных смесей с разным содержанием инозина: 0.02, 0.03, 0.04, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 и 1 mM. Реакции велись при комнатной температуре в течение 2 минут. Концентрации инозина и гипоксантина определяли с помощью ВЭЖХ в изократическом методе (V). Кинетические параметры определяли с помощью нелинейного регрессионного анализа, используя программу SciDAVis v0.2.4.

Общая методика синтеза 2'-дезоксидезокси-2'-фтор- β -D-арабинозидов (27**) – (**30**).**

Параметры ферментативных реакций (соотношения реагентов, количество PNP, молярность буферного раствора, время проведения процесса, процент непрореагировавшего основания - акцептора и условия элюирования целевых нуклеозидов) приведены в сводной таблице 8.

Реакции проводили по следующей схеме: навески модифицированных оснований (**2**) - (**4**), (**20**) и 2-дезоксидезокси-2-фтор- α -D-арабинофуранозид-1-фосфата (**31**) растворяли в воде при нагревании до 40-50 °C и постоянном перемешивании, довели значение pH раствора до 7.0, затем во все реакции добавляли необходимое количество PNP и термостатировали реакционные смеси при 50 °C в течение указанного времени (контролировали ход реакций с помощью ВЭЖХ): когда конверсия оснований в нуклеозиды достигала значений тестовых реакций, добавляли в

реакционные смеси этанол (50 % v/v); объем реакционных смесей минимизировали до 5 мл и выделяли целевые нуклеозиды обращено-фазовой колоночной хроматографией (C₁₈, 20×100 мм) в градиенте вода - ацетонитрил, этанол или метанол, соотношение указано в таблице 8. Сведения о выходе целевых нуклеозидов, их чистоте, а также физико-химических свойствах и спектральных характеристиках приведены в таблицах 9 и 10. ¹H-спектры приведены в *Приложениях 19-22*.

2-Амино-5,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (43). Бензимидазол (37) (0.30 г, 1.77 ммоль) и уридин (Urd) (2.17 г, 8.86 ммоль,) растворяли в 20 mM KН₂РO₄ (443 мл) при 50 °С и рН 7.0. PNP (4280 е.а.) и UP (1770 е.а.) добавляли в раствор и смесь термостатировали при 50 °С в течение 20 ч. Контроль за реакцией проводили с помощью ВЭЖХ. Через 20 ч реакцию остановили добавлением в этанола (50 %, v/v), реакционную смесь концентрировали до объема около 5 мл и целевой нуклеозид (43) выделяли обращенно-фазовой хроматографией (C₁₈, колонка 300 × 25 мм, продукт элюировали в градиенте вода - этанол, 0 - 30 %, 1000 мл, скорость потока 7 мл/мин).

Выход нуклеозида (43) 0.62 г (1.54 ммоль, 87 %); белый аморфный порошок, чистота: 99.9 % (ВЭЖХ, метод (II), R_t = 15.0). УФ спектр: λ_{max} 214, 229, 288 нм. Масс-спектр, m/z: 302.0922 [M+H]⁺ (расч. для C₁₂H₁₃N₃O₄F₂ 302.0947), 170.0522 [M-Rib+2 H]⁺ (расч. 170.1401). Данные ЯМР спектроскопии приведены в таблице 14, ¹H-спектр приведен в *Приложении 24*.

2-Амино-5,6-дифтор-1-(β-D-2'-дезоксирибофуранозил)бензимидазол (44). Основание (37) (0.10 г, 0.60 ммоль) и dIno (0.40 г, 1.78 ммоль) растворяли в 6 mM KН₂РO₄ буфере (296 мл), рН 7.0. В реакционную смесь добавили 130 е.а. PNP. Реакцию термостатировали при 50 °С в течение 24 ч. Контроль за реакцией осуществляли с помощью ВЭЖХ (метод (I)). Через 24 ч реакция была остановлена добавлением в нее этанола (50 %, v/v). Реакционную смесь сконцентрировали до 5 мл и целевой нуклеозид (44) выделили с помощью обращенно-фазовой хроматографии (C₁₈, колонка 100 × 20 мм, элюировали в градиенте вода - метанол, 0 - 50 %, 600 мл, скорость потока 7 мл/мин).

Выход (44) 0.04 г (0.21 ммоль, 35%); белый аморфный порошок, чистота 98.8 % (ВЭЖХ, метод (II), R_t = 16.0). УФ спектр: λ_{max} 202, 222, 284 нм. Масс-спектр, m/z: 286.0991 [M+H]⁺ (расч. для C₁₂H₁₃N₃O₃F₂ 286.1003), 170.0522 [M-dRib+2 H]⁺ (расч. 170.1401). Данные ЯМР спектроскопии приведены в таблице 14, ¹H-спектр в *Приложении 25*.

2-Амино-5-метокси-6-фтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (45). Основание (38) (0.05 г, 0.28 ммоль) и Urd (0.47 г, 1.92 ммоль) растворяли в 14 mM KН₂РO₄ (138 мл, рН 7.0) при 50 °С.

В реакционную смесь добавили PNP (203 е.а.) и UP (123 е.а.), реакцию термостатировали при 50 °С в течение 20 дней. Контроль за реакцией проводили с помощью ВЭЖХ, метод (I). Через 20 дней реакцию остановили добавлением этанола (50 %, v/v). Реакционную смесь концентрировали до объема около 5 мл и целевой нуклеозид (**45**) выделяли обращенно-фазовой хроматографией (C₁₈, колонка 100 × 20 мм, элюировали в градиенте 5 - 50 % метанола в воде, 600 мл, скорость потока 7 мл/мин).

Выход нуклеозида (**45**) 0.047 г (0.15 ммоль, 55 %), белый аморфный порошок, чистота: 98.0 % (ВЭЖХ, метод (II), $R_t = 16.4$). УФ спектр: λ_{max} 202, 228, 292 нм. Масс-спектр, m/z : 314.1130 [M+H]⁺ (расч. для C₁₃H₁₆N₃O₅F 314,1152), 182.0732 [M-Rib+2 H]⁺ (расч. 182.0730). Данные ЯМР спектроскопии приведены в таблице 14, ¹H-спектр (**45a**) приведен в Приложении 26.

2-Амино-5-метокси-6-фтор-1-(β-D-2'-дезоксирибофуранозил)бензимидазол (46**).** Основание (**38**) (0.05 г, 0.28 ммоль, 1 экв.) и 2'-дезоксиинозин (dIno) (0.40 г, 1.93 ммоль, 6.89 экв.) растворяли в 14 mM KН₂РO₄ (138 мл, pH 7.0). В реакционную смесь добавляли PNP (102 е.а.) и UP (62 е.а.), реакцию термостатировали при 50 °С в течение 8 ч. Контроль за реакцией осуществляли с помощью ВЭЖХ, метод (I). Через 8 ч реакцию остановили добавлением этанола (50%, v/v). Реакционную смесь концентрировали до объема 5 мл и целевой нуклеозид (**46**) выделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии (C₁₈, колонка 100 × 20 мм, элюировали в градиенте 5 - 40 % этанола в воде, 600 мл, скорость потока 7 мл/мин).

Выход 0.029 г (0.097 ммоль, 35 %), аморфный порошок кремового цвета, чистота 99.4 % (ВЭЖХ, метод (II), $R_t = 17.2$). УФ спектр: λ_{max} 196, 230, 292 нм. Масс-спектр, m/z : 298.1226 [M+H]⁺ (расч. для C₁₃H₁₆N₃O₄F 286.1003), 182.0732 [M-dRib+2 H]⁺ (расч. 182.0730). Данные ЯМР спектроскопии приведены в таблице 14, ¹H-спектр (**45b**) приведен в Приложении 27.

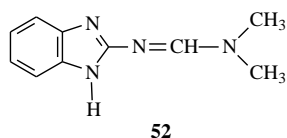
Методика синтеза 2-амино-5,6-дизамещенных-1-(β-D-2'-дезоксидеокси-2'-фторрибофуранозил)бензимидазолов (47**) и (**48**).** Навески модифицированного основания (**37**) или (**38**) и 2-дезоксидеокси-2-фтор-α-D-арабинофуранозид-1-фосфата (**31**) растворяли в 1 мл воды при нагревании до 40-50 °С и постоянном перемешивании, доводили значение pH раствора до 7.0, затем в реакцию добавляли 14.5 е.а. PNP и термостатировали реакционную смесь при 50 °С в течение 14 дней (контроль с помощью ВЭЖХ, для соединения (**47**) - метод (I), $R_t = 15.5$; для соединения (**48**) - метод (II), $R_t = 18.4$). Максимальная конверсия основания (**37**) в нуклеозид (**47**) - 9 %, основания (**38**) в нуклеозид (**48**) - 2 %. Наличие в реакционной смеси целевых нуклеозидов было подтверждено данными LC-MS. Соединение (**47**) Масс-спектр, m/z : 304.0899 [M+H]⁺ (расчетный для C₁₂H₁₂N₃O₃F₃ - 304.0909), 170.0515 [M-FAra+2H]⁺ (расч. 170.1401).

Соединение (**48**) Масс-спектр, m/z : 316.0990 $[M+H]^+$ (расч. для $C_{13}H_{15}N_3O_4F_2$ - 316.1109), 182.0639 $[M-FAr+2H]^+$ (расч. 182.0730).

2-Изопропиламино-5,6-дифтор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол (49). DIEA (0.034 мл, 0.2 ммоль, 6.1 экв.) и изопропилбромид (0.009 мл, 0.1 ммоль, 3 экв.) были добавлены к раствору основания (**43**) (10 мг, 0.033 ммоль, 1 экв.) в ацетонитриле (0.5 мл). Реакционная смесь была выдержана при 100 °С в течение 7 дней. Наличие продукта в реакционной подтверждено данными LC-MS. Масс-спектр, m/z : 344.1394 $[M+H]^+$ (расчет. для $C_{15}H_{19}N_3O_4F_2$ 344.1416 $[M+H]^+$).

Соединения (52) и (53). DIEA (1.28 мл, 7.5 ммоль, 10 экв.) и изопропилбромид (0.35 мл, 3.75 ммоль, 5 экв.) добавляли к раствору 2-аминобензимидазола (**50**) (100 мг, 0.75 ммоль, 1 экв.) в 1 мл DMF. Реакционные смеси выдерживались при 100 °С в течение 23 ч. После удаления растворителя *in vacuo* остаток был растворен в $CHCl_3$ (10 мл). Органический слой промыли 0.1 М ТЕАВ (3 × 10 мл), высушили и сконцентрировали. Целевые соединения были выделены колоночной хроматографией на силикагеле (10 × 100 mm, элюировали в градиенте метанола в хлороформе, 1 - 10 %, 100 мл, скорость потока 1.7 мл/мин).

Соединение (52).

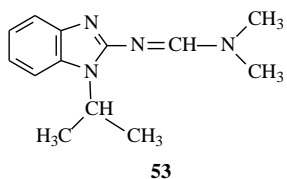


Выход: 0.01 г (7 %); белый аморфный порошок; чистота 95.0 % (ВЭЖХ: метод (II), R_t = 11.9 мин). Масс-спектр, m/z : 189.1143 $[M+H]^+$ (расч. для $C_{10}H_{12}N_4$ 189.1135 $[M+H]^+$). 1H -спектр (**52**) приведен в Приложении 28.

1H ЯМР (ДМСО- d_6 , J , Гц, 30 °С): δ , м.д. = 11.7 (уш. с, 1H, NH), 8.65 (с, 1H, N=CH), 7.23 (дд, J = 9.3, 2H, H4, H7), 6.98 (дд, J = 9.3, 2H, H5, H6), 3.15 (с, 3H, NCH₃), 3.03 (с, 3H, NCH₃).

^{13}C ЯМР (176 МГц; δ , м.д.): 158.15 (N=C), 120.5 (C5 и C6), 113.02 (C4 и C7), 40.77 (CH₃), 34.79 (CH₃). ^{14}N ЯМР (71 МГц; δ , м.д.): 194.4 (N=CH), 96.51 (NMe₂).

Соединение (53).

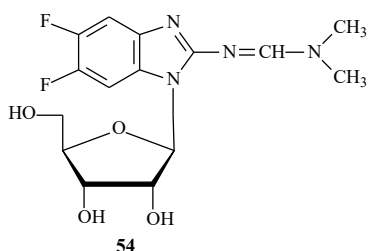


Выход: 0.064 г (38 %); белый аморфный порошок; чистота 95.9 % (R_t = 17.9 мин, ВЭЖХ: метод (VI). Масс-спектр, m/z : 231.1658 $[M+H]^+$ (расч. для $C_{13}H_{18}N_4$ 231.1604 $[M+H]^+$). 1H -спектр (**53**) приведен в Приложении 29.

^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , J , Гц, 30 °С): δ , м.д. = 8.64 (с, 1H, N=CH), 7.41 (д, 1H, $J = 7.8$, H7), 7.31 (д, $J = 7.8$, 1H, H4), 7.00 (дд, $J = 9.3$, 1H, H5), 6.96 (дд, $J = 9.3$, 1H, H6), 5.02 (м, 1H, N-CH), 3.14 (с, 3H, NCH₃), 3.05 (с, 3H, NCH₃), 1.51 (уш. сигн., 6H, CH-CH₃). ^{13}C ЯМР (176 МГц; δ , м.д.): 157.67 (N=C), 157.45 (C2), 142.61 (C8), 133.52 (C9), 120.76 (C5), 119.57 (C6), 116.85 (C4), 110.31 (C7), 45.46 (NCH-CH₃), 40.65 (N-CH₃), 34.72 (N-CH₃), 21.24 (CH-CH₃).

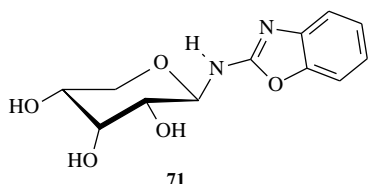
^{14}N ЯМР (71 МГц; δ , м.д.): 202.46 (N3), 192.91 (N=CH), 150.91 (N1), 96.91 (NMe₂).

Соединение (54).



DIEA (0.022 мл, 0.132 ммоль, 2 экв.) и изопропилбромид (0.006 мл, 0.066 ммоль, 1 экв.) добавляли к раствору нуклеозида (**33**) в 0.5 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали при 100 °С в течение 3 дней. Наличие соединения (**54**) в реакционной смеси подтверждали данными хромато-масс-спектрометрии. Масс-спектр, m/z : 357.1354 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (расч. для C₁₅H₁₈N₄O₄F₂ - 357.1369 $[\text{M}+\text{H}]^+$).

N^2 -(β -D-рибопиранозил)-2-аминобензоксазол (**71**).



Смесь 2-амино-1,3-бензоксазола (**50**) (0.02 г, 2 ммоль), Urd (0.366 г, 20 ммоль), UP (540 е.а.) и PNP (550.8 е.а.) в К-фосфатном буфере (20 ммоль, 75 мл, pH 7.0) термостатировали при 50 °С в течение 744 ч, контроль образования нуклеозида (**71**) осуществляли с помощью ВЭЖХ (метод (I), R_t : Ura - 2.1, Urd - 2.5, (**50**) – 7.0; (**71**) – 7.6 мин). Растворитель удаляли в вакууме до 4 мл; нуклеозид (**71**) выделяли препаративной ВЭЖХ (C₁₈, 20 × 250 мм; MZ-preparative, Germany), продукт элюировали в линейном градиенте MeOH от 0 до 20 %. Фракции, содержащие нуклеозид (**71**) объединяли, растворитель удаляли в вакууме.

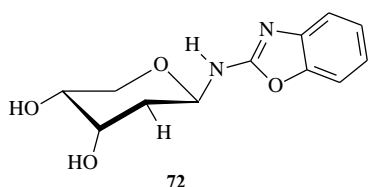
Выход (**71**): 0.01 г (25 %), чистота 93 % по данным ВЭЖХ, метод (I). УФ-спектр (H₂O): λ_{max} : 240 и 278 нм при pH 7. Масс-спектр, m/z (ESI, (+)), (%): 267.09684 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (расч. для C₁₂H₁₄O₅N₂: 267.09810 $[\text{M}+\text{H}]^+$), 135.05514 $[\text{основание}+\text{H}]^+$ (расч. 135.05510). ^1H -спектр (**71**) приведен в Приложении 30.

^1H ЯМР (ДМСО-*d*6, *J*, Гц, 30 °C): δ , м.д. = 8.49 (д, $^3J_{\text{NH},\text{H1}'} = 9.3$, 1H, NH), 7.38 (д, $^3J_{\text{H4},\text{H5}} = 7.9$, 1H, H4), 7.28 (д, $^3J_{\text{H7},\text{H6}} = 7.7$, 1H, H7), 7.14 (дт, $^3J_{\text{H6},\text{H5}} = ^3J_{\text{H6},\text{H7}} = 7.7$, $^4J_{\text{H6},\text{H4}} \approx 1$, 1H, H6), 7.01 (дт, $^3J_{\text{H5},\text{H4}} = ^3J_{\text{H5},\text{H6}} = 7.8$, $^4J_{\text{H5},\text{H7}} \approx 1$, 1H, H5), 5.035 (т, $^3J_{\text{H1}',\text{NH}} = ^3J_{\text{H1}',\text{H2}'} = 9.14$, 1H, H1'), 4.85 (д, $^3J_{\text{OH},\text{H3}'} = 3.6$, 1H, 3'-ОН), 4.77 (д, $^3J_{\text{OH},\text{H2}'} = 7.0$, 1H, 2'-ОН), 4.69 (д, $^3J_{\text{OH},\text{H4}'} = 5.8$, 1H, 4'-ОН), 3.93 (м, $^3J_{\text{H3}',\text{OH}} = 3.6$, $^3J_{\text{H3}',\text{H2}'} = 2.8$, $^3J_{\text{H3}',\text{H4}'} \approx 2$, 1H, H3'), 3.53 (м, $^3J_{\text{H4}',\text{OH}} = 5.8$, $^3J_{\text{H4}',\text{H5}'} \approx 5$, $^3J_{\text{H4}',\text{H3}'} \approx 2$, 1H, H4'), 3.53 (дд, $^2J_{\text{H5}',\alpha,\text{H5}'\beta} = 11.0$, $^3J_{\text{H5}',\alpha,\text{H4}'} \approx 3$, 1H, H5' α), 3.47 (дд, $^2J_{\text{H5}'\beta,\text{H5}'\alpha} = 11.0$, $^3J_{\text{H5}'\beta,\text{H4}'} \approx 5$, 1H, H5' β), 3.40 (тд, $^3J_{\text{H2}',\text{H1}'} = 9.1$, $^3J_{\text{H2}',\text{OH}} = 7$, $^3J_{\text{H2}',\text{H3}'} = 2.8$, 1H, H2').

^{13}C ЯМР (176 МГц; ДМСО-*d*6, 30 °C): δ , м.д. = 162.42 (C2), 148.35 (C4a), 143.22 (C7a), 124.21 (C6), 121.02 (C5), 116.29 (C7), 109.19 (C4), 81.35 (C1'), 71.27 (C3'), 69.99 (C2'), 67.53 (C4'), 64.73 (C5').

^{15}N ЯМР (71 МГц; ДМСО-*d*6, 30 °C): $\delta = 84.3$ м.д. (NH).

***N*²-(2-Дезокси- β -D-рибопиранозил)-2-аминобензоксазол (72).**



Смесь 2-амино-1,3-бензоксазола (**50**) (0.02 г, 2 ммоль), dUrd (0.068 г, 4 ммоль), UP (246 е.а.) и PNP (149 е.а.) в К-фосфатном буфере (20 ммоль, 75 мл, pH 7.0) термостатировали при 50 °C в течение 744 ч, контроль образования нуклеозида (**72**) осуществляли с помощью ВЭЖХ (метод (I); R_t : Ura – 2.1, dUrd – 2.5, (**50**) – 7.0; (**72**) – 8.9). Растворитель удаляли в вакууме до 3 мл; продукт выделяли препаративной ВЭЖХ (C18, 20 \times 250 мм; MZ-preparative, Germany), продукт элюировали в линейном градиенте MeOH в воде от 0 до 20 % (объемн.). Фракции, содержащие нуклеозид (**71**) объединяли, растворитель удаляли в вакууме.

Выход (**72**): 0.003 г (8 %) чистотой 94 % по данным ВЭЖХ (метод (I)). УФ-спектр (H_2O), $\lambda_{\text{max}} = 270$ и 227 нм (pH 7). Масс-спектр, m/z : 251.1032 [$M+\text{H}$]⁺ (рассч. для $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{N}_2$: 251.1001), 273.08183 [$M+\text{Na}$]⁺, 135.05366 [основание+H]⁺ (рассч. 135.0540). ^1H -спектр (**72**) приведен в Приложении 31.

^1H ЯМР (ДМСО-*d*6, *J*, Гц, 30 °C): δ , м.д. = 8.62 (д, $^3J_{\text{NH},\text{H1}'} = 9.0$, 1H, NH), 7.39 (д, $^3J_{\text{H4},\text{H5}} = 7.9$, 1H, H4), 7.29 (д, $^3J_{\text{H7},\text{H6}} = 7.8$, 1H, H7), 7.15 (дт, $^3J_{\text{H6},\text{H5}} = ^3J_{\text{H6},\text{H7}} = 7.9$, 1H, H6), 7.04 (дт, $^3J_{\text{H5},\text{H4}} = ^3J_{\text{H5},\text{H6}} = 7.7$, 1H, H5), 5.0 (дт, $^3J_{\text{H1}',\text{NH}} = ^3J_{\text{H1}',\text{H2}'\alpha} = 9.8$, $^3J_{\text{H1}',\text{H2}'\beta} = 2.2$, 1H, H1'), 4.81 (д, $^3J_{\text{OH},\text{H3}'} = 5.6$, 1H, 3'-ОН), 4.48 (д, $^3J_{\text{OH},\text{H4}'} = 3.2$, 1H, 4'-ОН), 3.73 (м, $^3J_{\text{H3}',\text{OH}} = 5.6$, $^3J_{\text{H3}',\text{H2}'} = 10$, $^3J_{\text{H3}',\text{H2}'\beta} = 4.1$, $^3J_{\text{H3}',\text{H4}'} < 1$, 1H, H3'), 3.55 (м, $^3J_{\text{H4}',\text{OH}} = 3.2$, $^3J_{\text{H4}',\text{H5}'\alpha} = 2.8$, $^3J_{\text{H4}',\text{H5}'\beta} = 1.1$, $^3J_{\text{H4}',\text{H3}'} < 1$, 1H, H4'), 3.75 (дд, $^2J_{\text{H5}'\alpha,\text{H5}'\beta} = 12.0$, $^3J_{\text{H5}'\alpha,\text{H4}'} = 2.8$, 1H, H5' α), 3.48 (дд, $^2J_{\text{H5}'\beta,\text{H5}'\alpha} = 12$, $^3J_{\text{H5}'\beta,\text{H4}'} = 1.8$,

^1H , $\text{H5}'\beta$), 1.92 (тд, $^2J_{\text{H2}'\alpha, \text{H2}'\beta} = 12.4$, $^3J_{\text{H2}'\alpha, \text{H1}'} = 9.8$, $^3J_{\text{H2}'\alpha, \text{H3}'} = 10.0$, ^1H , $\text{H2}'\alpha$), 1.76 (тд, $^2J_{\text{H2}'\beta, \text{H2}'\alpha} = 12$, $^3J_{\text{H2}'\beta, \text{H1}'} = 2.2$, $^3J_{\text{H2}'\beta, \text{H3}'} = 4.1$, ^1H , $\text{H2}'\beta$).

^{13}C ЯМР (176 МГц; $\text{DMCO-}d_6$, 30 °C): δ , м.д. = 161.50 (C2), 148.24 (C4a), 143.0 (C7a), 124.18 (C6), 121.05 (C5), 116.31 (C7), 109.15 (C4), 80.33 (C1'), 68.14 (C3'), 66.86 (C4'), 67.66 (C5'), 34.82 (C2').

^{15}N ЯМР (71 МГц; $\text{DMCO-}d_6$, 30 °C): $\delta = 88.93$ м.д. (NH).

Исследование противовирусной активности нуклеозидов в отношении вируса простого герпеса 1-го типа (HSV-1)

Исследования проводились на базе ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.

Штаммы HSV-1, используемые в исследование. Эталонный штамм L_2 (HSV-1/ L_2) был получен из Государственной коллекции музея вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения России. Устойчивые к действию препаратов штаммы. Устойчивые к ацикловиру (ACV) штаммы **HSV-1/ $\text{L}_2/\text{R}_{\text{ACV}}$** и **HSV-1/ $\text{L}_2/\text{R}_{\text{P-ACV}/2}$** были получены путем проведения серийного пассирования эталонного штамма HSV-1/ L_2 в присутствии ACV и P-ACV в среде поддержки, соответственно. Штамм **HSV-1/ $\text{F}(+)/\text{R}_{\text{PFA}}$** , устойчивый к фоскарнету, и штамм **HSV-1/ $\text{L}_2/\text{R}_{\text{ACV+PFA}}$** , устойчивый как к ацикловиру, так и к фоскарнету, были получены из НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского. Штамм **HSV-1/ Avd** , устойчивый к ацикловиру и цидофовиру, был изолирован из клинического материала в соответствии с методом выделения вируса в культуре тканей, используемым в международной практике [178. Parris, 1982].

Препараты сравнения. Рибавирин (Sigma, рег. номер 36791-04-5), марибавир (MedChem Express, рег. номер 176161-24-3), ацикловир (ACV, Sigma, рег. номер 59277-89-3), тринатриевая соль фосфономуравьиной кислоты (Foscarnet, PFA, Sigma, рег. номер 34156-56-3), цидофовир (CDV, Sigma, рег. номер 113852-37-2).

Клеточная линия - культура клеток перевиваемых линий почек зеленой мартышки Vero E6. Использовали 24-часовые монослойные культуры клеток. Условия культивирования: 37 °C в атмосфере 5% CO_2 . Монослойные клеточные культуры выращивали в 96-луночных пластиковых планшетах (Linbro, "Flow Laboratories", UK). Среда поддержки (если не указана иная) - среда Игла (Институт полиомиелита и вирусного энцефалита РАМН, Россия) с добавлением 7% эмбриональной телячьей сыворотки (PanEco, Россия).

Изучение противовирусной активности соединений *in vitro* проводили в соответствии с принятым в международной практике методом ингибирования развития вирусиндуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ) (*CPE inhibition assay*) [179-181].

Оценка противогерпетической активности нуклеозидов (8) – (19), (27) – (30) и (43) - (46) в отношении эталонного штамма HSV-1/L₂. В 96-луночных пластиковых планшетах со сформировавшимся клеточным монослоем готовили серийные разведения соединений с кратностью 2 в среде поддержки (среда Игла и среда 199 в соотношении 1:1). Затем вносили инфекционный материал, в конечном разведении, обеспечивающим множественность инфицирования (м.и.) 0.1 БОЕ/кл или 0.01 БОЕ/кл. Каждое соединение исследовали в двух параллелях при каждой м. и. Ставилось три контроля: (i) контроль токсичности, где неинфицированные клетки пассировались в присутствии препарата в том же диапазоне концентраций, что и в опыте; (ii) контроль вируса, где клетки инфицировали в условиях, описанных выше, но среда поддержки не содержала препарат; (iii) контроль клеток, где неинфицированные клеточные культуры инкубировались в среде поддержки, не содержащих препарат. Через 48 ч и 72 ч, когда в контроле вируса развивался 95-100% ЦПЭ, оценивали противовирусную активность путем определения ИД₅₀ и ИД₉₅ - концентраций соединений, ингибирующих развитие вирусиндуцированного (ЦПЭ) по сравнению с контролем соответственно на 50% и практически полностью.

Изучение цитотоксичности. Токсические свойства соединений *in vitro* оценивали после 72 ч инкубации клеток в присутствии соединения в известной концентрации по состоянию клеточного монослоя с определением максимально переносимой концентрации (МПК) соединения, не вызывающей деструктивных изменений клеточного монослоя по сравнению с контролем. Количественно цитотоксичность определяли методом окрашивания клеток трипановым синим (*trypan blue exclusion method*) и выражали как ЦД₅₀ - концентрацию препарата, в присутствии которой погибает 50 % клеток [182 – 184].

Оценка противогерпетической активности рибозида 43 в отношении штаммов HSV-1, устойчивых к препаратам, применяемым в клинической практике.

Противовирусная активность рибозида 43 дополнительно оценивалась с помощью метода снижения величины инфекционного титра вируса (*virus yield reduction assay*) в соответствии со стандартным протоколом [171, 185]. Сформировавшиеся монослойные культуры клеток *Vero E6*, выращенные в 12-луночных планшетах (Corning, США) инфицировали с множественностью 0.1 БОЕ/кл. Через 1 час инфекционный материал удаляли, клеточные культуры дважды промывали раствором Хенкса, вносили среду поддержки состоящую из сред 199 и Игла, соединенных в равных соотношениях (ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова»), содержащие тестируемое соединение в известной концентрации - от 0 мкг/мл (контроль вируса) до 125 мкг/мл. Планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Через 48 ч инфицированные культуры клеток с культуральной жидкостью подвергали троекратному замораживанию-оттаиванию,

полученную суспензию центрифугировали (5000 об/мин 5 минут при 4 °С) и хранили при -70 °С. Из полученных образцов вирусосодержащего материала готовили серийные разведения с кратностью 10 и использовали для заражения клеточных монослойных культур. После часовой адсорбции клетки дважды отмывали раствором Хенкса и вносили среду покрытия, состоящую из среды Игла, эмбриональной телячьей сыворотки (5 %, произв. «ПанЭко», Москва) и 0.4 % агарозы (“SIGMA”, USA). Клеточные культуры инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 37°С. Через 48 ч клетки фиксировали 10 % формальдегидом, окрашивали раствором генцианвиолета (0.5 % в 70 % метаноле), подсчитывали бляшки. Величину инфекционного титра выражали в lg БОЕ/мл.

Исследования противовирусной активности нуклеозидов (8) - (19), (43), (44) в отношении инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита.

Проводились на базе ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.

Вирус. Штамм Абсеттаров вируса клещевого энцефалита (КЭ), получен из Государственной коллекции вирусов (ГКВ), где хранился в ГКВ в виде лиофилизированной мозговой суспензии новорожденных мышей, содержащей вирус в титре 6.0 lg ТЦИД₅₀/мл для культур клеток СПЭВ. В опытах использовали вирус в дозе 0.1 (при первичном скрининге) и 0.01 lg ТЦИД₅₀/клетка. Титры штамма Абсеттаров вируса КЭ для культур клеток Vero V составляли 4.0 lg ТЦИД₅₀/мл.

Препарат сравнения - рибавирин (Sigma, рег. номер 36791-04-5).

Клеточная линия - перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки (Vero-V).

Питательная среда - среда Игла МЭМ с добавлением 10% сыворотки эмбриона телят и антибиотиков. Клетки выращивали в 96-луночных панелях до формирования полного монослоя и затем изучали цитотоксические свойства соединений и их противовирусные свойства, заражая вирусом КЭ.

Изучение противовирусной активности. Нуклеозиды растворяли в DMSO таким образом, чтобы исходная их концентрация составляла 10 мг в мл. Затем соединения разводили в среде Игла МЭМ, начиная с 1:10 (20 мкл раствора соединений в DMSO вносили в 180 мкл среды Игла МЭМ), последующие разведения соединений были двукратными. Таким образом, в исследовании использовали разведения соединений от 1:10 до 1:640. По 20 мкл каждого разведения вносили в лунки с монослоем клеток для изучения их цитотоксического и противовирусного действия. Конечная концентрация соединений, содержащихся в лунках, соответствовала от 100 до 1.55 мкг/мл.

Изучение цитотоксичности. Цитотоксические свойства соединений исследовали в конечных концентрациях от 100 до 1.55 мкг/мл при инкубировании в течение 72 часов при 37

°C. Затем монослой клеток окрашивали метиленовым синим, подсчитывали процент жизнеспособных клеток, и рассчитывали ЦД₅₀ - минимальную концентрацию препарата, которая вызывает гибель 50 % клеток монослоя, используя цитометр фирмы «Инвитроген».

Оценка результатов. Противовирусный эффект определяли по способности разных концентраций нуклеозидов защищать клетки Vero-V от цитодеструктивного действия вируса, если монослой клеток обрабатывали соединениями за 6 часов до заражения клеток, в момент заражения клеток и через 6 часов после заражения. Через 6-7 дней инкубации монослой клеток обрабатывали метиленовым синим и подсчитывали процент клеток, сохранивших жизнеспособность. Рассчитывали величину ИД₅₀ - минимальную концентрацию соединений, которая обеспечивала жизнеспособность 50 % клеткам монослоя, инфицированного вирусом КЭ.

Исследования цитотоксической активности нуклеозидов (10), (27)-(30) на опухолевых клетках человека.

Проводились на базе НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина, в лаборатории клеточного иммунитета.

Клеточная линия - клетки Т-лимфобластного лейкоза человека (лейкемическая моноцитарная лимфома человека линии U937).

Препарат сравнения - неларабин (Sigma, рег. номер 121032-29-9).

Питательная среда содержала 2 мМ глутамина и 10 % эмбриональной сыворотки теленка.

Эксперимент. Перед началом эксперимента все соединения растворялись в питательной среде RPMI1640 в нужной концентрации. Условия инкубирования: 37 °C и содержание в атмосфере 5 % CO₂. Клетки инкубировали без антибиотиков. Цитотоксическую активность оценивали по влиянию соединений на выживаемость клеток с помощью МТТ-теста, который основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенную соль тетразолия в голубые кристаллы формазана, растворимые в ДМСО. В процессе эксперимента клетки рассеивали в 96-луночные планшеты по 8000 клеток в лунку. Соединения вносили в лунки в объеме 20 мкл. Общий объем инкубации составлял 200 мкл. Клетки с соединениями инкубировали в указанных выше условиях в течении 96 часов. По окончании инкубации к клеткам добавляли МТТ-реагент и инкубировали далее в течении 2 часов. Затем образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО при 37 °C в течении 20 мин. Оптическое поглощение растворов ДМСО измеряли на оптическом счетчике для многолуночных планшетов при длине волны 540 нм.

Оценка результатов. Результаты выражали в виде средних значений для четырех параллельных измерений в 2-3 экспериментах как выживаемость клеток в % (опыт/контроль) ×

100. Соединение считали активным, если его концентрация, вызывающая ингибирование роста на 50 % (ИД₅₀, вычисленная по кривой доза-эффект) была равна или меньше ИД₅₀ неларабина. Максимально допустимая концентрация тестируемых соединений не превышала 100 μ M. Ошибка измерений не превышала 5 %.

Заключение

В результате выполнения комплекса экспериментальных работ можно сделать следующие выводы:

1. Определены критерии субстратной специфичности пури nukлеозидфосфорилаз 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-деокси-2-фторарабинозидов позволила достичь в среднем конверсии замещенного бензимидазола в нуклеозид - 65 %, при том, что оба субстрата реакции (1- α -фосфат-2-деокси-2-фторарабинозы и основание) структурно отличаются от природных субстратов PNP;
 - C2-амино-5,6-дизамещенные бензимидазолы являются субстратами пури nukлеозидфосфорилазы, однако конверсия оснований в 2'-дезоксирибозиды не превышала 56 %, а конверсия в рибозиды составила 82 и 95 %;
 - активный центр PNP акцептирует бензимидазолы как с небольшими по объему заместителями (фтор, метокси, этокси), так и с объемными (морфолин, пиролл) в C5 (или C6) положениях бензольного кольца;
 - в результате ферментативной реакции синтеза нуклеозидов бензимидазола образуется смесь N1-N3 региоизомеров: в случае с морфолин- и пиролл-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 ± 0.04 mM);
 - исследование субстратной специфичности PNP *E. coli* 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-дезоксидезокси-2-фторарабиноза) для тестирования биологической активности:
- 4,6-дифтор-5-замещенных-нуклеозидов бензимидазола рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов (12 соединений с выходами от 60 до 94 % и чистотой в среднем > 95 %);
 - 2'-дезоксидезокси-2-фторарабинозиды 5,6-, 4,6- и 4,5,6-замещенного бензимидазола (4 соединения с выходами от 40 до 55 % и чистотой > 98 %);
 - 2-амино-5,6-дизамещенные нуклеозиды бензимидазола рибо- и 2-дезоксирибонуклеозидов (4 соединения с выходом от 35 до 87 % и чистотой > 98 %).
3. Проведено изучение противовирусной активности всех синтезированных в работе нуклеозидов на моделях вируса простого герпеса 1-го типа (эталонный штамм *L*₂) (HSV-1) 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), включая штаммы 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 сокращений

1-P-FAra	– 2-дезоксид-2-фтор- α -D-арабинофуранозид-1-фосфат
ABR	– 1-O-ацетил-2,3,5-три-O-бензоил- β -D-рибофуранозид
ACV	– ацикловир
Ara ^{fur} -BI	– 1- β -D-арабинофуранозид бензимидазола
BI	– бензимидазол
BI ^m	– модифицированный бензимидазол
BDCRB	– 2-бром-5,6-дихлор-1-(β -D-рибофуранозил)бензимидазол
BSA	– N,O-бис(триметилсилил)ацетамид
CDV	– цидофовир
CMV	– цитомегаловирус (HCMV)
Cl ₄ RB	– 2,4,5,6-тетрахлор-1-(2,3,5-три-O-ацетил- β -D-рибофуранозил)бензимидазол
COSY	– гомоядерная корреляционная спектроскопия ЯМР
DAST	– диэтиламиносульфотрифторид
DBU	– 1,5-диазабицикло[5.4.0]ундец-5-ен
DIEA	– диизопропилэтиламин
DMAP	– диметиламинопиридин
DMF	– диметилформамид
DRB	– 5,6-дихлор-1-(β -D-рибофуранозил)бензимидазол
dAdo	– 2'-дезоксиаденозин
dIno	– 2'-дезоксиинозин
dRib	– остаток 2-дезоксид- β -D-рибофуранозид
dUrd	– 2'-дезоксидуридин
EDIPA	– диизопропилэтиламин
FAra	– остаток 2-дезоксид-2-фтор- β -D-арабинофуранозид
GCV	– ганцикловир
Guo	– гуанозин
HSV-1, HSV-2	– вирусы простого герпеса 1 и 2 типа
HIV	– вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)
HMBC	– гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия
HMDS	– гексаметилдисилазан
HSQC	– гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия
Нур	– гипоксантин
IDCRB	– 5,6-дихлор-2-йод-1- β -D-рибофуранозилбензимидазол
Ino	– инозин
KB	– фибробласты крайней плоти человека
MOM	– метоксиметил

NBS	– N-бромсукцинимид
NDTs	– N-дезоксирибозилтрансферазы
NOE	– спектроскопия основанная на ядерном эффекте Оверхаузера (Nuclear Overhauser Effect)
NPs	– нуклеозидфосфорилазы
PCV	– пенцикловир
PFA	–фосфономуравьиной кислоты тринатриевая соль
Pfr	– остаток пентофуранозы
PNP	– пурииннуклеозидфосфорилаза
PyNP	– пиримидиновые нуклеозидфосфорилазы
Rib	– остаток β -D-рибофуранозы
RSV	– респираторно-синцитиальный вируса человека
TAR	– 1,2,3,5-тетра-O-ацетил- β -D-рибофураноза
TCRB	– 2,5,6-трихлор-1-(β -D-рибофуранозил)бензимидазол
TDA-1	– трис[2-(2-метоксиэтокси)этил]амин
Thd	– тимидин
TK	– тимидинкиназа
TSA	– <i>n</i> -толуолсульфокислота
TFA	– трифторуксусная кислота
TMS	– триметилхлорсилан
TMSOTF	– триметилсилилтрифторметансульфонат
TP	– тимидинфосфорилаза
UP	– уридинфосфорилаза
Urd	– уридин
VZV	– вирус Варицелла-Зостер
БОЕ	– бляшкообразующая единица
DMCO	– диметилсульфоксид
е. а.	– единица активности PNP
ИД ₅₀ и ИД ₉₅	– концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта на 50% и практически полностью
КЭ	– клещевой энцефалит
МАК	– минимальная активная концентрация
МПК	– максимально переносимая концентрация
СПЭВ	– линия клеток почки эмбриона свиньи
ЦД ₅₀	– концентрация соединения, вызывающая гибель 50 % клеток
ЦПЭ	– вирусиндуцированный цитопатический эффект
ХТИ	– химиотерапевтический индекс (ХТИ=ЦД ₅₀ /ИД ₅₀)

Список литературы

1. De Clercq, E. Looking back in 2009 at the dawning of antiviral therapy now 50 years ago an historical perspective. // *Adv. Virus Res.* 2009. V.73. P. 1-53.
2. Biron, K. K., Harvey, R. J., Chamberlain, S. C., Good, S.S., Smith III, A. A., Davis, M. G. et al. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. P. 2365-2372.
3. Prichard, M. N., Frederick, S. L., Daily S., Borysko K. Z., Townsend L. B., Drach J. C., Kern E. R. Benzimidazole analogs inhibit human herpesvirus 6. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. V. 55(5). P. 2442-2445.
4. Williams, S. L., Hartline, C. B., Kushner, N. L., Harden, E. A., Bidanset, D. J., Drach, J. C., Townsend, L. B. *In vitro* activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. V. 47, P. 2186.
5. Krosky, P. M., Borysko, K. Z., Nassiri, M. R., Devivar, R. V., Pink, R. G., Davis, M. G., Biron, K. K., Townsend, L. B., Drach, J. C. Phosphorylation of beta-D-ribosylbenzimidazoles is not required for activity against human cytomegalovirus. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, V. 2, P. 478-486.
6. Hwang, J. S., Schilf, R., Drach, J. C., Townsend, L. B., Bogner, E. Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates and other herpesviruses to new acetylated, tetrahalogenated benzimidazole D-ribonucleosides. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. V. 53. P. 5095.
7. Tamm, I., Folkers, K., Shunk, C. H., Horsfall, F. L., Jr. Inhibition of Influenza Virus Multiplication by N-Glycosides of Benzimidazoles. // *J. Exp. Med.* 1954. V. 99 (3). P. 227-250.
8. Tamm, I., Sehgal, P. B. Halobenzimidazole Ribosides and RNA Synthesis of Cells and Viruses. // *Adv. Virus Res.* 1978. V. 22. P. 187- 258.
9. Tamm, I., Overman, J. R. Relationship Between Structure of Benzimidazole Derivatives and Inhibitory Activity on Vaccinia Virus Multiplication. // *Virology.* 1957. V. 3, P. 185-196.
10. Pothier, P., Dru, A., Beaud, G. The Inhibition of Vaccinia Virus Replication by 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB): An Effect At The Assembly Stage. // *J. Gen. Virol.* 1981. V. 55. P. 87-94.
11. Bucknall, R. A. The Effects of substituted benzimidazoles on the growth of viruses and the nucleic acid metabolism of host cells. // *J. Gen. Virol.* 1967. V. 1. P. 89-99.

12. Townsend, L. B., Devivar, R. V., Turk, S. R., Nassiri, M. R., Drach, J. C. Design, Synthesis, and Antiviral Activity of Certain 2,5,6-Trihalol-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazoles. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. P. 4098-4105.
13. Wang, J., Gong, S., Fu, Y., Xue, Q., Chen, G., Liu, Y. Effect of DRB on the Biological Characteristics of Human Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cell Line. // *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2007. V. 27 (1). P. 104-106.
14. Kazimierczuk, Z., Dudyu, L., Stolarski, R., Shugar, D. Preparation of 1- α -D-arabinofuranosylbenzimidazole and its 5,6-dichloro derivative, and the direct bromination of benzimidazole nucleosides. // *Z. Naturforsch.* 1980. V. 35. P. 30-35.
15. Tamm, I., Sehgal, P. B. Halogenated benzimidazole ribosides novel inhibitors of RNA synthesis. // *Biochemical Pharmacology*. 1978. V. 27. P. 2475-2485.
16. Kissman, H. M., Child, R. G., Weiss, M. J. Synthesis and biological properties of certain dichlorobenzimidazole ribosides. // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. V. 79. P. 1185-1188.
17. Diwan A., Gowdy C. N., Robins R. K., Prusoff W. H. Anti-viral Activity of 5,6-Dichloro-1-(2'-Deoxy- β -D-Ribofuranosyl)Benzimidazole and Related Derivatives. // *J. Gen. Virol.* 1968. V. 3. P. 393-402.
18. Gosselin, G., Perigaud, C., Bergogne, M.-C., Balzarini, J., De Clercq, E., Imbach, J.-L. Synthesis and biological evaluation of new 5,6-dichlorobenzimidazole nucleoside derivatives. // *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 1994. V. 5(4). P. 243-256.
19. Zou, R., Ayres, K. R., Drach, J. C., Townsend, L. B. Synthesis and Antiviral Evaluation of Certain Disubstituted Benzimidazole Ribonucleosides. // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 3477-3482.
20. Townsend, L. B., Revankar, G. R. Benzimidazole nucleosides, nucleotides, and related derivatives. // *Chem. Rev.* 1970. V. 70. P. 389-438.
21. Smith, C. M., Zombor, G., Henderson, J. F. Inhibitors of hypoxanthine metabolism in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. // *Cancer Treat. Rep.* 1976. V. 60. P. 1567-1583.
22. De Clercq E. New inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) on the horizon. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. V. 51. P. 1079-1083.
23. Helgstrand, E., Eriksson, B., Johansson, N.G., Lannero, B., Larsson, A., Misiorny, A., Noren, J.O., Sjoberg, B., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S., Oberg, B. Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound.// *Science*. 1978. V. 201. P. 819-821.

24. Куханова, М.К., Коровина, А.Н., Кочетков, С.Н. Вирус простого герпеса человека: жизненный цикл и поиски ингибиторов. // *Успехи биологической химии*. 2014. V. 54. P. 457-494.
25. Coen, D.M., Schaffer, P.A. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets.// *Nature reviews Drug discovery*. 2003. V. 2. P. 278-288
26. De Clercq, E., Field, H.J. Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. // *British journal of pharmacology*. 2006. V. 147. P. 1-11.
27. Townsend, L. B., Drach, J. C., et al. Benzimidazole ribonucleosides: design, synthesis, evaluation, and mode of action. //Presented at the Fiflh Internat. Conf. Antiviral Res., Vancouver, BC, 1992. Abstracts 12, pp. 105, 107, 108, 110.
28. Underwood, M. R., Biron, K. K., Hemphill, M. L., Miller, T.J., Stanat, S. C., Dornsife, R. E., Drach, J. C., Townsend, L. B., Edwards, C. A., Harvey, R. J. High molecular weight HCMV NA does not properly mature in the presence of 2-bromo-5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidazol (BDCRB).// Presented at the Herpesvirus Workshop, Pittsburgh, PA, July 1993, Abstracts.
29. Underwood, M. R., Stanat, S. C., Drach, J. C., Harvey, R. J., Biron, K. K. Inhibition of HCMV DNA processing by a new class of anti-HCMV compounds is mediated through the UL89 gene product. // Presented at the Herpesvirus Workshop, Vancouver, BC, August 1994, Abstracts.
30. North, T. W., Sequar, G., Townsend, L. B., Drach, J. C., Barry, P. A. Rhesus cytomegalovirus is similar to human cytomegalovirus in susceptibility to benzimidazole nucleosides. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004. V. 48. P. 2760-2765.
31. Biron, K. K., Gudmundsson, K.S., Drach, J. C. Benzimidazole ribonucleosides: novel drug candidates for the prevention and treatment of cytomegalovirus diseases. // *Antiviral Drugs: From Basic Discovery Throught Clinical Trials*, First Edition, 2011, pp. 417-429.
32. Underwood, M. R., Harvey, R. J., Stanat, S. C., Hemphill, M. L., Miller, T., Drach, J. C., Townsend, L. B., Biron, K. K. Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. // *J. Virol*. 1998. V. 72(7). P. 17-725.
33. Zout, R., Kawashima, E., Freeman, G. A., Koszalka, G. W., Drach, J. C., Townsend, L. B. Design, synthesis, and antiviral evaluation of 2-deoxy-D-ribosides of substituted benzimidazoles as potential agents for human cytomegalovirus infections. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2000. V. 19 (1&2). P. 125-153.

34. Zacny, V. L., Gershburg, E., Davis, M. G., Biron, K. K., Pagano, J. S. Inhibition of Epstein-Barr Virus Replication by a Benzimidazole L-Riboside: Novel Antiviral Mechanism of 5,6-Dichloro-2-(Isopropylamino)-1- β -L-Ribofuranosyl-1H-Benzimidazole. // *Journal of Virology*. 1999. V. 73(9). P. 7271-7277.
35. Zou, R., Drach, J. C., Townsend, L.B. Design, synthesis and antiviral evaluation of 2-chloro-5,6-dihalo-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazoles as potential agents for human cytomegalovirus infections. // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 811-818.
36. Biron, K. K., Davis M. G., Stanat S. C., Walton L. M., Smith A., Koszalka G. W., Drach J. C., Townsend L. B., Harvey. R. J. Antiviral activity and mechanism of action of 1263W94, a benzimidazole riboside inhibitor of human cytomegalovirus. // In Program and Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1996. Abstract. H85, p. 178.
37. ADIS Drugs R&D PROFILE 2007. V. 8(3). P. 188-192.
38. Peabody, J.D. Maribavir isomers, compositions, methods of making and methods of using. / US Pat. 8940707 B2, 2015.
39. Budow, S., Kozłowska, M., Gorska, A., Kazimierczuk, Z., Eickmeier, H., Colla, P., Gosselin, G., Seela, F. Substituted benzimidazoles:antiviral activity and synthesis of nucleosides.// *ARKIVOC* 2009, (iii). P. 225-250.
40. Konstantinova, I.D., Selezneva, O.M., Fateev, I.V., Balashova, T.A., Kotovskaya, S.K., Baskakova, Z.M., Charushin V.N., Baranovsky, A.V., Miroshnikov, A.I., Balzarini, J., Mikhailopulo, I.A. Chemo-enzymatic syntheses and biological evaluation of 5,6-disubstituted benzimidazole ribo- and 2'-deoxyribo-nucleosides.// *Synthesis*. 2013. V. 45(2). P. 272-276.
41. Hwang, J.-S., Schilf, R., Drach, J.C., Townsend, L.B., Bogner, E. Susceptibilities of Human Cytomegalovirus Clinical Isolates and Other Herpesviruses to New Acetylated, Tetrahalogenated Benzimidazole D-Ribonucleosides. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009. V. 12. P. 5095–5101.
42. Dittmer, A., Woskobojnik, I., Adfeldt, R., Drach, J.C., Townsend, L.B., Voigt, S., Bogner, E. Tetrahalogenated benzimidazole D-ribonucleosides are active against rat cytomegalovirus. // *Antiviral Research*. 2017. V. 137. P. 102-107.
43. Drach, J. C., Bush, P. M., Ptak, R. G., Devivar, R. V., Townsend, L. B., Davis, M. G., Underwood, M. R., Biron, K. K. Halogenated Benzimidazole 5'-Deoxyribonucleosides are Potent and Selective Inhibitors of Human Cytomegalovirus Replication.// 35th Inter-science Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, September 1995.

44. Gudmundsson, K.S., Drach, J.C., Wotring, L.L., Townsend, L.B. Synthesis and Antiviral Activity of Certain 5'-Modified Analogs of 2,5,6-Trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole. // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 785-793.
45. Townsend, L.B., Gudmundsson, K.S., Daluge, S.M., Chen, J.J., Zhu, Z., Koszalka, G.W., Boyd, L. et. al. Studies Designed To Increase The Stability And Antiviral Activity (HCMV) Of The Active Benzimidazole Nucleoside, TCRB. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1999. V. 18(4&5). P. 509-519.
46. Gudmundsson, K.S., Freeman, G.A., Drach, J.C., Townsend, L.B. Synthesis of Fluorosugar Analogues of 2,5,6-Trichloro-1-(α -D-ribofuranosyl)benzimidazole as Antivirals with Potentially Increased Glycosidic Bond Stability. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. P. 2473-2478.
47. Drew, W.L., Lalezari, J.P., Wang, L.H., Miner, R.C., Aberg, J.A., Wire, M.B., Jacobson, M.A. In Vivo Anti-CMV Activity and Safety of Oral 1263W94 in HIV-Infected Subjects with Asymptomatic CMV Shedding. // *Antiviral Res.* 1998. V. 37. A70.
48. Ji, Q., Li, J., Ding, F., Han, J., Pang, M., Liu, S. and Meng, J. Regio- and stereocontrolled synthesis and conformational analysis of benzimidazole nucleosides.// *Tetrahedron*. 2006. V. 62, P. 2529 - 2536.
49. Robbins, S.K., Houlbrook, S., Priddle, J.D., Harris, A.L. 8-Cl-adenosine is an active metabolite of 8-Cl-cAMP responsible for its in vitro antiproliferative effects on CHO mutants hypersensitive to cytostatic drugs.// *Cancer Chemoter Pharmacol.* 2001. V. 48. P. 451 – 458.
50. Krosky, P.M., Underwood, M.R., Turk, S.R., Feng, K.W., Jain, R.K., Ptak, R.G. et al. Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. // *Journal of Virology*. 1998. V. 72. P. 4721-4728.
51. Wolf, D. G., Courcelle, C. T., Prichard, M. N., Mocarski, E. S. Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 4721-4728.
52. Elion, G.B., Furman, P.A., Fyfe, J.A., de Miranda, P., Beauchamp, L., Schaeffer, H.J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. // *PNAS*. 1977. V. 74. P. 5716–5720.
53. Boyd, M.R., Bacon, T.H., Sutton, D., Cole, M. Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxy- methylbut-1-yl)guanine (BRL 39123) in cell culture.//*Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987. V. 31. P. 1238–1242.
54. Oberg, B. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). // *Pharmacology & therapeutics*. 1989. V. 40. P. 213–285.

55. Weygand, F., Wacker, A., Wirth, F. Beziehungen zwischen Vitamin B₁₂, Purinen und Pyrimidinen bei *Lactobacillus leichmannii*. // *Z. Naturforsch.* 1951. V. 6b. P. 25.
56. Davoll, J., Brown, G.B. A New Synthesis of 1-Glycosylbenzimidazoles. // *This Journal*. 1951. V. 73. P. 5781-5785.
57. Betbeder, D., Hutchinson, D.W. The Enzymatic Synthesis of Imidazole Deoxynucleosides: 1- β -D-2'-Deoxyribofuranosyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide and 1- β -D-2'-Deoxyribofuranosylbenzimidazole. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1990. V. 9(4). P. 569-577.
58. Cook, W.J., Short, S.A., Ealick, S.E. Crystallization and Preliminary X-ray Investigation of Recombinant *Lactobacillus Leichmannii* Nucleoside Deoxyribosyltransferase. // *Journal of Biological Chemistry*. 1990. V. 265. P. 2682-2683.
59. Mikhailopulo, I.A., Kazimierczuk, Z., Zinchenko, A.I., Barai, V.N., Romanova, V.V., Eroshvskaya, L.A. Benzimidazoles In The Reaction Of Enzymatic Transglycosylation.// *Nucleosides & Nucleotides*. 1995. V. 14(3-5). P. 477-480.
60. Mochizuki, T., Kondo, Y., Abe, H., Tovey, S.C., Dedos, S.G., Taylor, C.W., Paul, M., Potter, B. V. L., Matsuda, A. and Shuto, S. Synthesis of adenophostin A analogues conjugating an aromatic group at the 5'-position as potent IP₃ receptor ligands. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. P. 5750-5758.
61. Wang, Z.W., Prudhomme, D.R., Buck, J.R., Park, M. and Rizzo, C.J. Stereocontrolled Syntheses of Deoxyribonucleosides via Photoinduced Electron-Transfer Deoxygenation of Benzoyl-Protected Ribo- and Arabinonucleosides. // *J. Org. Chem.* 2000. V. 65. P. 5969-5985.
62. Zhong, M.H., Nowak, I. Robins M.J. 6-(2-Alkylimidazol-1-yl)purines Undergo Regiospecific Glycosylation at N₉. // *Org. Lett.* 2005. V. 7. P. 4601-4603.
63. Zhang, X.G., Xia, H.R., Dong, X.C., Jin, J., Meng, W.-D. and Qing, F.-L. 3-Deoxy-3,3-difluoro-d-arabinofuranose: First Stereoselective Synthesis and Application in Preparation of gem-Difluorinated Sugar Nucleosides. // *J. Org. Chem.* 2003. V. 68. P. 9026-9036.
64. Niedballa, U., Vorbruggen, H. A general synthesis of pyrimidine nucleosides. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1970. V. 9. P. 461-462.
65. Ruf, K., Pfeleiderer, W. Synthesis and properties of 5,6-dichlorobenzimidazole 2'-5'- and 3'-5'-nucleotide dimers and trimers. // *Carbohydr Res.* 1991. V. 216. P. 421-39.
66. Dudycz, L.W., Wright, G.E. A simple one-pot method for 6-oxopurine ribonucleoside synthesis: control and mechanism of isomer distribution. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1984. V. 3. P. 33-44.

67. Rastogi, R., Sharma, S. 2-Aminobenzimidazoles in organic synthesis.// *Synthesis*. 1983. V. 11. P. 861-882.
68. Leonard, N.J., Curtin, D.Y., Beck, K.M. Sulfonate salts of substituted benzimidazoles. // *J. Am. Chem. Soc.* 1947. V. 69. P. 2459-2461.
69. Wright, J.B. The chemistry of benzimidazoles. // *Chem. Rev.* 1951. V. 48. P. 397-541.
70. Homer, J.R., Henry, D.W. Analogs of 3-amino-7-chloro-1,2,4-benzotriazine-1-oxide as antimalarial agents. // *J. Med. Chem.* 1968. V. 11. P. 946-949.
71. Vorbruggen, H., Krolikiewicz, K., Bennua, B. Nucleoside synthesis with trimethylsilyl triflate and perchlorate as catalysts. // *Chem. Ber.* 1981. V. 114. P. 1234-1255.
72. Devivar, R.V., Drach, J.C., Townsend, L.B. Benzimidazole ribonucleosides: observation of an unexpected nitration when performing non-aqueous diazotization with t-butyl nitrite. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1992. V. 2. P. 1105-1110.
73. Clark, R. L., Pessolano, A. A. Synthesis of some substituted benzimidazoles. // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 1657-1662.
74. Parsch, J., Engels, J.W. Synthesis of fluorobenzene and Benzimidazole Nucleic-Acid Analogues and their Influence on stability of RNA Duplexes. // *Helvetica Chimica Acta*. 2000. V. 83, P. 1791-1807.
75. Singh, R.K., Takaku, H. Synthesis and Biological Properties of 2'-5' Oligodeoxyribonucleotide, an Isomer of Biologic DNA. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1999. V. 18. P. 1403.
76. Seela, F., Bourgeois, W., Rosemeyer, H., Wenzel, T. Synthesis of 4-Substituted 1H-Benzimidazole 2'-Deoxyribonucleosides and Utility of the 4-Nitro Compound as Universal Base. // *Helv. Chim. Acta*. 1996. V. 79. P. 488-498.
77. Bhat, C.C., Zorbach, W.W., Tipson, R.S. Preparation of a Crystalline O-Acyl-2-deoxypentofuranosyl Halide.// "Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry", Eds. Interscience Publishers, New York, 1968. V. 1, pp. 521-522.
78. Kazimierczuk, Z., Cottam, H.B., Revankar, G.R., Robins, R.K. Synthesis of 2'-Deoxytubercidin, 2'-Deoxyadenosine, and Related 2'-Deoxynucleosides via a Novel Direct Stereospecific Sodium Salt Glycosylation Procedure. // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 6379-6382.

79. Kazimierczuk, Z., Stolarski, R., Shugar, D. Stereospecific Synthesis by the Sodium Salt Glycosylation Method of Halogeno Benzimidazole 2'-Deoxyribose Analogues of the Inhibitor of hnRNA Synthesis, 5,6-Dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole (DRB). // *Z. Naturforsch.* 1985. V. 40. P. 715-720.
80. Girardet, J.-L., Drach, J.C., Chamberlain, S.D., Koslalka, G.W., Townsend, L.B. Design, Synthesis and Antiviral Activity of α -L-Arabinofuranosyl Derivatives of 2-Substituted-5,6-dichlorobenzimidazoles. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1998. V. 17(12). P. 2389-2401.
81. Ekiel, I., Darzynkiewicz, E., Shugar, D. Conformational parameters of the carbohydrate moieties of α -arabinonucleosides. // *Carbohydrate Research*. 1981. V. 92. P. 21-36.
82. Townsend, L.B., Drach, J. C. Arabinofuranosyl benzimidazoles as antiviral agents. WO Pat. 1999051619 A1, 1999.
83. Townsend, L.B., Drach, J.C. Polysubstituted Benzimidazoles As Antiviral Agents. US Pat. 5360795 A, 1994.
84. Pankiewicz, K. W., Krzeminski, J., Ciszewski, L. A., Ren, W.Y., Watanabe, K. A. A Synthesis of 9-(2-Deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)adenine and Hypoxanthine. An Effect of C3'-Endo to C2'-Endo Conformational Shift on the Reaction Course of 2'-Hydroxyl Group with DAST. // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 553-559.
85. Krzeminski, J., Nawrot, B., Pankiewicz, K. W., Watanabe, K.A. Synthesis of 9-(2-Deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)hypoxanthine. The First Direct Introduction of a 2'- β -Fluoro Substituent in Preformed Purine Nucleosides. Studies Directed Toward The Synthesis of 2'-Deoxy-2'-Substituted Arabinonucleosides. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1991. V. 19. P. 781-798.
86. Pankiewicz, K.W. Fluorinated nucleosides. // *Review. Carbohydrate Research*. 2000. V. 327. P. 87-105.
87. Seela, F., Chittepu, P. 6-Azauracil or 8-aza-7-deazaadenine nucleosides and oligonucleotides: the effect of 2'-fluoro substituents and nucleobase nitrogens on conformation and base pairing. // *Org. Biomol. Chem.* 2008. V. 6. P. 596-607.
88. Howell, H.G., Brodfuehrer, P.R., Brundige, S.P., Benigne, D.A., Sapino, C. Antiviral Nucleosides. A Stereospecific, Total Synthesis of 2'-Fluoro-2'-deoxy- β -D-arabinofuranosyl Nucleosides. // *J. Org. Chem.* 1988. V. 53. P. 85-88.

89. Montgomery, J.A., Shortnacy, A.T., Carson, D.A., Secrist III, J.A. 9-(2-Deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)guanine: A Metabolically Stable Cytotoxic Analogue of 2'-Deoxyguanosine. // *J. Med. Chem.* 1986. V. 29. P. 2389-2392.
90. Holy, A., Konig, J., Vesely, J., Cech, D., Votruba, I., De Clercq, E. 5'-O-Alkyl-5-fluorouridines: Synthesis and Biological Activities. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1987. V. 52. P. 1589-1608.
91. Vorbruggen, H., Hofle, G. On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. // *Chem. Ber.* 1981. V. 114. P. 1256-1268.
92. Hanessian, S., Kagotani, M., Komaglou, K. Design and Reactivity of Organic Functional Groups-2-Pyridylsulfonates as Nucleofugal Esters: Remarkably Mild Transformation into Halides and Olefins. // *Heterocycles*. 1989. V. 28. P. 1115-1120.
93. Kissman, H.M., Weiss, M.J. 5-Deoxy-5-fluoro-D-ribofuranosyl Derivatives of Certain Purines, Pyrimidines and 5,6-Dimethylbenzimidazole. // *J. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 5559-5564.
94. Classon, B., Liu, Z. New Halogenation Reagent Systems Useful for the Mild One-Step Conversion of Alcohols into Iodides or Bromides. // *J. Org. Chem.* 1988. V. 53. P. 6126-6130.
95. Kissman, H.M., Baker, B.R. The Synthesis of Certain 5-Deoxy-D-ribofuranosylpurines. // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. V. 79. P. 5534-5540.
96. Kanazawa, T., Sato, T. D-Ribose Derivatives. II. Preparation of 2,3-Di-O-acetyl-5-deoxy-5-iodoribofuranosyl Chloride from 5-O-Triphenylmethyl-D-ribose. // *Nippon Kagaku Zasshi*. 1959. V. 80. P. 200-203.
97. Montgomery, J.A., Shortnacy, A.T., Thomas, H.J. Analogs of 5'-Deoxy-5'-(methylthio)adenosine. // *J. Med. Chem.* 1974. V. 17. P. 1197-1209.
98. Kanazawa, T. A New Synthesis of 9- β -(5'-thiomethyl-D-ribofuranosyl)adenine. // *Nippon Kagaku Zasshi*. 1960. V. 81. P. 516-517.
99. Chamberlain, S.D., Koszalka, G.W., Tidwell, J.H., Vandraanen, N. A. L-benzimidazole nucleosides. US Pat. 6204249 B1. 2001.
100. Freeman, S., Wycombe, H. Process for preparing substituted benzimidazole compounds. US Pat. 7858773 B2. 2010.
101. Li, N., Smith, T.J., Zong, M.H. Biocatalytic transformation of nucleoside derivatives. // *Biotechnology Advances*. 2010. V. 28. P. 348-366.

102. Taran, S.A., Verevkina, K.N., Esikova, T.Z., Feofanov, S.A., Miroshnikov, A.I. Synthesis of 2-chloro-2'-deoxyadenosine by microbiological transglycosylation using a recombinant *Escherichia coli* strain. // *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2008. V. 44(2). P. 181-186.
103. Lewkowicz, E.S., Martínez, N., Rogert, M.C., Porro, S., Iribarren, A.M. An improved microbial synthesis of purine nucleosides. // *Biotechnology Letters.* 2000. V. 22(16). P. 1277 - 1280.
104. Hicks, N., Hutchinson, D.W. Synthesis of Nucleoside Analogues Using Immobilised N-Deoxyribosyltransferases. // *Biocatalysis and Biotransformation.* 1994. V. 11(1). P. 1-7.
105. Holguin, J. Cardinaud, R., Salemink C.A. Trans-N-Deoxyribosylase: substrate specificity studies. // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 54. P. 515-520.
106. Betbeder, D., Hutchinson, D.W., Richards, A.O'L. The stereoselective enzymatic synthesis of 9- β -D-2'-deoxyribofuranosyl 1-deazapurine. // *Nucleic Acids Res.* 1989. V.17. V. 4217-4222.
107. Fernandez-Lucas J., Acebal C., Sinisterra J.V., Arroyo M., de la Mata I. *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides. // *Applied and environmental microbiology.* 2010. V. 76(5). P. 1462-1470.
108. Becker, J., Brendel M. Rapid purification and characterization of two distinct N-deoxyribosyltransferases of *Lactobacillus leichmannii*. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1996. V. 377. P. 357–362.
109. Danzin, C., Cardinaud R. Deoxyribosyl transfer catalysis with trans-N-deoxyribosylase. Kinetic studies of purine-to-purine trans-N-deoxyribosylase. // *Eur. J. Biochem.* 1974. V. 48. P. 255-262.
110. Danzin, C., Cardinaud, R. Deoxyribosyl transfer catalysis with trans-N-deoxyribosylase. Kinetic study of purine (pyrimidine) to pyrimidine (purine) trans-N-deoxyribosylase. // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 62. P. 365-372.
111. Porter, D. J.T., Merrill B.M., Short S.A. Identification of the active site nucleophile in nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase as glutamic acid-98. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 15551–15556.
112. Porter, D.J.T., Short S.A. Nucleoside 2'-deoxyribosyl transferase. Pre-steady-state kinetic analysis of native enzyme and mutant enzyme with an alanine residue replacing Glu-98. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. 15557–15562.
113. Short, S.A., Armstrong, S.R., Ealick S.E., Porter D.J. Active site amino acids that participate in the catalytic mechanism of nucleoside 2'- deoxyribosyltransferase. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 4978–4987.

114. Carson, D.A., Wasson, D.B., Beutler, E. Antileukemic and immunosuppressive activity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 2232-2236.
115. Carson, D.A., Wasson, D.B. Synthesis of 2',3'-dideoxynucleosides by enzymatic transglycosylation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 155. P. 829-834.
116. Haertle, T., Carrera, C.J., Wasson, D.B., Sowers, L.C., Richman, D.D. Carson, D.A. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 5870-5875.
117. Hutchinson, D.W. New approaches to the synthesis of antiviral nucleosides. // *TIBTECH*. 1990. V. 8. P. 348-353.
118. Pistotnik, E., Sakamoto, H., Pochet, S., Namane, A., Barzu, O. Assay of Nucleoside 2-Deoxyribosyltransferase Activity with Pyruvate Kinase/Lactate Dehydrogenase Coupling System. // *Analytical Biochemistry*. 1999. V. 271. P. 192-193.
119. Chawdhri, R., Hutchinson D.W., Richards A.O. Nucleoside deoxyribosyltransferase and inosine phosphorylase activity in lactic acid bacteria. // *Arch. Microbiol.* 1991. V. 155. P. 409-411.
120. Steenkamp, D. J. The purine-2-deoxyribonucleosidase from *Crithidia luciliae*. Purification and trans-N-deoxyribosyltransferase activity. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 197. P. 431-439.
121. Steenkamp, D.J., Halbich, T.J. Substrate specificity of the purine 2'-deoxyribonucleosidase of *Crithidia luciliae*. // *Biochem. J.* 1992. V. 287. P. 125-129.
122. Bosch, J., Robien, M.A., Mehlin, C., Boni, E., Riechers, A., Buckner, F.S., Van Voorhis, W.C., et. al. Using fragment cocktail crystallography to assist inhibitor design of *Trypanosoma brucei* nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. P. 5939-5946.
123. Lawrence, K.A., Jewett M.W., Rosa P.A., Gherardini F.C. *Borrelia burgdorferi* bb0426 encodes a 2'-deoxyribosyltransferase that plays a central role in purine salvage. // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 72. P. 1517-1529.
124. Alexeev, C.S., Sivets, G.G., Safonova, T.N., Mikhailov, S.N. Substrate specificity of *E-coli* uridine phosphorylase. Further evidences of high-syn conformation of the substrate in uridine phosphorolysis // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2017. V. 36(2). P. 107-121.
125. Saunders, P.P., Wilson, B.A., Saunders, G.F. Purification and Comparative Properties of a Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 3691 - 3697.

126. Scocca, J.J. Purification and Substrate Specificity of Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase from *Haemophilus influenzae*. // *J. Biol. Chem.* 1971. V. 246. P. 6606-6610.
127. Munch-Petersen, A., Nygaard, P., Hammer-Jespersen, K., Fiil, N. Mutants constitutive for nucleoside-catabolizing enzymes in *Escherichia coli* K12. // *Eur. J. Biochem.* 1972. V. 27. P. 208-215.
128. Hammer-Jespersen, K., Munch-Petersen, A. Multiple regulation of nucleoside catabolizing enzymes: Regulation of the deo operon by the *cytR* and *deoR* gene products. // *Mol. Gen. Genet.* 1975. V. 137. P. 327 - 335.
129. Lelr, J.C., Hammer-Jespersen, K., Schwartz, M. Uridine Phosphorylase from *Escherichia coli*. Physical and Chemical Characterization. // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. P. 217-224.
130. Bzowska, A., Kulikowska, E., Shugar, D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. // *Pharmacology & Therapeutics*. 2000. V. 88. P. 349-425.
131. Stoeckler, J.D. Purine nucleoside phosphorylase: a target for chemotherapy. / In Boca Raton: CRC Press Inc., R. J. Glazer (Ed.), *Developments in Cancer Chemotherapy*, 1984. P. 35-60.
132. Montgomery, J.A. Purine nucleoside phosphorylase: a target for drug design. // *Med. Res. Rev.* 1993. V. 13. P. 209-228.
133. Parks, R.E., Agarwal, R.P. Purine nucleoside phosphorylase. // *Enzymes*. 1972. V. 7. P. 483-514.
134. Koellner, G., Bzowska, A., Wielgus-Kutrowska, B., Luic, M., Steiner, T., Saenger, W., Stepinski, J. Open and Closed Conformation of the *E. coli* Purine Nucleoside Phosphorylase Active Center and Implications for the Catalytic Mechanism. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 315. P. 351-371.
135. Kim, B.K., Cha, S., Parks, R.E., Jr. Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes: II. Kinetic analysis and substrate-binding studies. // *J. Biol. Chem.* 1968. V. 243. P. 1771-1776.
136. Jensen, K.F., Nygaard, P. Purine nucleoside phosphorylase form *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Purification and some properties. // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 51. P. 253-265.
137. Bzowska, A., Kulikowska, E., Darzynkiewicz, E., Shugar, D. Purine nucleoside phosphorylase. Structure - activity relationships for substrate and inhibitor properties of N-1-, N-7-, and C-8-substituted analogues: differentiation of mammalian and bacterial enzymes with N-1-methylinosine and guanosine. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 9212-9217.

138. Bzowska, A., Kulikowska, E., Shugar, D. Properties of purine nucleoside phosphorylase (PNP) of mammalian and bacterial origin. // *Z. Naturforsch.* 1990. V. 45. P. 59-70.
139. Bzowska, A., Magnowska, L., & Kazimierczuk, Z. Synthesis of 6-aryloxy- and 6-arylalkoxy-2-chloropurines and their interactions with purine nucleoside phosphorylase (PNP) from *Escherichia coli*. // *Z. Naturforsch.* 1999. V. 54. P. 1055-1067.
140. Chae, W.-G., Chan, D.C.K., Chang, C. Facile synthesis of 5'-deoxy- and 2',5'-dideoxy-6-thiopurine nucleosides by nucleoside phosphorylases. // *Tetrahedron*. 1998. V. 54. P. 8661-8670.
141. Krenitsky, T.A., Koszalka, G.W., Tuttle, J.V. Purine nucleoside synthesis, an efficient method employing nucleoside phosphorylases. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 3615-3621.
142. Burns, C.L., St. Clair, M.H., Frick, L.W., Spector, T., Averett, D.R., English, M.L., Holmes, T.J., Krenitsky, T.A., Koszalka, G.W. Novel 6-alkoxypurine 2',3'-dideoxy nucleosides as inhibitors of the cytopathic effects of the human immunodeficiency virus. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 378-384.
143. Oivanen, M.O., Lonnberg, H., Kazimierczuk, Z., Shugar, D. Mechanism for Acid-Catalyzed Hydrolysis of Nucleoside and Acyclonucleoside Analogues of Benzimidazole. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1989. V. 8(1). P. 133-144.
144. Mikhailopulo, I.A. Biotechnology of Nucleic Acid Constituents - State of the Art and Perspectives. // *Curr. Org. Chem.* 2007. V. 11. P. 317-335.
145. Mikhailopulo, I.A., Zinchenko, A.I., Bokut, S.B., Dudchik, N.V., Barai, V.N., Kalinichenko, E.N., Rosemeyer, H., Seela, F. 1-Deaza and 3-deazapurines in the reaction of microbiological transglycosylation. // *Biotechnol. Lett.* 1992. V. 14. P. 885.
146. Михайлопуло, И.А., Мирошников, А.И. Современные тенденции в биотехнологии нуклеозидов. // *Acta Naturae*. 2010.Т. 2(2). С. 38-61.
147. Hood, M.A.; Finley, R.S. Fludarabine: A Review. // *Annals of Pharmacotherapy*. 1991. V. 25 (5). P. 518-524.
148. Esipov, R.S., Gurevich, A.I., Chuvikovsky, D.V., Chupova, L.A., Muravyova, T.I., Miroshnikov, A.I. Overexpression of *Escherichia coli* genes encoding nucleoside phosphorylases in the pET/BI21(DE3) system yields active recombinant enzymes. // *Protein Express. Purif.* 2002. V. 24. P. 56-60.

149. Nixon, A.E., Hunter, J.L., Bonifacio, G., Eccleston, J., Webb, M.R. Purine nucleoside phosphorylase: its use in a spectroscopic assay for inorganic phosphate and for removing inorganic phosphate with the aid of phosphodeoxyribomutase. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 265. P. 299-307.
150. Kharitonova M.I., Fateev I.V., Kaushin A.L., Konstantinova I.D., Kotovskaya, S.K., Leont'eva V.L., Galegov, G.A., Charushin, V.N., Miroshnikov, A.I. Chemo-Enzymatic Syntheses and Antiviral Evaluation of 5-substituted 4,6-difluorobenzimidazoles Ribo- and 2'-Deoxyribo-Nucleosides. // *Synthesis*. 2016. V. 48(03). P. 394-406.
151. Vajpayee M, Malhotra N. Antiviral drugs against herpes infections. // *Indian Journal of Pharmacology*. 2000. V. 32. P. 330-338.
152. Shen, W., Kim, J.-S., Mitchell, S., Kish, P., Kijek, P., Hilfinger, J. 5'-O-D-Valyl-araA, A potential prodrug for improving oral bioavailability of the antiviral agent vidarabine. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2009. V. 28(1). P. 43-55.
153. Averett, D.R, Koszalka, G.W., Fyfe, J.A., Roberts, G.B., Purifoy, D.J., Krenitsky, T.A. 6-Methoxypurine arabinoside as a selective and potent inhibitor of varicella-zoster virus. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991. V. 35(5). P. 851-862.
154. Konstantinova, I.D., Antonov, K.V., Fateev, I.V., Miroshnikov, A.I., Stepchenko, V.A., Baranovsky, A.V., Mikhailopulo, I.A.. A Chemo-Enzymatic Synthesis of β -D-Arabinofuranosyl Purine Nucleosides. // *Synthesis*. 2011. V. 10. P. 1555-1560.
155. Pascual, G.M., M. Deroncelé, T.V., Montilla, A.R. Enzymatic production of cytosinic nucleoside analogues. EP 2883959 A1. 2015.
156. Kondo, K., Inoue, I.J. Studies on biologically active nucleosides and nucleotides. A convenient one-step synthesis of 2,2'-anhydro-1-(3',5'-di-O-acyl-beta-D-arabinofuranosyl)pyrimidines from pyrimidine ribonucleosides. // *Org. Chem.* 1977. V. 42(17). P. 2809-2812.
157. Furukawa, Y., Honjo, M. A direct synthesis of 3',5'-di-O-acetyl-O2,2'-cyclouridine. // *Chem. Pharm. Bull.* 1968. V. 16(11), P. 2286-2288.
158. Damaraju, V.L., Damaraju, S., Young, J.D., Baldwin, S.A., Mackey, J., Sawyer, M.B., Cass. C.E. Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. // *Oncogene*. 2003. V. 22. P. 7524-7536.

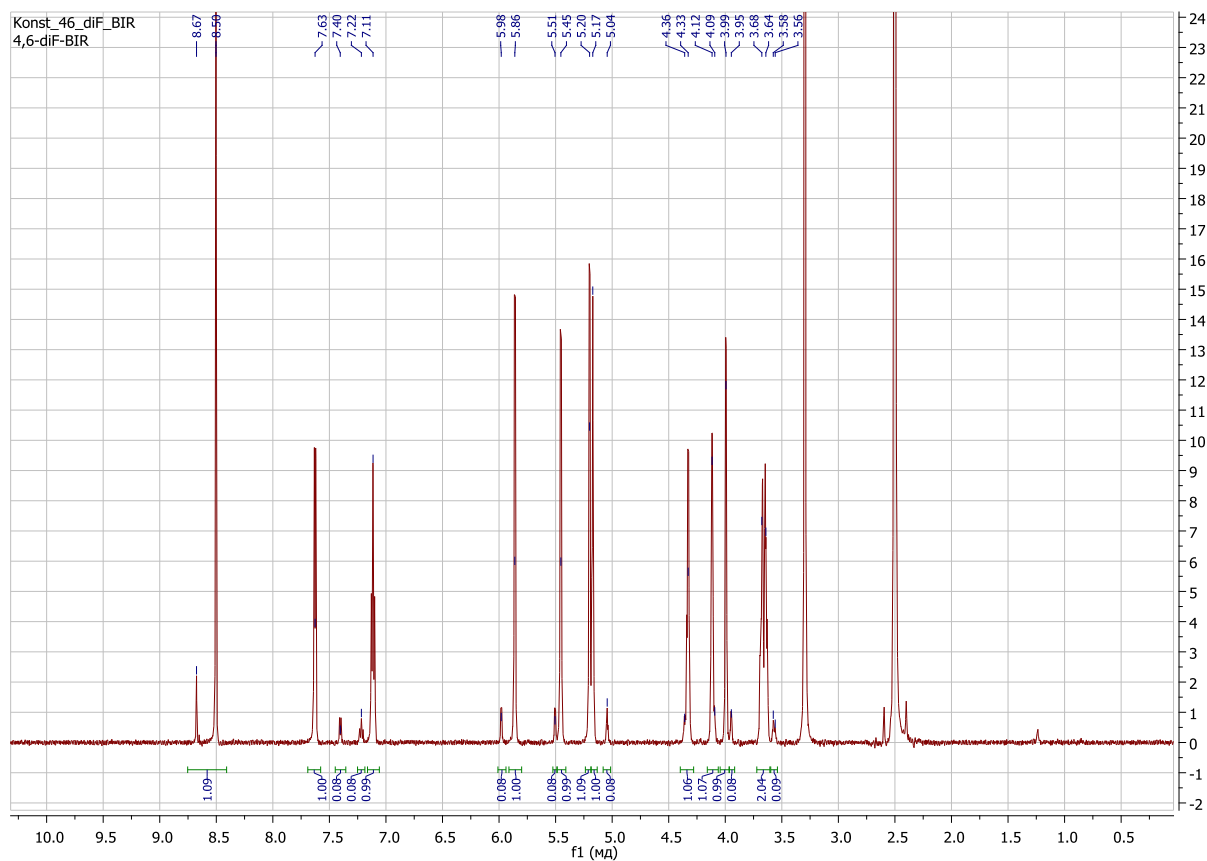
159. Griengl, H., Wanek, E., Schwarz, W., Streicher, W., Rosenwirth, B., De Clercq E. 2'-Fluorinated arabinonucleosides of 5-(2-haloalkyl)uracil: synthesis and antiviral activity. // *J. Med. Chem.* 1987. V. 30(7). P. 1199-1204.
160. Fateev, I.V., Antonov, K.V., Konstantinova, I.D., Muravyova, T.I., Seela, F., Esipov, R.S., Miroshnikov, A.I., Mikhailopulo, I.A. The chemo-enzymatic synthesis of clofarabine and related 2'-deoxyfluoroarabinosyl nucleosides: the electronic and stereochemical factors determining substrate recognition by *E. coli* nucleoside phosphorylases // *Beilstein J. Org. Chem.* 2014. V. 10. P. 1657-1669.
161. Kharitonova, M.I., Fateev, I.V., Antonov, K.V., Kaushin, A.L., Konstantinova, I.D., Kotovskaya, S.K., Andronova, V.L., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. Chemo-Enzymatic Syntheses and Antiviral Evaluation of 5-substituted 4,6-difluorobenzimidazoles 2'-fluoro-arabinosides // *Synthesis*. 2017, V. 49. P. 1043-1052.
162. Walter, R.L., Symersky, J., Poirot, A.F., Stoeckler, J.D., Erionf, M.D., Ealick, S.E. X-Ray Crystallographic and Kinetic Analysis of Human Purine Nucleoside Phosphorylase Complexes with 1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and 1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamidine. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1994. V. 13. P. 689-706.
163. Li BL, Ding SY, Ren YF, Wang LC, Jia YC, Zhang XQ, Gu HM. A base promoted synthesis of N,N-dimethylformamidines. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2013;34(5):1537-1540.
164. 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. // *BMCL*. 2017. V. 27 (11). P. 2484-2487.
165. Eletskaya, B.Z., Konstantinova, I.D., Paramonov, A.S., Esipov, R.S., Gruzdev, D.A., Vigorov, A.Yu., Levit, G.L., Miroshnikov, A.I., Krasnov, V.P., Charushin, V.N. Chemoenzymatic arabinosylation of 2-aminopurines bearing the chiral fragment of 7,8-difluoro-3-methyl-3,4-dihydro-2H-[1,4]benzoxazines. // *Mendeleev Commun.* 2016. V. 26. P. 6–8.
166. Drenichev, M.S., Oslovsky, V.E., Mikhailov, S.N. Cytokinin Nucleosides – Natural compounds with a unique spectrum biological activities. // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2016. V. 16. P. 2562-2576.
167. Montgomery, J.A., Thomas, J.H. New approach to the synthesis of nucleosides of 8-azapurines (3-glycosyl-v-triazolo[4,5-d]pyrimidines). // *J. Org. Chem.* 1971. V. 36. P. 1962-1967.

168. Kelley, J.A., Driscoll, J.S., McCormack, J.J., Roth, J.S., Marquez, V.E., Furanose-pyranose isomerization of reduced pyrimidine and cyclic urea ribosides. // *J. Med. Chem.* 1986. V. 29. P. 2351-2358.
169. 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 versus its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base-Modified Nucleosides.// *Chem. Eur. J.* 2015. V. 21. P. 13401–13419.
170. Гуськова, А.А., Загурный, А.В., Скоблов, М.Ю., Баранова, А.В., Андропова, В.Л., Янковский, Н.К., Галегов, Г.А., Скоблов, Ю. С. Молекулярно-генетический анализ тимидинкиназы вируса герпеса простого тип 1. // *Мол. биол.* 2005. Т. 39(1). С. 155-158.
171. Gus'kova, A.A., Skoblov, M.Yu., Korovina, A.N., Yasko, M.V., Karpenko, I.L., Kukhanova, M.K., Andronova, V.L., Galegov, G.A., Skoblov, Yu.S. Antiherpetic properties of acyclovir 5'-hydrogenphosphonate and the mutation analysis of herpes virus resistant strains. // *Chem. Biol. Drug Des.* 2009. V. 74. P. 382-389.
172. Коровина, А.Н., Гуськова, А. А., Скоблов, М.Ю., Андропова, В.Л., Галегов, Г.А., Кочетков, С.Н., Куханова, М.К., Скоблов, Ю.С. Анализ мутаций в генах ДНК-полимераз и тимидинкиназ клинических изолятов вируса простого герпеса, резистентных к антигерпетическим препаратам. // *Мол. биол.* 2010. Т. 44(3). С. 488-496.
173. Гуськова, А.А., Скоблов, М.Ю., Андропова, В.Л., Галегов, Г.А., Кочетков, С.Н., Скоблов, Ю.С. Ферментативная активность тимидинкиназы штаммов вируса простого герпеса, резистентных к Н-фосфонату ацикловира. // *Биорг. Химия.* 2011. Т. 17(5). С. 627-630.
174. Андропова, В.Л., Галегов, Г.А., Ясько, М.В., Куханова, М.К., Скоблов, Ю.С. Сравнительное изучение лекарственной устойчивости вируса простого герпеса к ациклогуанозину и Н-фосфонату ациклогуанозина. // *Вопр. вирусол.* 2010. Т. 55(1). С. 31-34.
175. Terzano, C., Petroianni, A., Ricci, A. Herpes simplex pneumonia: Combination therapy with oral acyclovir and aerosolized Ribavirin in an immunocompetent patient. // *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 2004. V. 65(1). P. 90-96.
176. Bierman, S.M., Kirkpatrick, W., Fernandez, H. Clinical efficacy of ribavirin in the treatment of genital herpes simplex virus infection. // *Chemotherapy.* 1981. V. 27(2). P. 139-145.

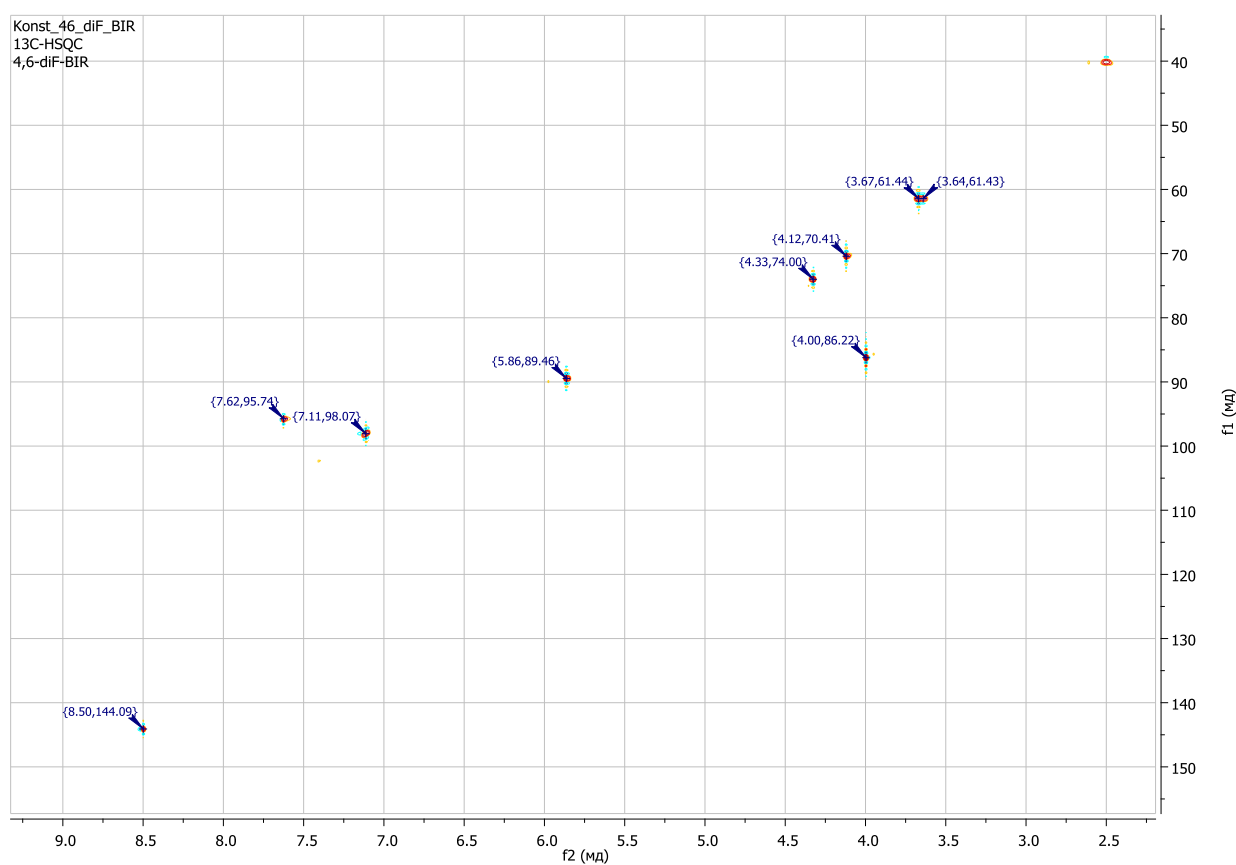
177. Management of opportunistic infections and general symptoms of HIV/AIDS. Clinical protocol for the WHO European region. Интернет источник [http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0007/78118/E90840_Chapter_2.pdf.]
178. Parris, D.S., Harrington, J.E. Herpes simplex virus variants restraint to high concentrations of acyclovir exist in clinical isolates. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982. V. 22(1). P. 71-77.
179. DeClercq, E., Descamps, J., Verheist, G., Walker, R.T, Jones, A.S, Torrence, P.F. Comparative Efficacy of Antiherpes Drugs against Different Strains of Herpes Simplex Virus. // *J. Infect. Dis.* 1980. V. 141 (5). P. 563-574.
180. Fedorov, I.I., Kazmina, E.M., Gurskaya, G.V., Jasko, M.V., Zavodnic, V.E., Balzarini, J., DeClercq, E., Faraj, A., Sommadossi, J.P., Imbach, J.L., Gosselin, G. Novel 3'-C/N-Substituted 2',3'-β-d-Dideoxynucleosides as Potential Chemotherapeutic Agents. 1. Thymidine Derivatives: Synthesis, Structure, and Broad Spectrum Antiviral Properties. // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40(4). P. 486-494.
181. Petrera, E., Níttolo, A. G., Alché, L. E. Antiviral action of synthetic stigmasterol derivatives on herpes simplex virus replication in nervous cells *in vitro*. // *BioMed research international*. 2014. V. 2014. Article ID 947560.
182. Holy, A.; De Clercq, E.; Votryba, I. Phosphonylmethyl Ethers of Nucleosides and their Acyclic Analogues /Ed. J.C. Martin. Washington, 1989, p. 50-71.
183. Галегов, Г.А., Шобухов, В.М., Леонтьева, Н.А., Ясько, М.В. Синтез и антигерпетическая активность фосфорных эфиров ацикловира. // *Биоорг. Химия*. 1997. Т. 1. С. 906-909.
184. Андропова В.Л., Скоробогатый М.В., Манасова Е.В. и др. Провиовирусная активность некоторых 5-арилэтильных производных 2-дезоксисуридина. // *Биоорг. Химия*. 2003. Т. 3. С. 290-295.
185. Sarisky, R.T., Nguyen, T.T., Duffy, K.E., Wittrock, R.J., Leary, J.J. Difference in incidence of spontaneous mutations between Herpes simplex virus types 1 and 2. // *Antimicrob Agents Chemother.* 2000. V. 44(6). P. 1524-1529.

Приложения

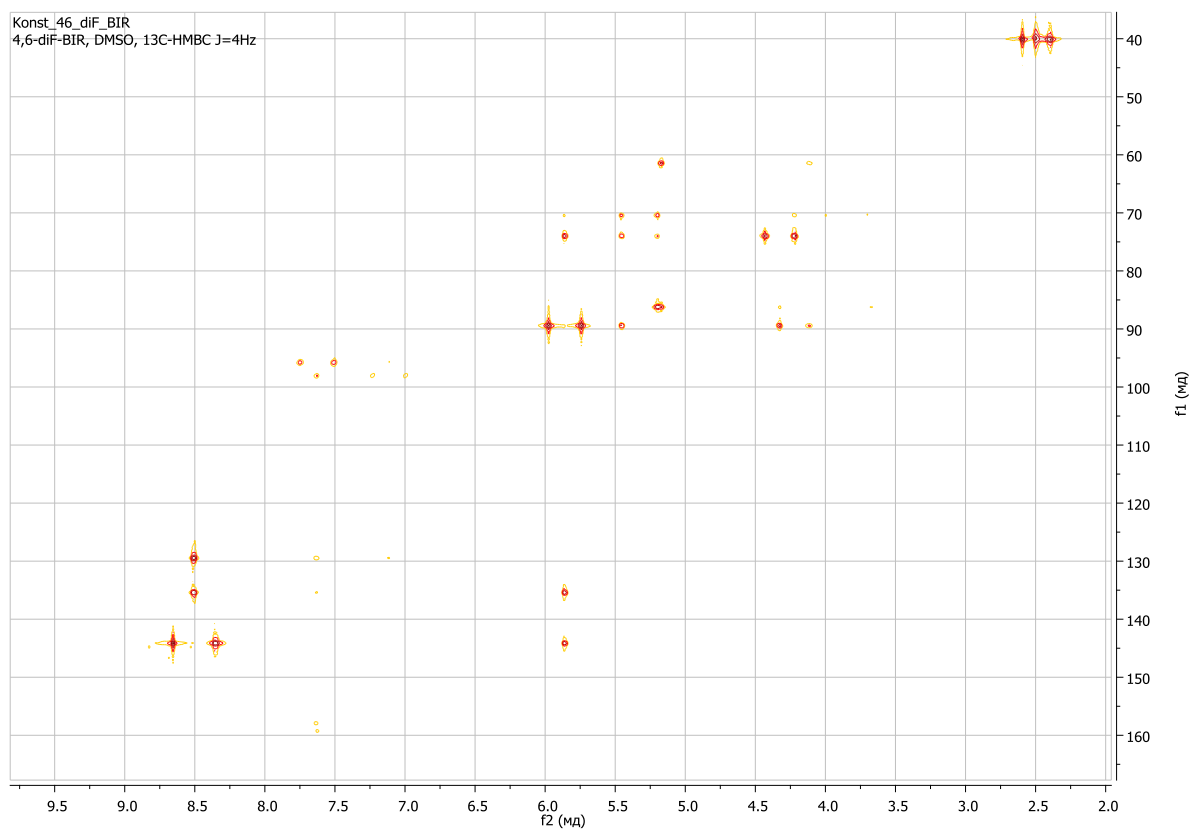
Приложение 1 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (8)



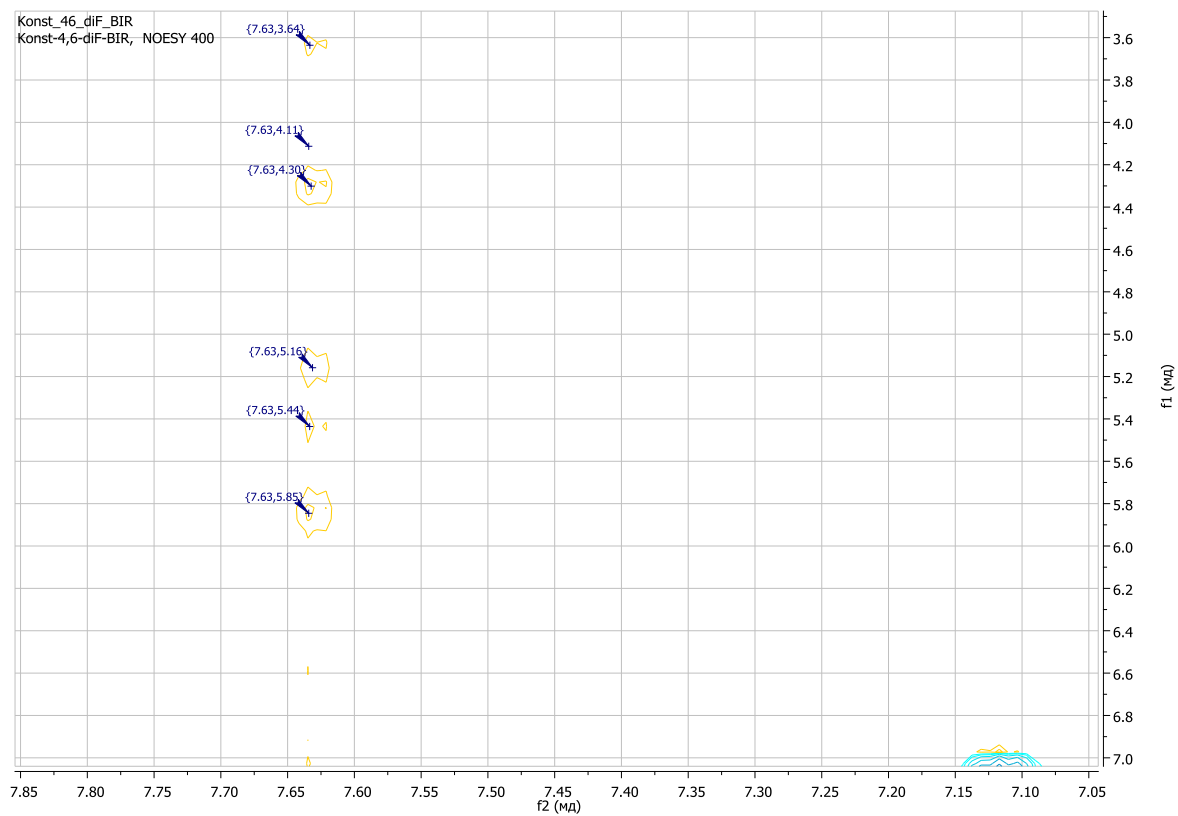
Приложение 2 - ^1H , ^{13}C -HSQC спектр нуклеозида (8)



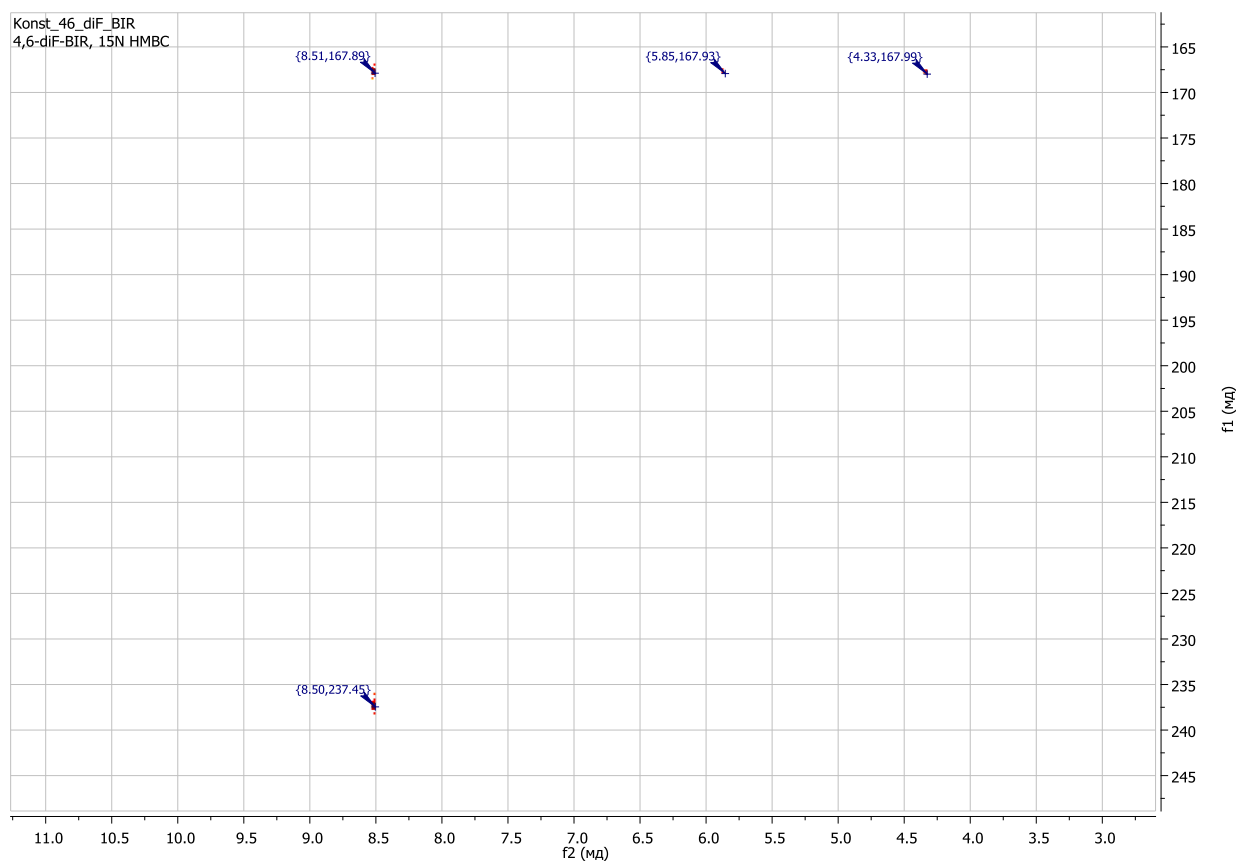
Приложение 3 - ^1H , ^{13}C -HMBC спектр нуклеозида (8)



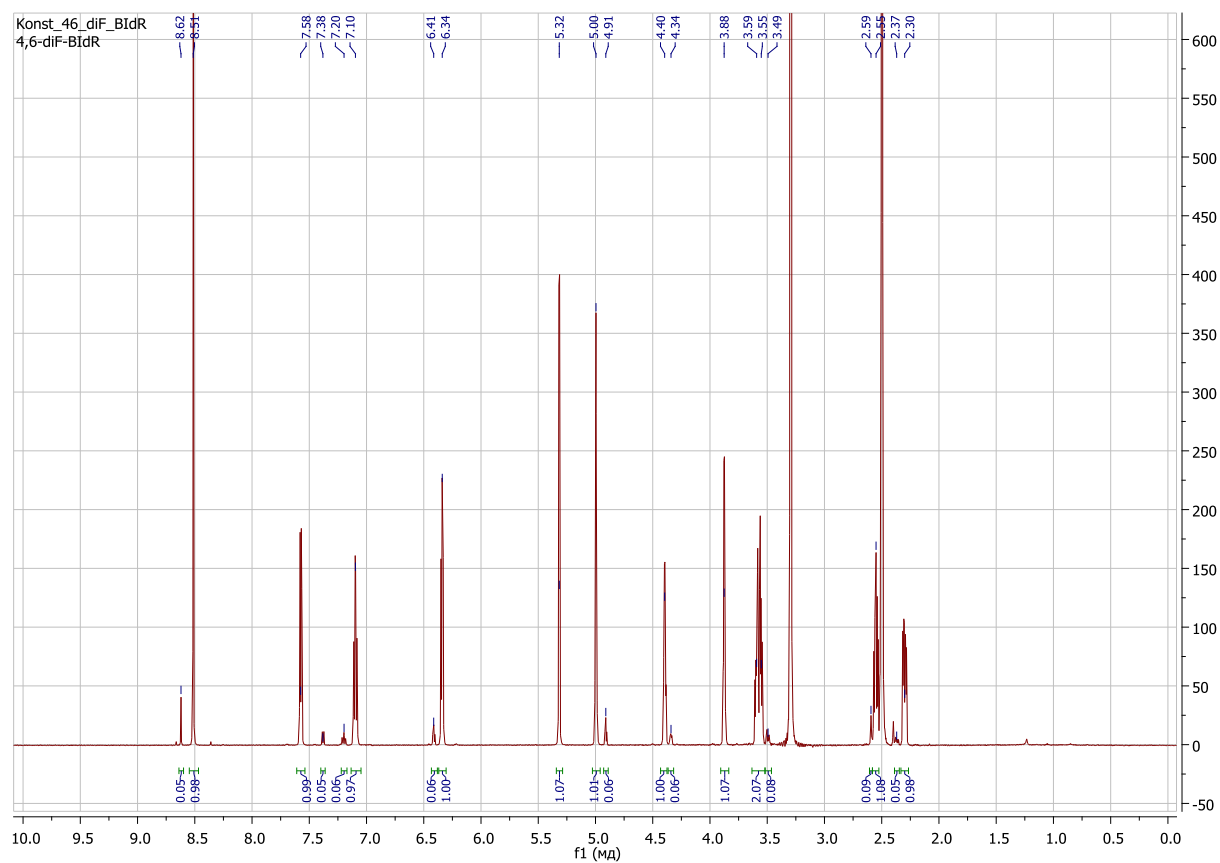
Приложение 4 - NOE-спектр нуклеозида (8)



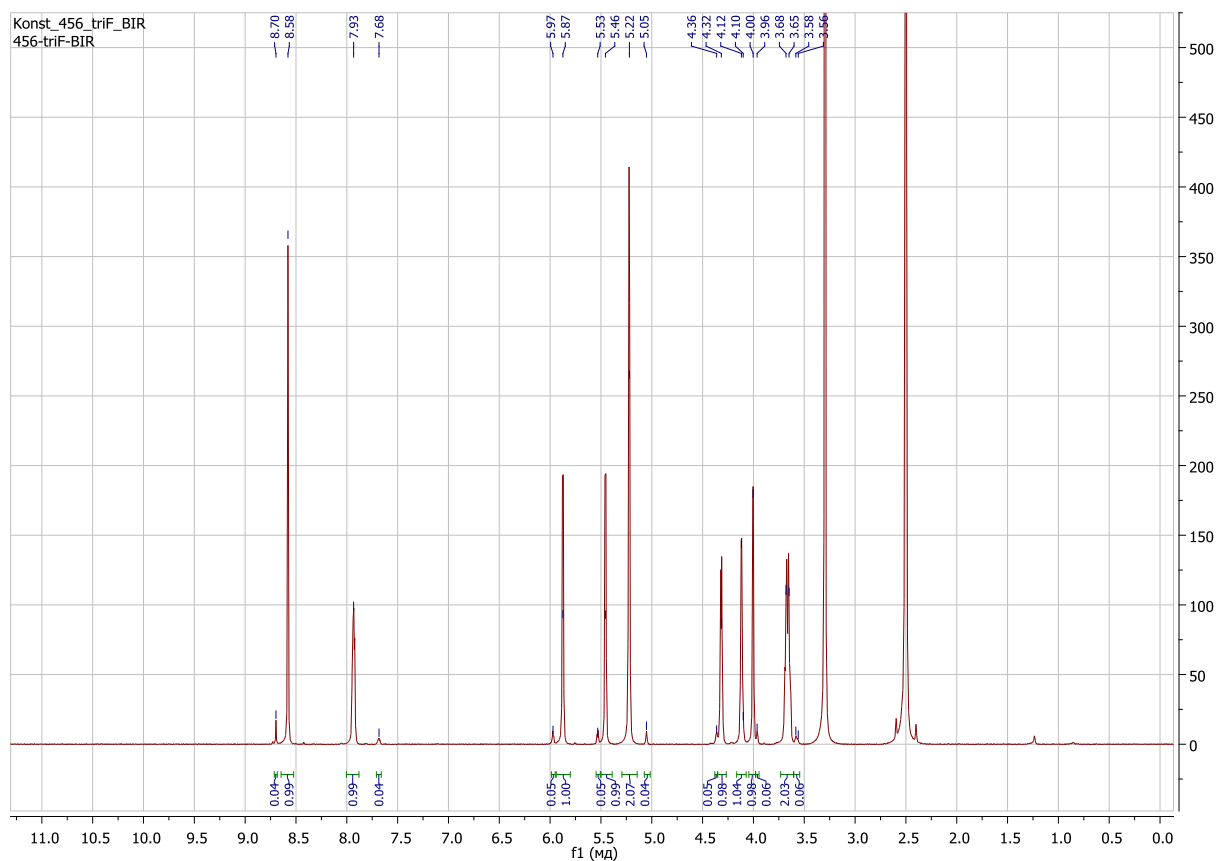
Приложение 5 - ^1H , ^{15}N -HMBC спектр нуклеозида (8)



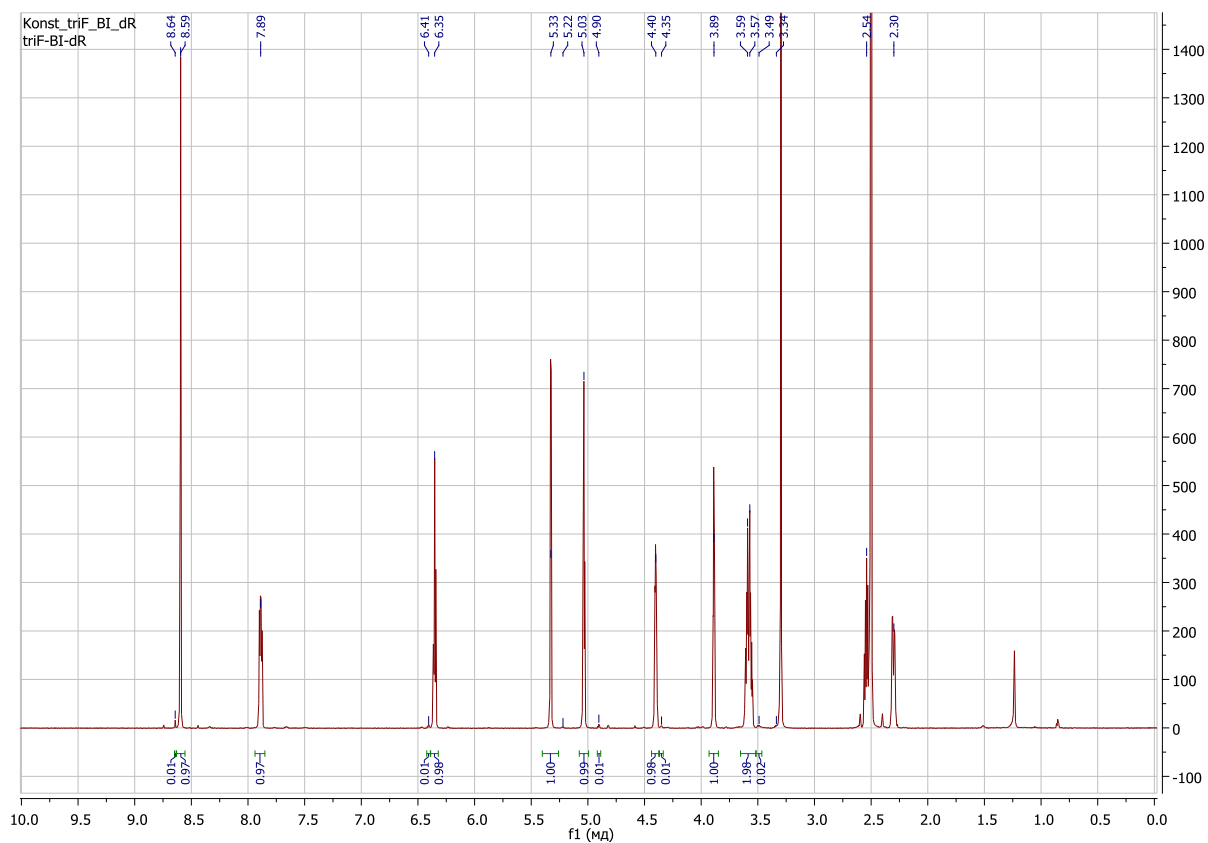
Приложение 6 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (9)



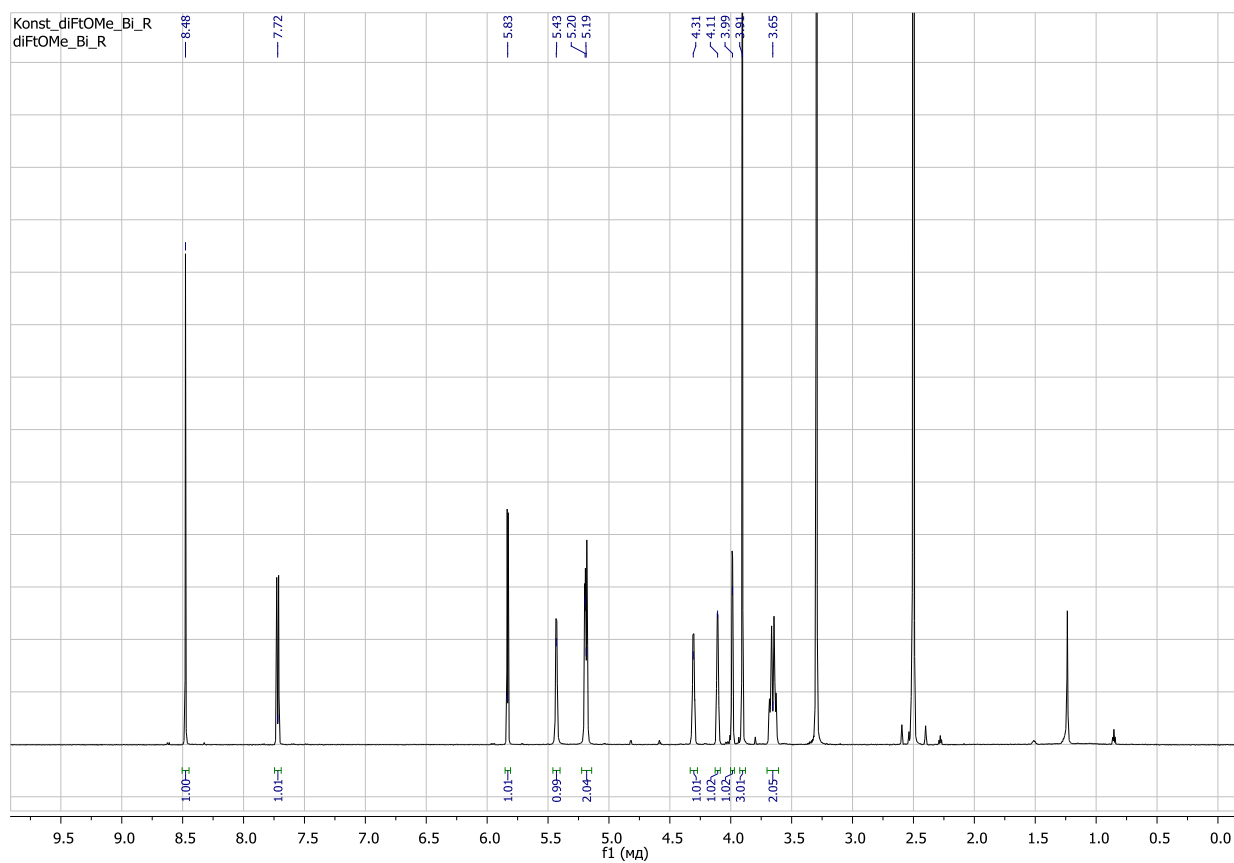
Приложение 7 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (10)



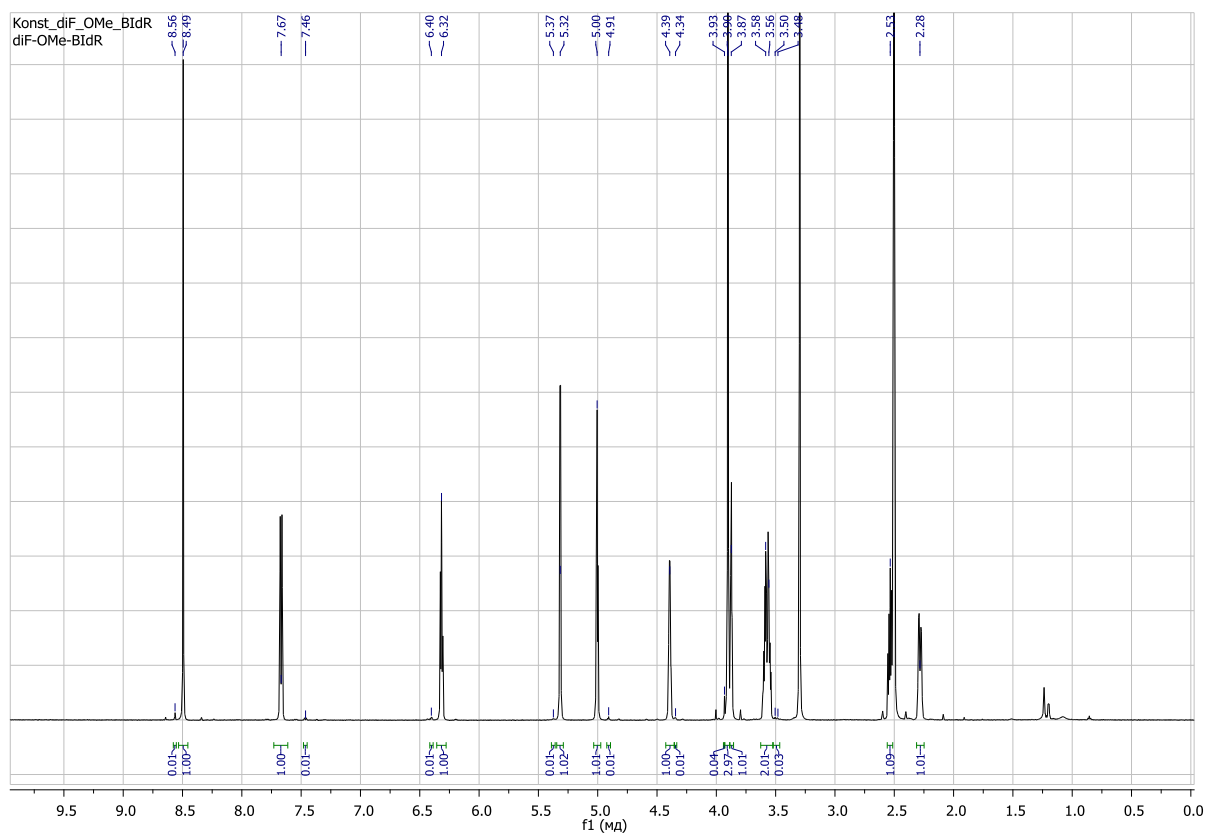
Приложение 8 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (11)



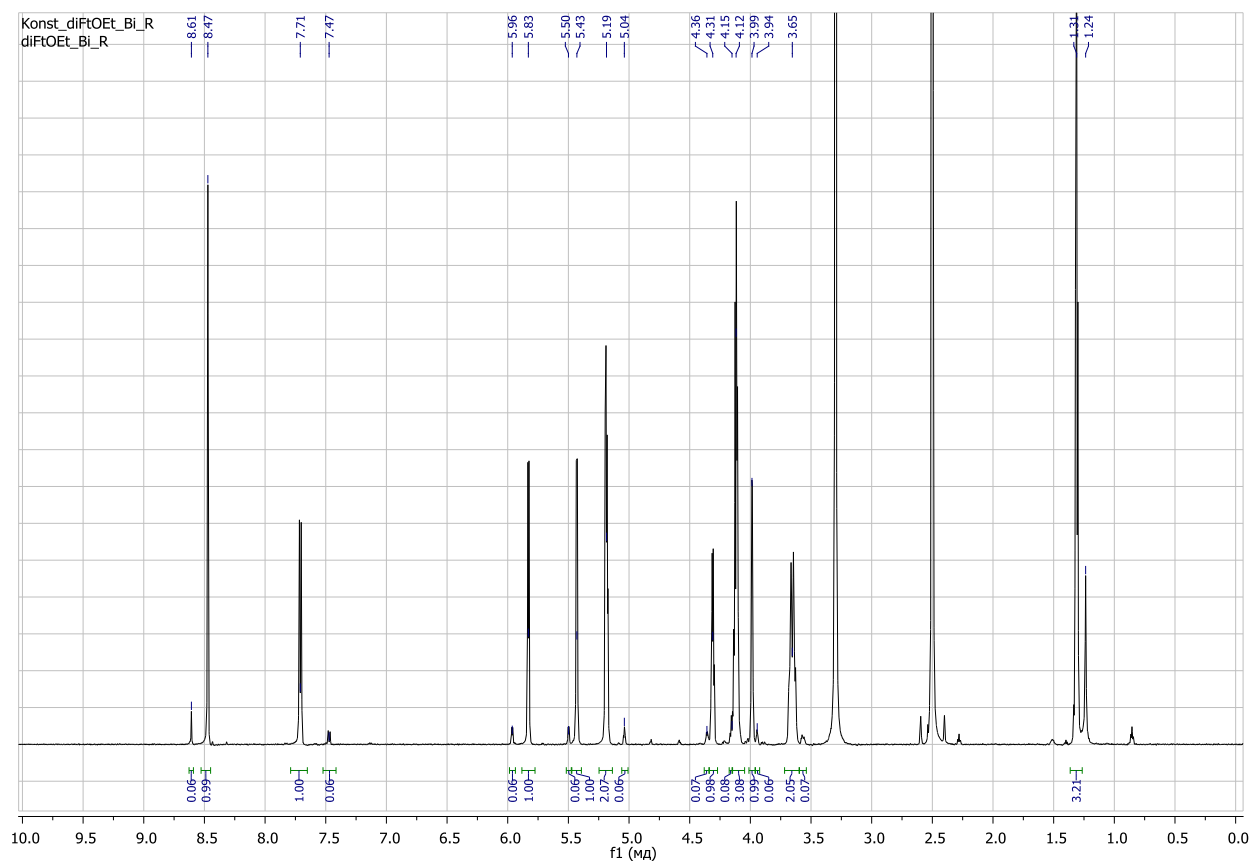
Приложение 9 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (12)



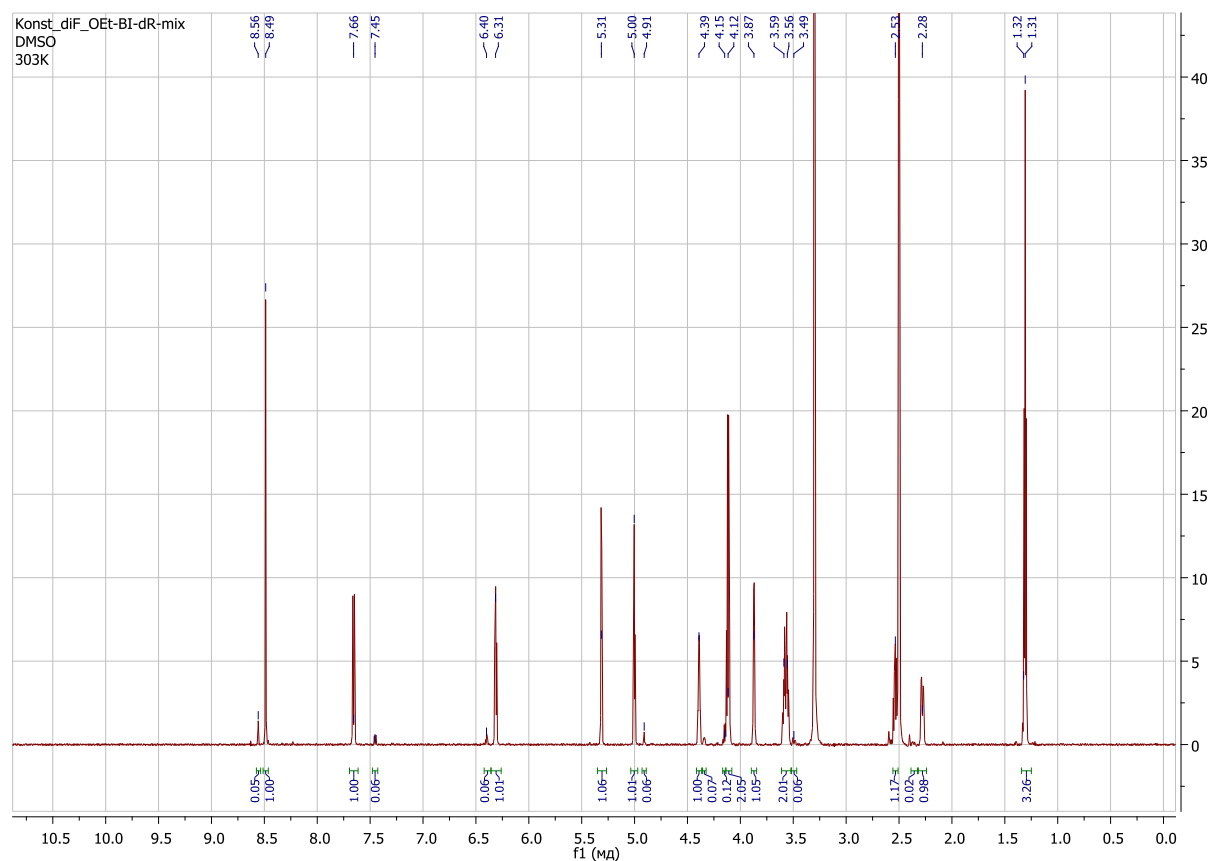
Приложение 10 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (13)



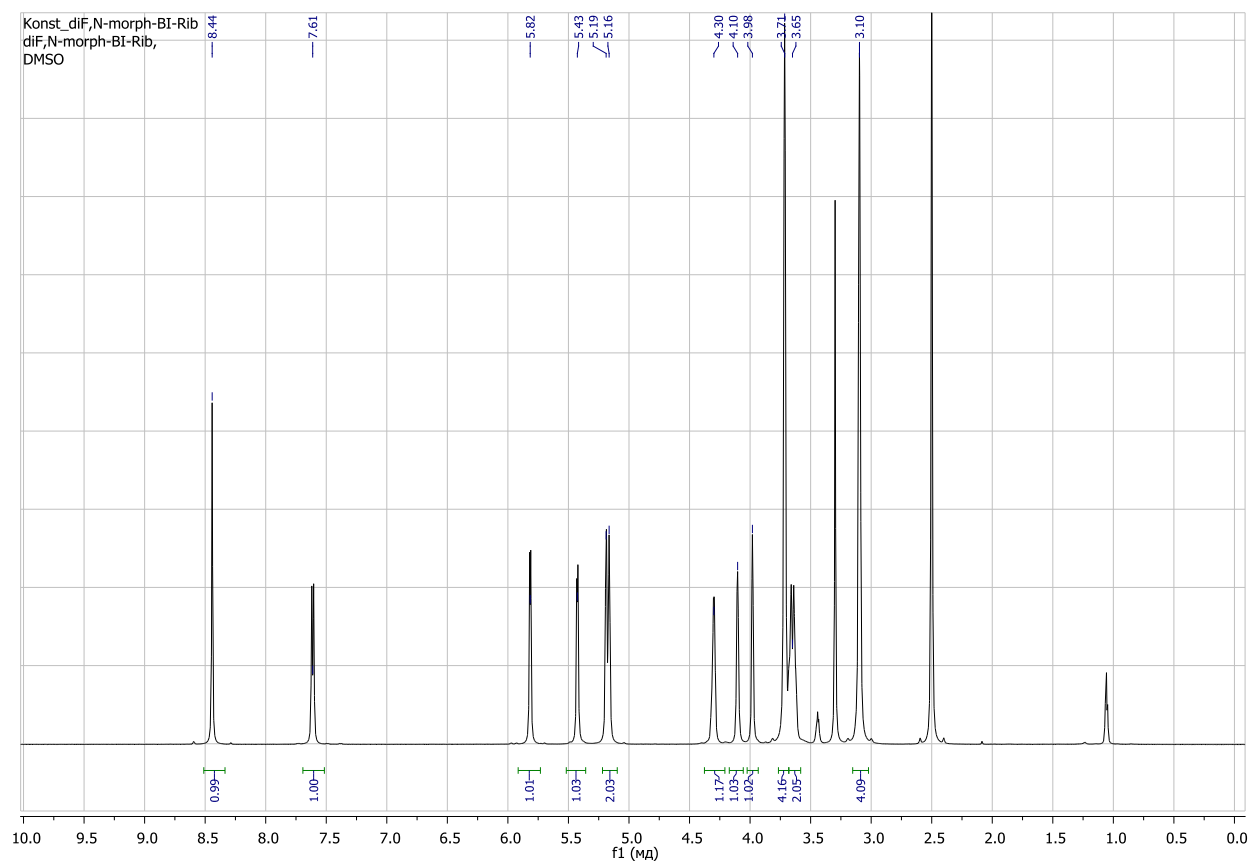
Приложение 11 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (14)



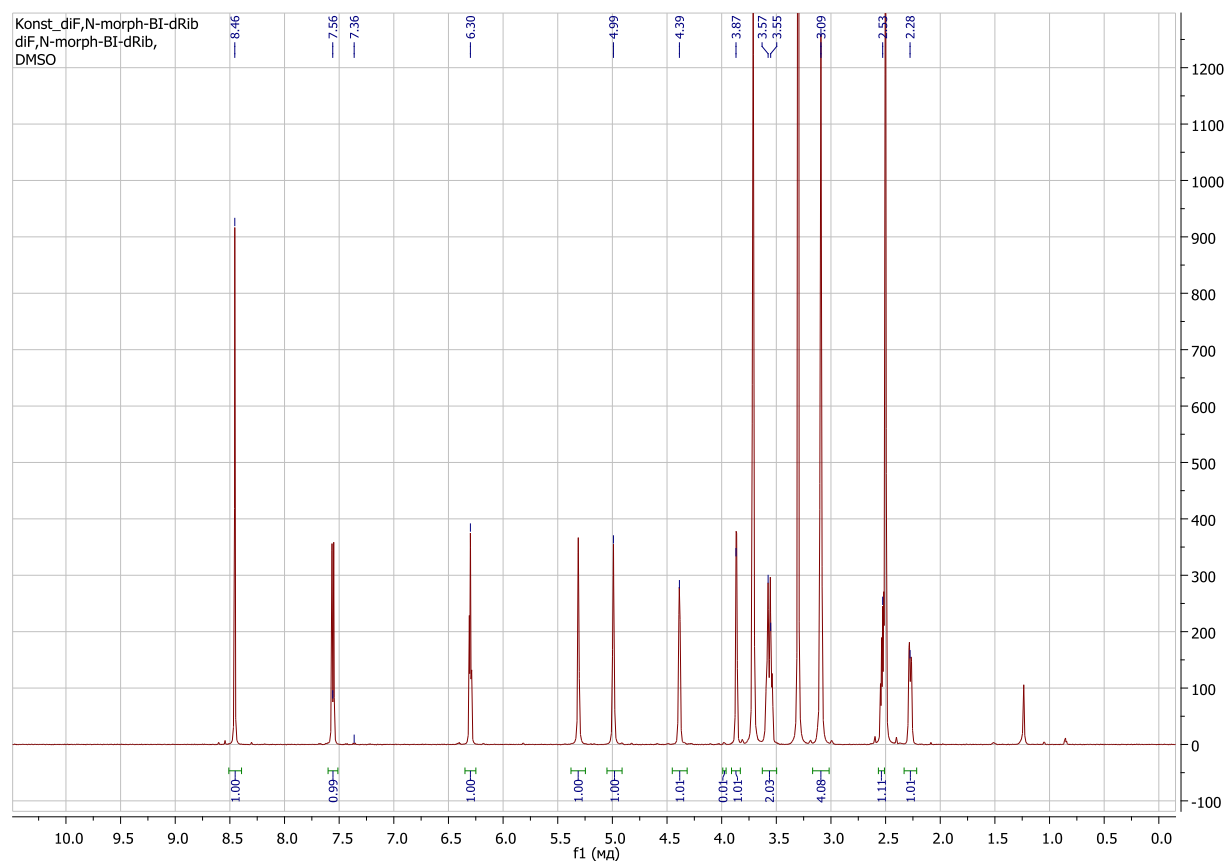
Приложение 12 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (15)



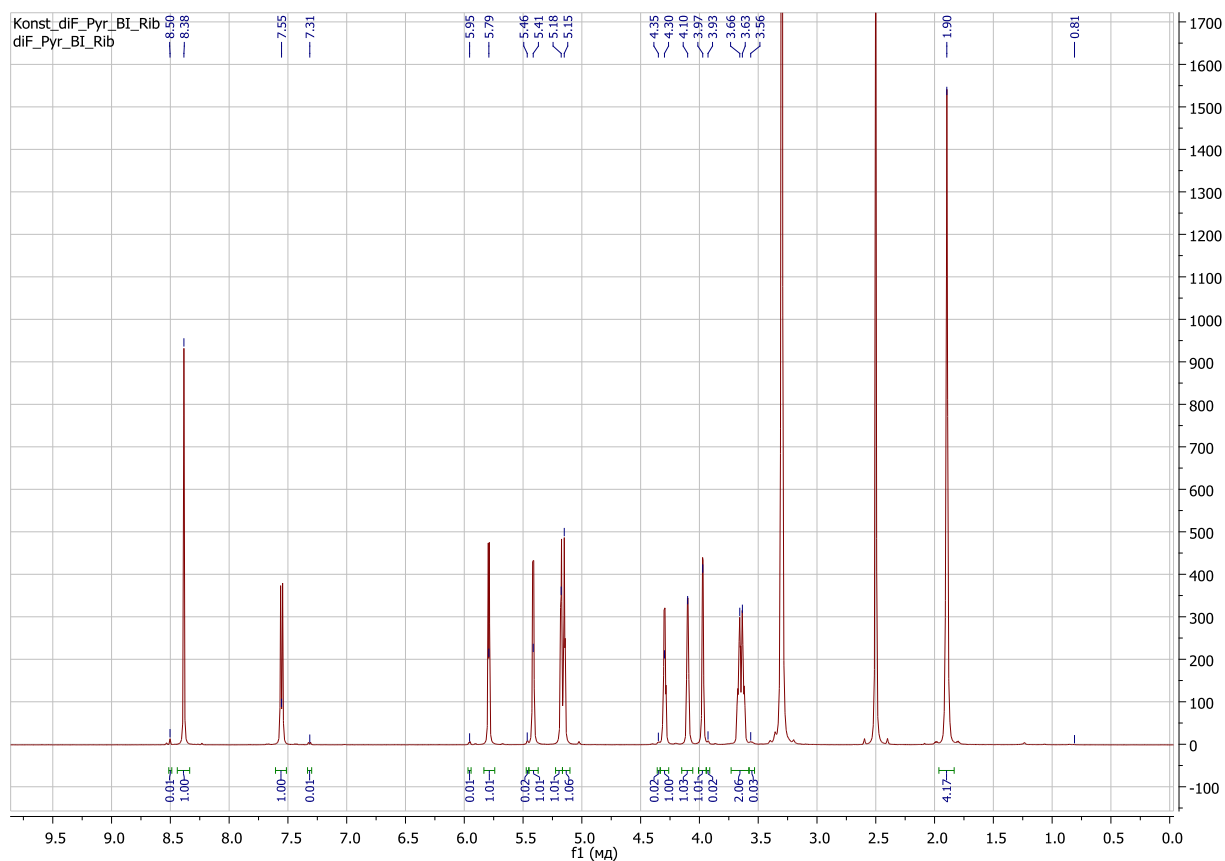
Приложение 13 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (16)



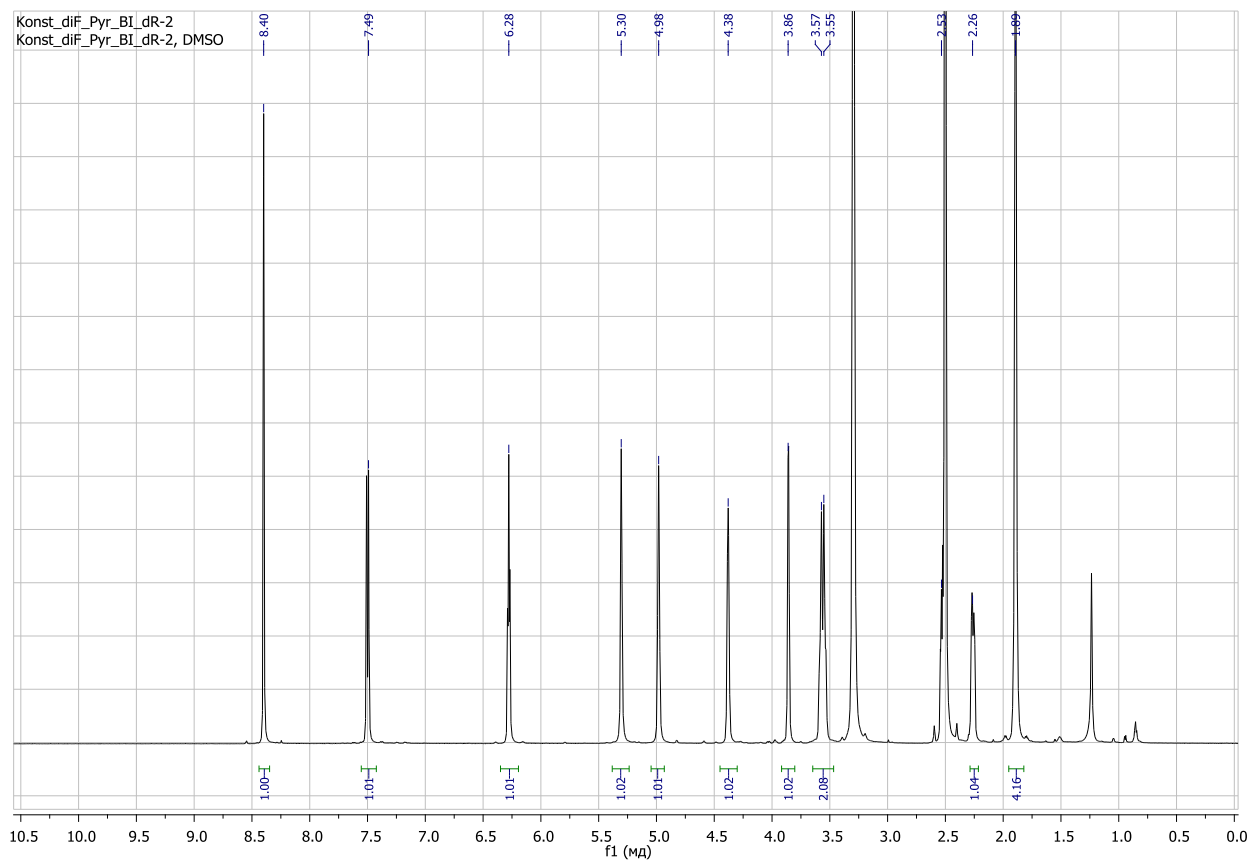
Приложение 14 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (17)



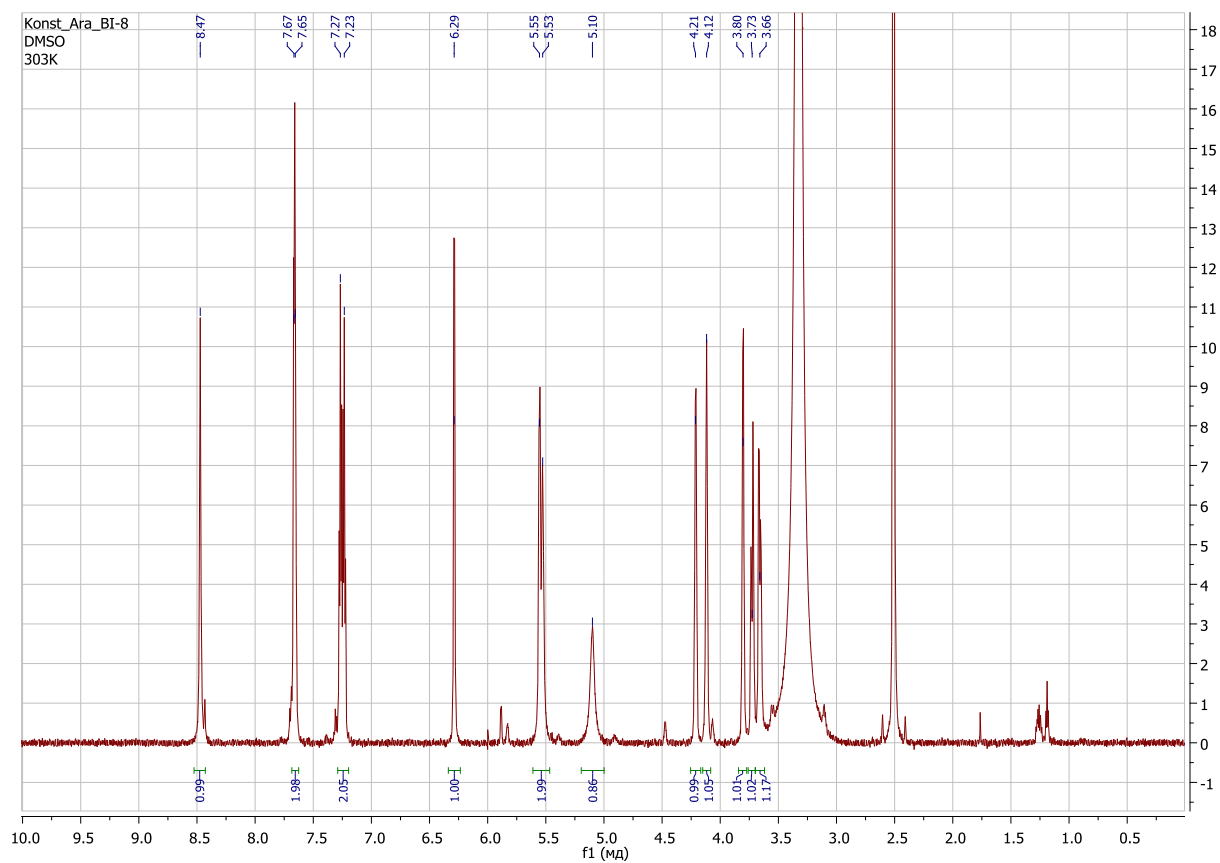
Приложение 15 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (18)



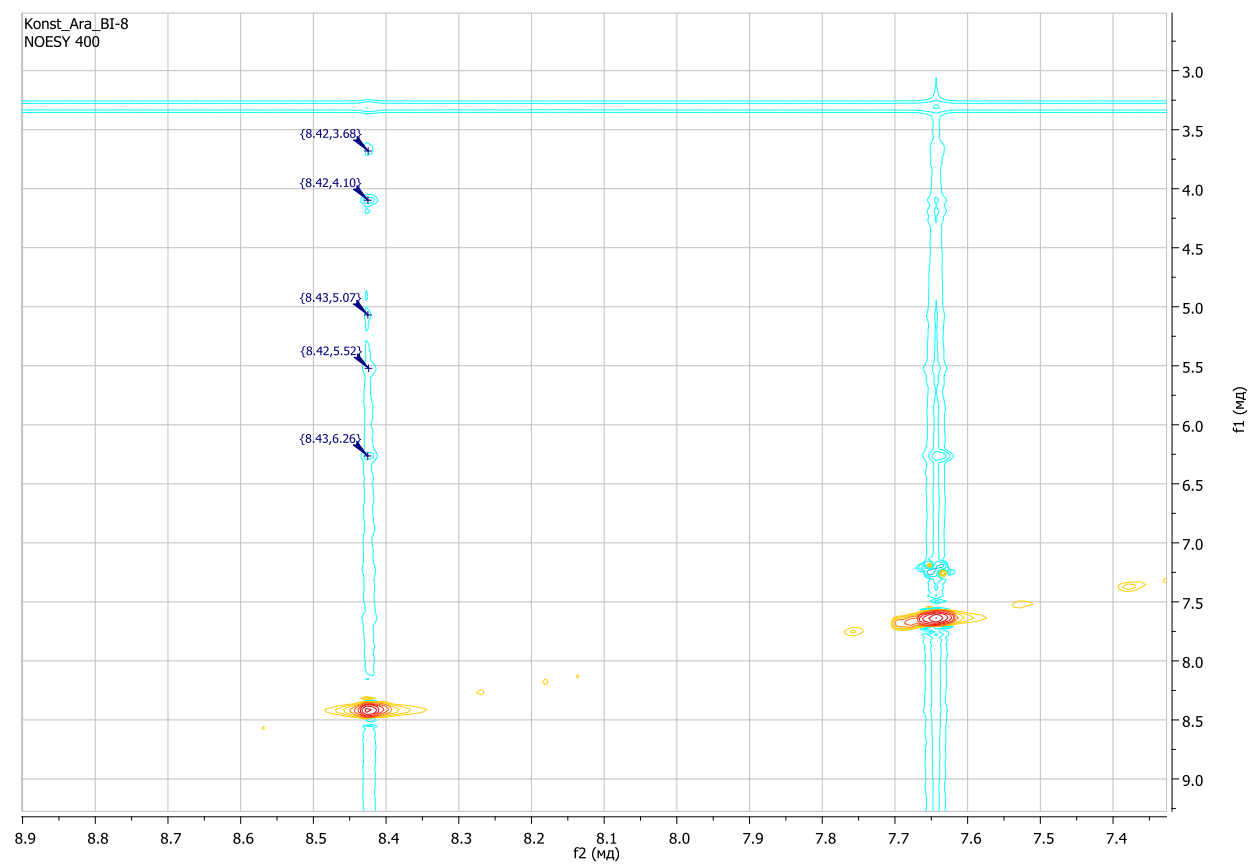
Приложение 16 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (19)



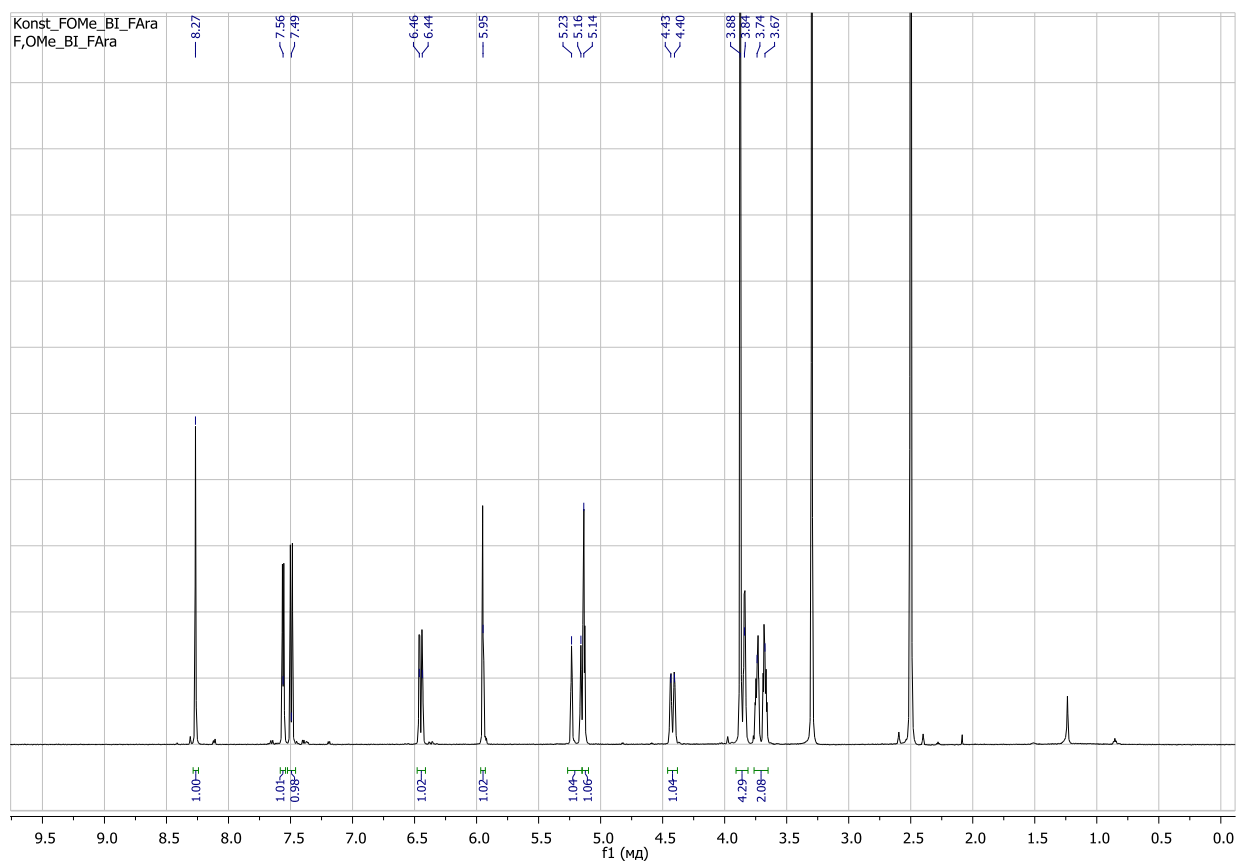
Приложение 17 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (26)



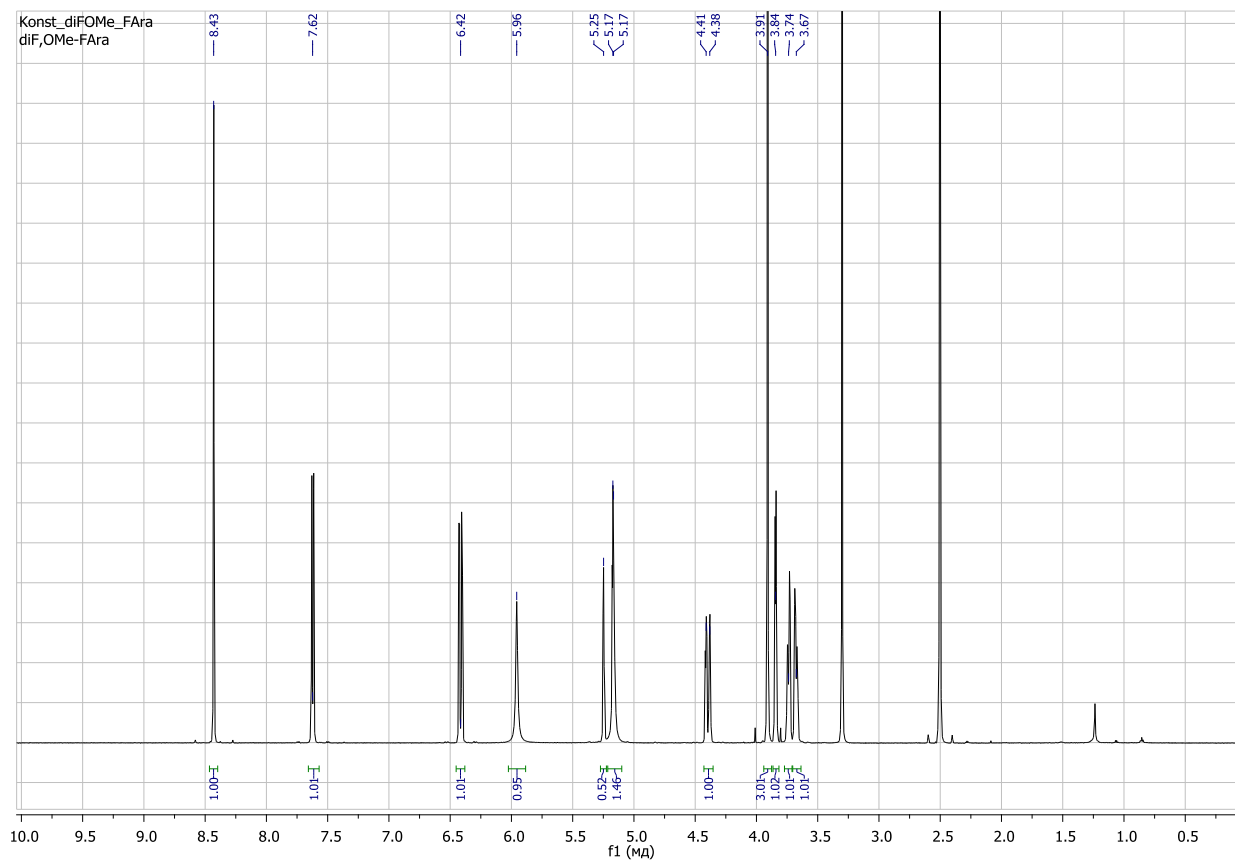
Приложение 18 – NOE-спектр нуклеозида (26)



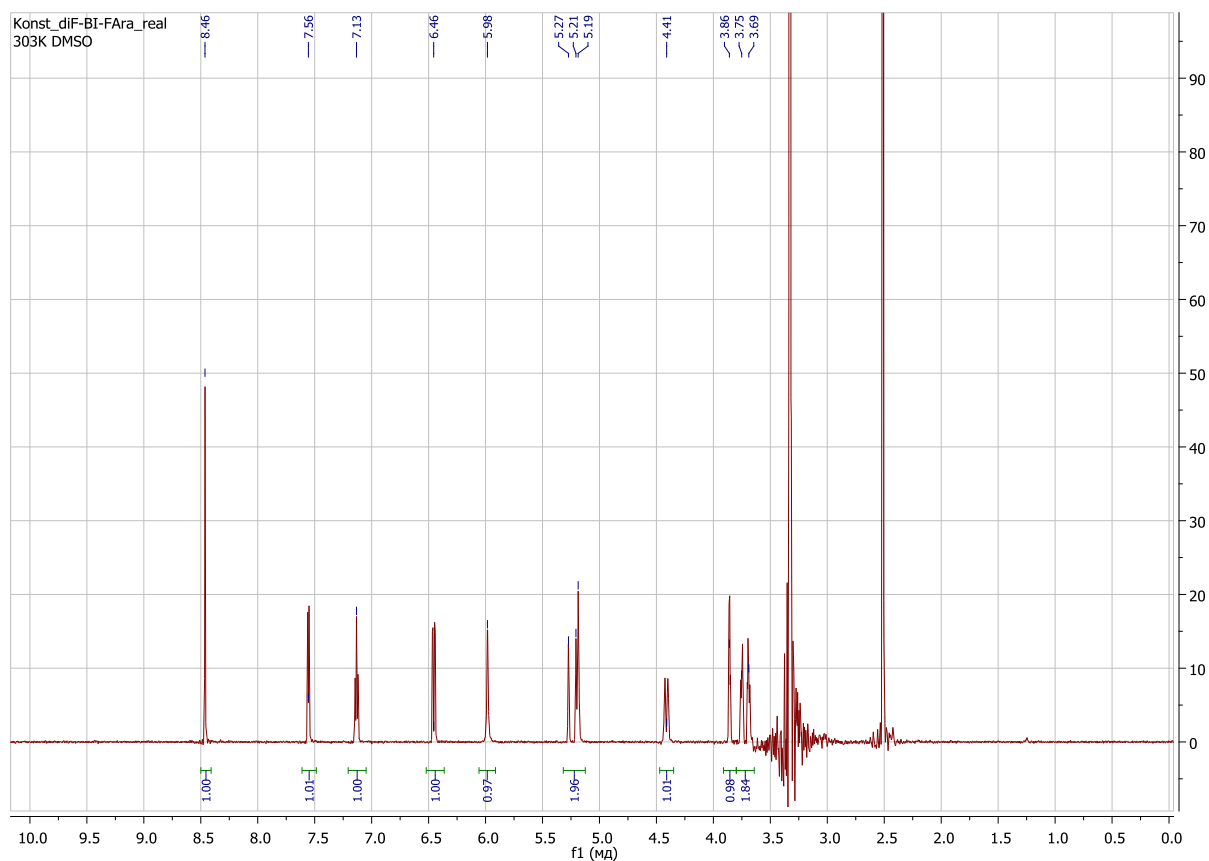
Приложение 19 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (27)



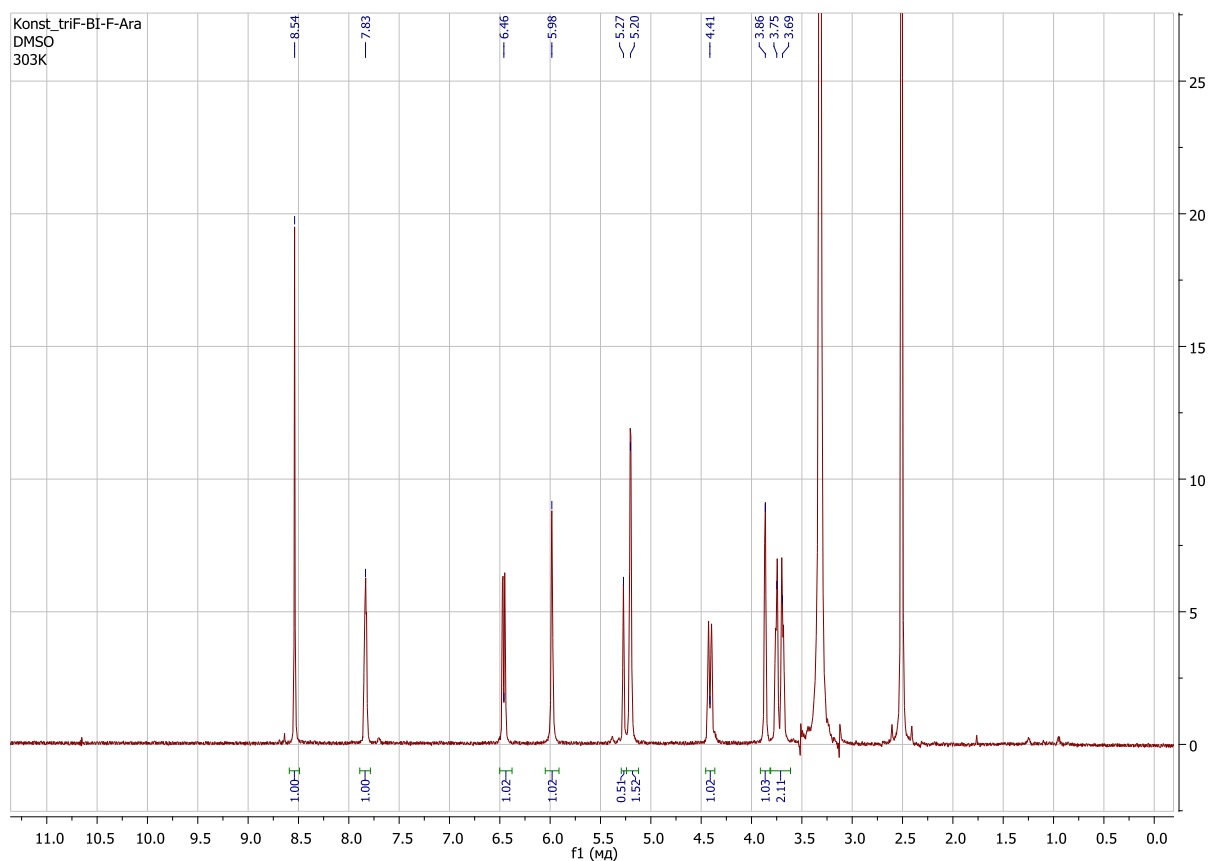
Приложение 20 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (28)



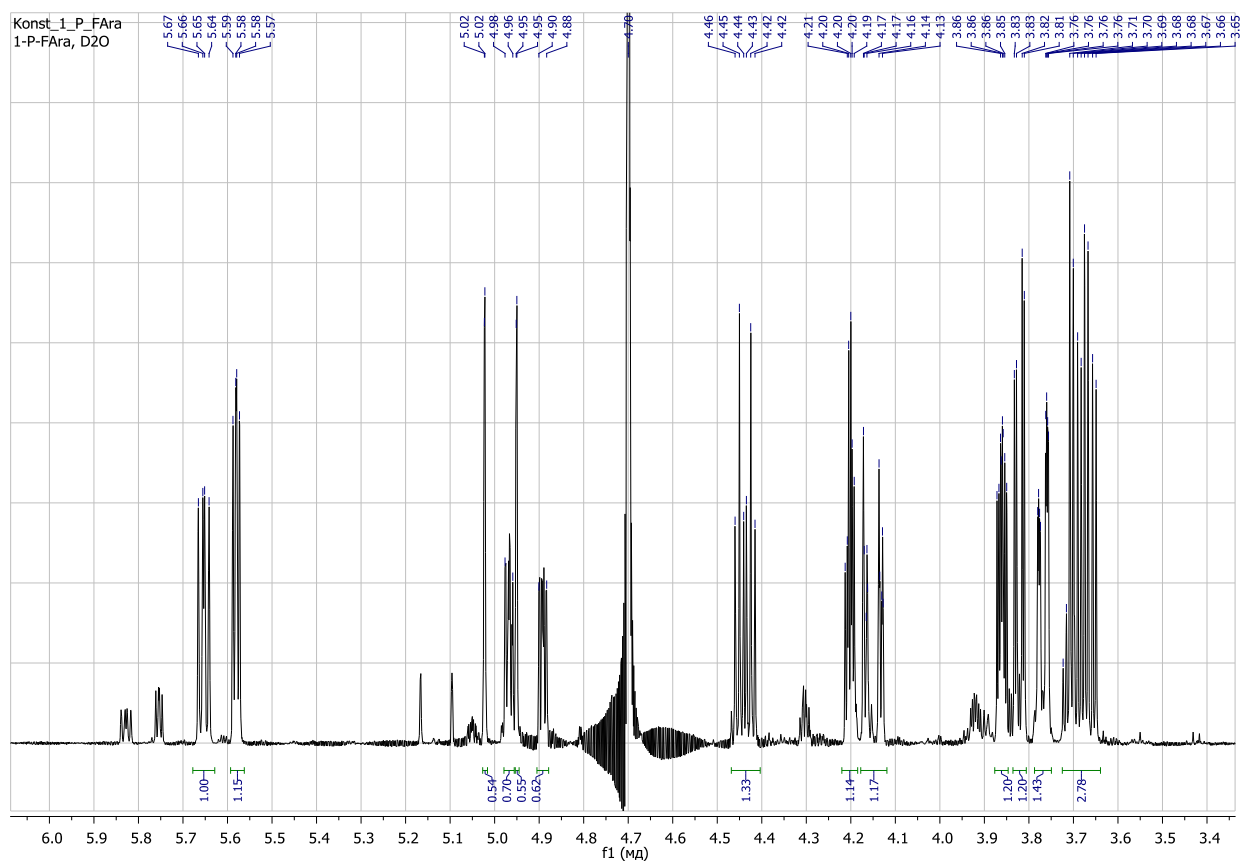
Приложение 21 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (29)



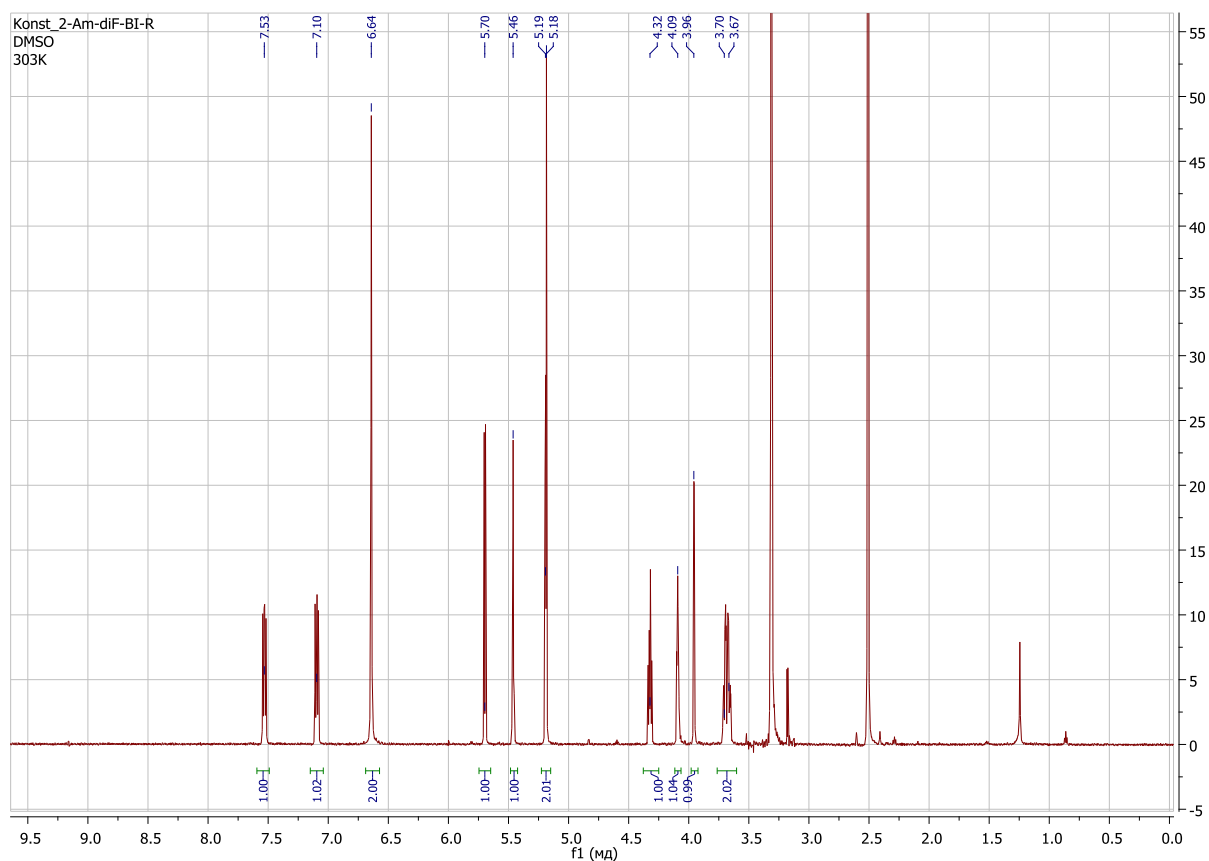
Приложение 22 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (30)



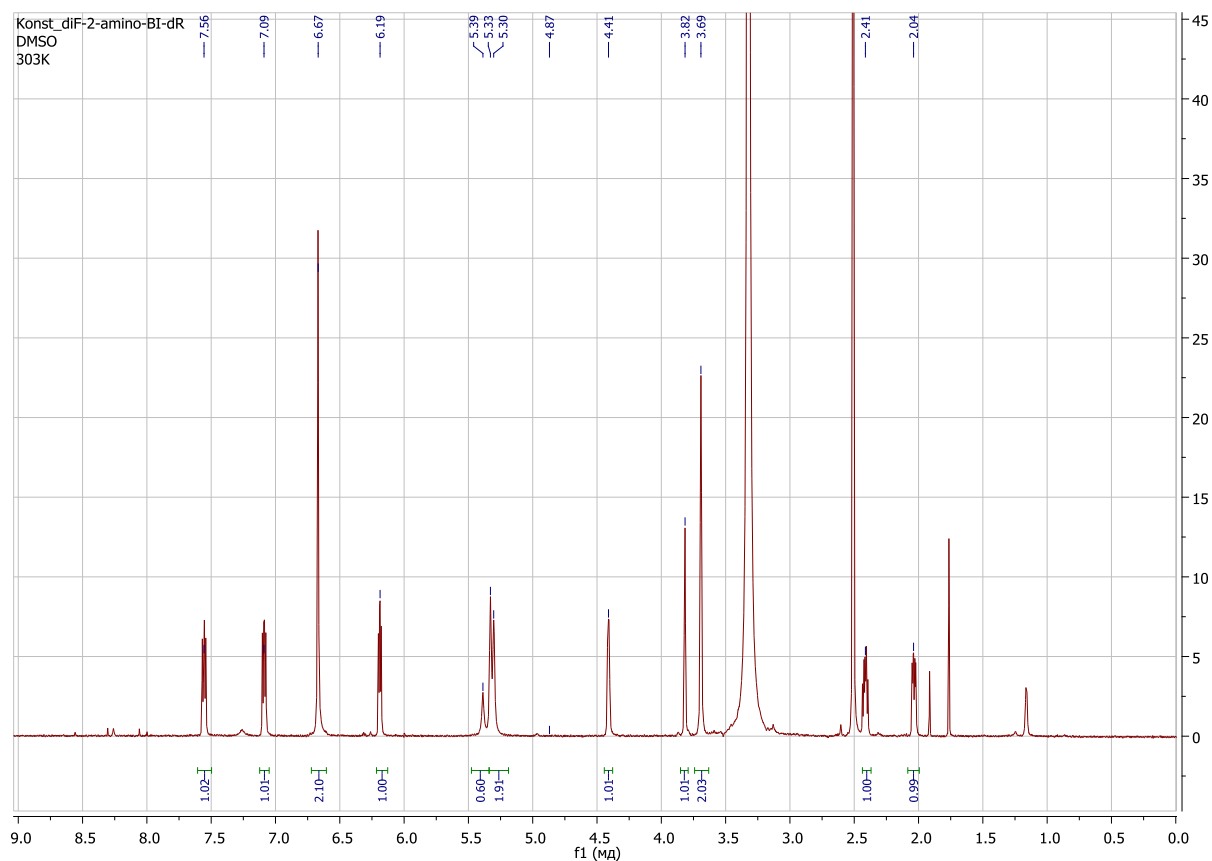
Приложение 23 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (31)



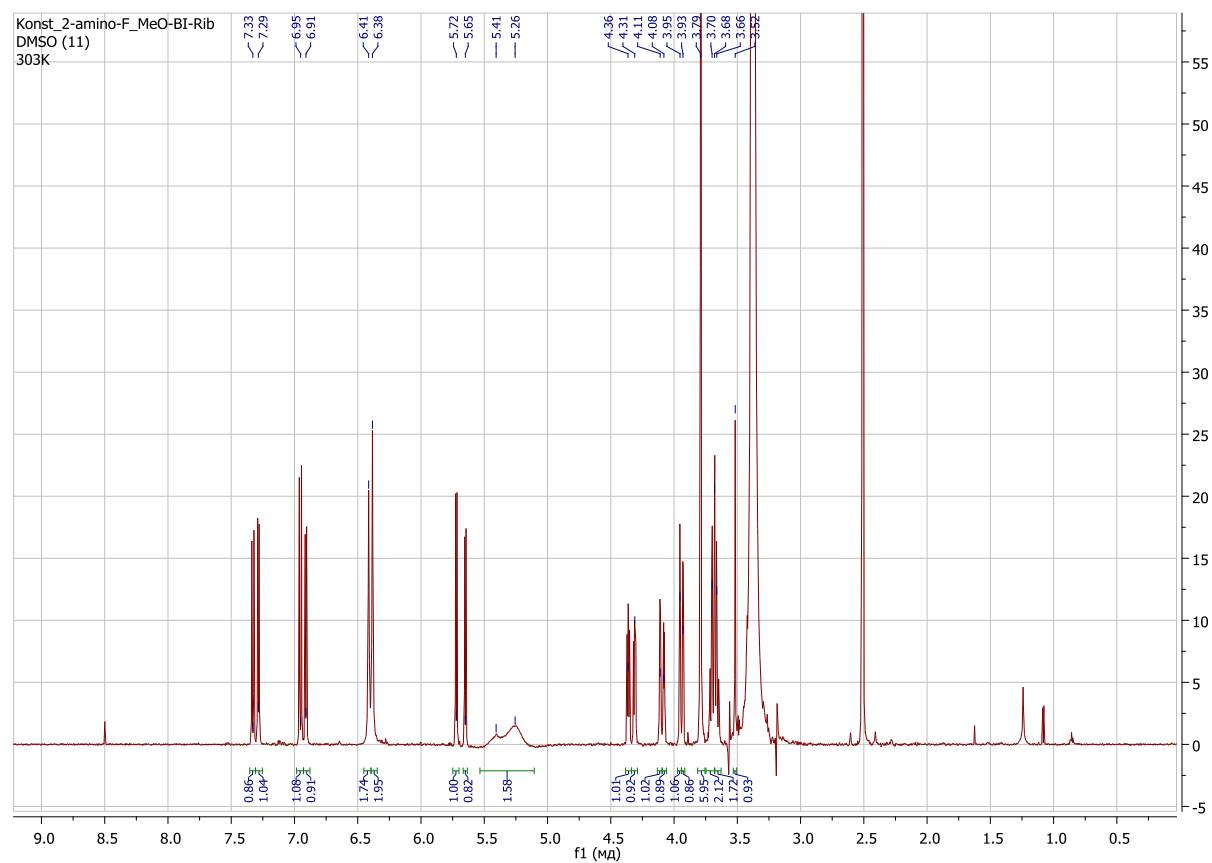
Приложение 24 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (43)



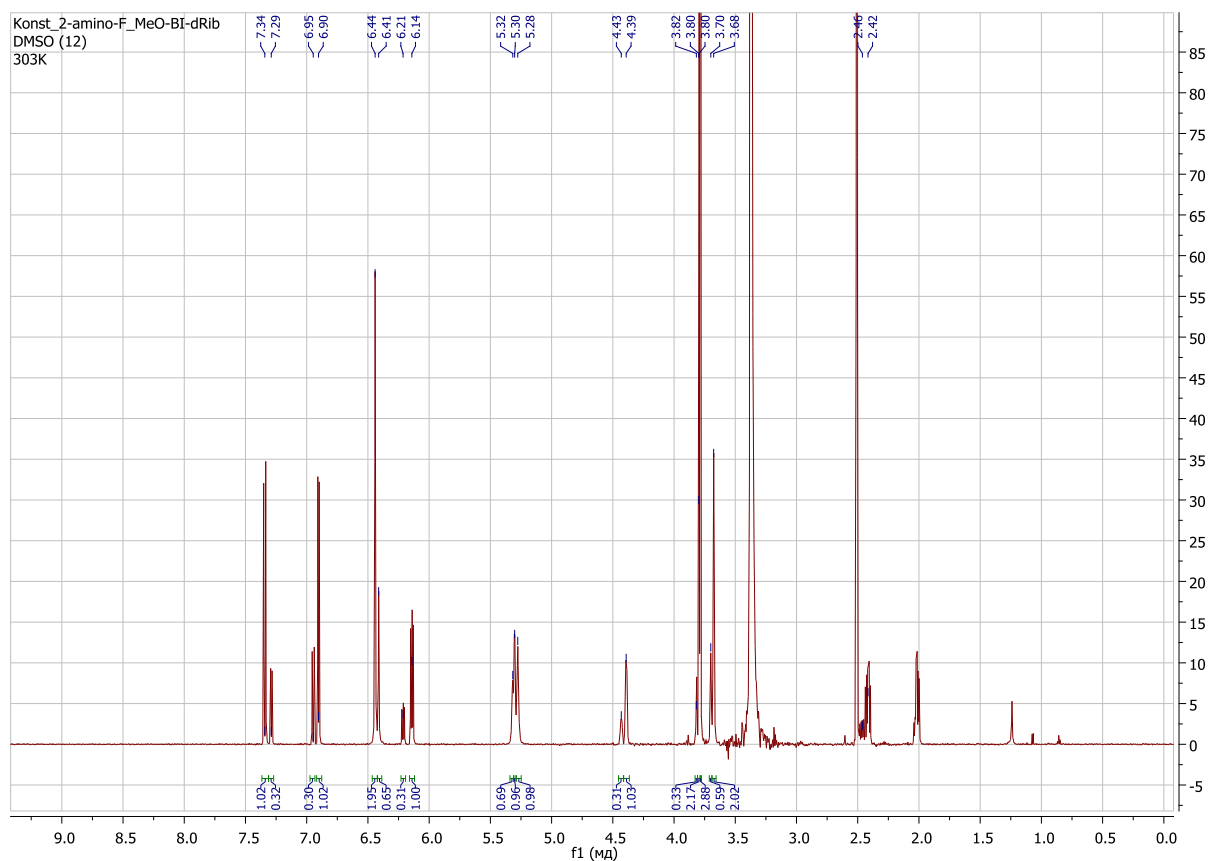
Приложение 25 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (44)



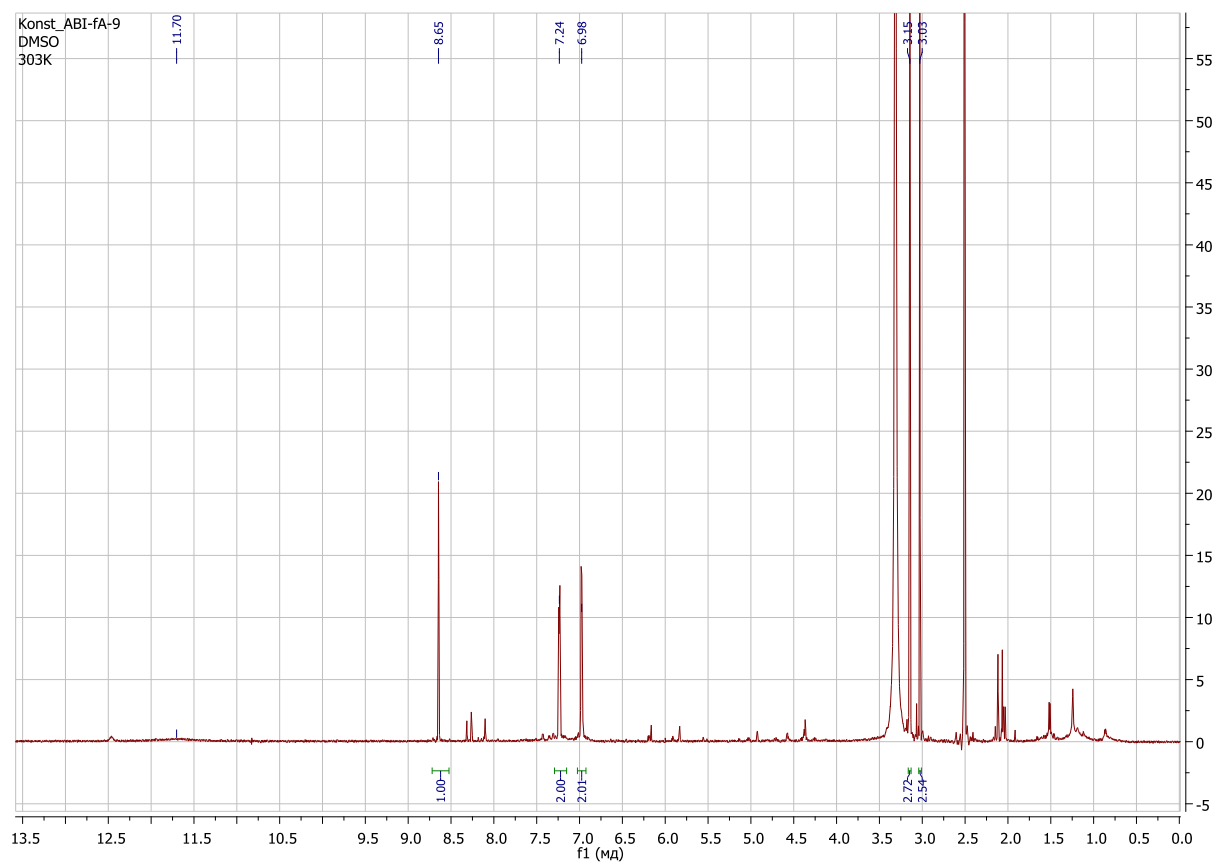
Приложение 26 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (45)



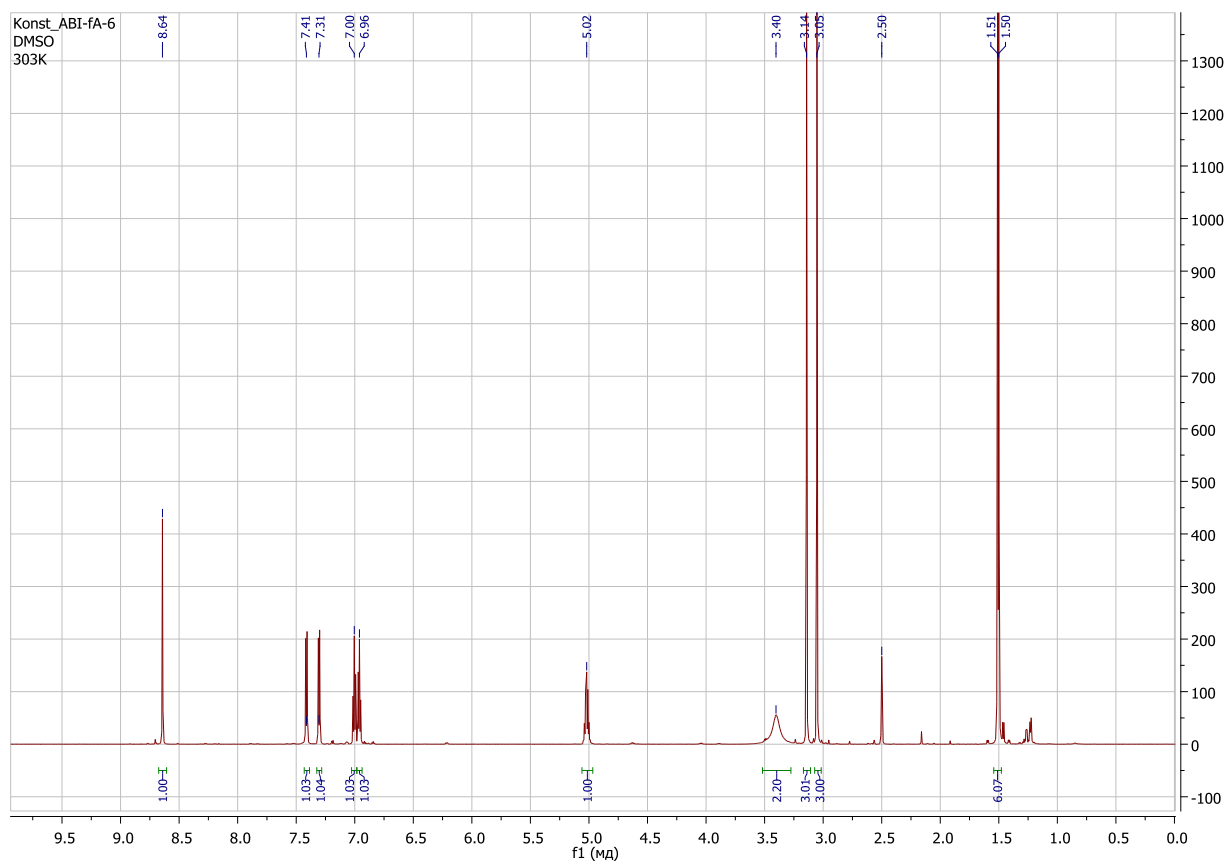
Приложение 27 - ^1H ЯМР спектр нуклеозида (46)



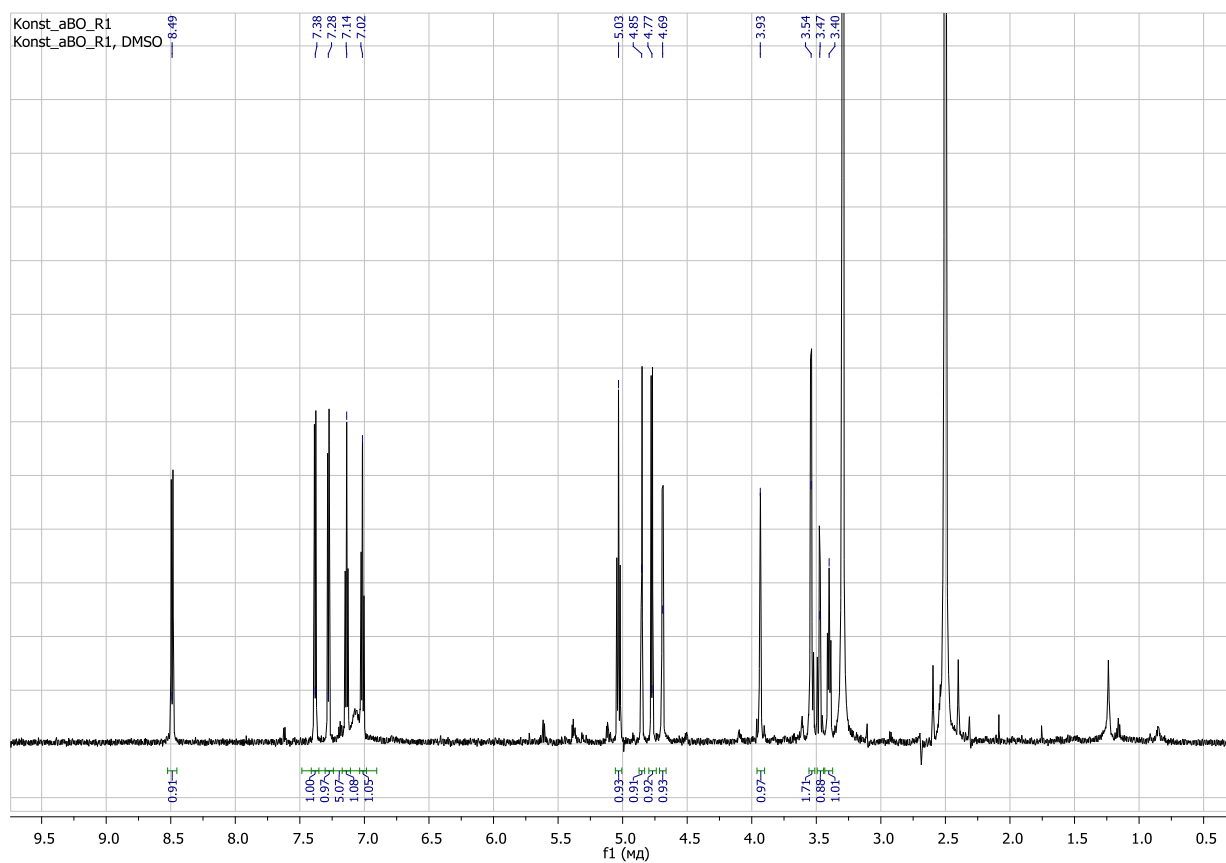
Приложение 28 - ^1H ЯМР спектр основания (52)



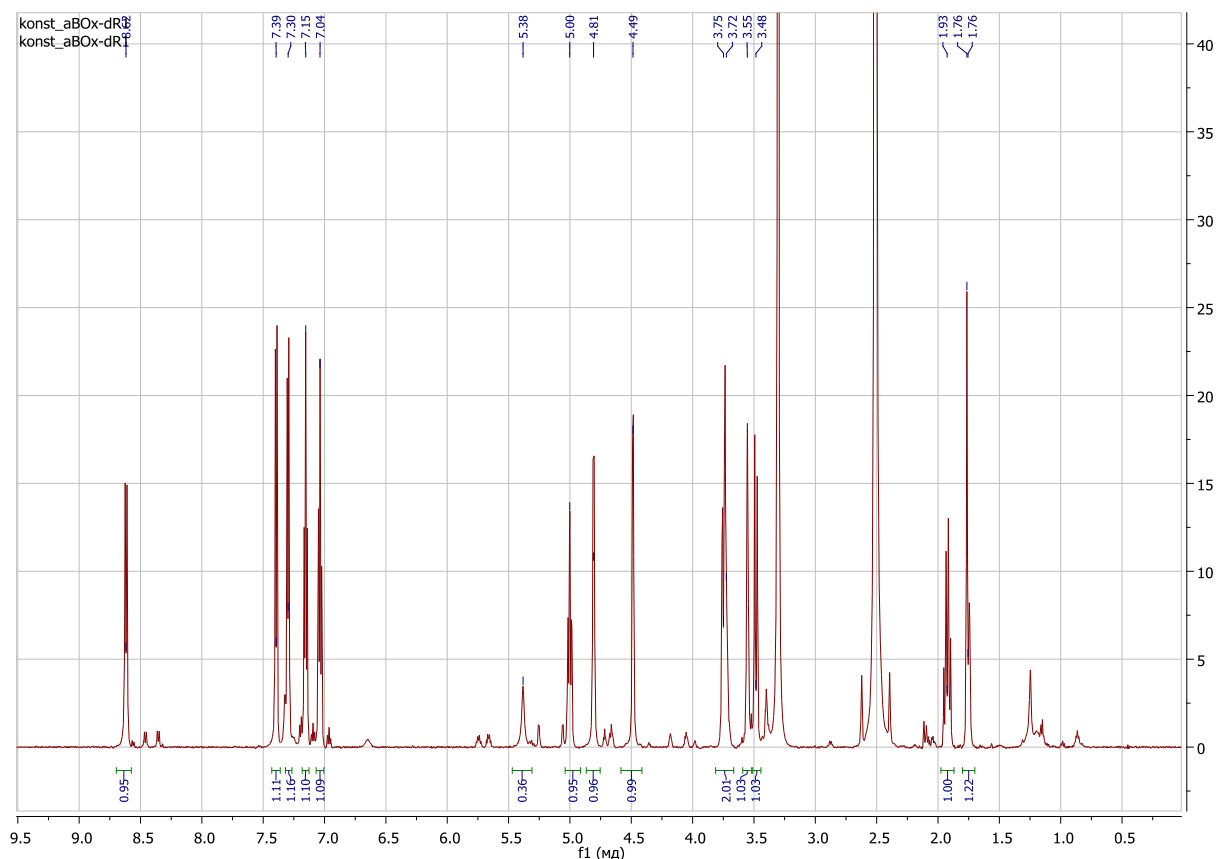
Приложение 29 - ^1H ЯМР спектр основания (53)



Приложение 30 - ^1H ЯМР спектр N^2 -(β -D-рибопиранозил)-2-аминобензоксазола (71)



Приложение 31 - ^1H ЯМР спектр N^2 -(2-дезоксид- β -D-рибопиранозил)-2-аминобензоксазола (72)



Приложение 32 - Физико-химические свойства и данные ^1H ЯМР для оснований 2-7

Соед.	Выход* (%)	Мр (°C), Физическое состояние	Чистота (%) [ВЭЖХ], метод I)	^1H ЯМР (ДМСО- d_6), δ (м.д.), J (Гц)			
				H2 (s)	H7	NH (br s)	Другие
2	78	≥ 190 Светло-коричневые кристаллы	71.6 [$R_t = 5.8$]	8.10	6.79 (м)	12.66	7.12 (д, $J = 8.0$, 1 H, H5),
3	56	230-232 Бесцветные кристаллы	89.0 [$R_t = 7.2$]	8.15	7.31 (м)	12.75	-
4	40	193-195 Светло-коричневые кристаллы	86.1 [$R_t = 6.9$]	8.54	7.64 (д, $J = 9.5$)	13.04	4.38 (с, 3 H, OCH_3)
5	45	158-160 Кристаллы кремового цвета	66.8 [$R_t = 8.9$]	8.05	7.18 (д, $J = 9.6$)	12.54	1.37 (т, $J = 7.0$, 4.10, 3 H, OCH_2CH_3), (дд, $J = 6.9$, 2 H, OCH_2CH_3),
6	60	180-182 Светло-коричневые кристаллы	90.9 [$R_t = 7.9$]	8.03	7.10 (д, $J = 10.8$)	12.60	3.12 (т, $J = 4.3$; 3.73, 4 H, CH_2NCH_2), (т, $J = 4.5$, 4 H, CH_2OCH_2)
7	50	183-185 Светло-коричневые кристаллы	86.2 [$R_t = 8.6$]	8.05	7.08 (д, $J = 11.3$)	12.50	1.94 (м, 4 H, CH_2NCH_2), 3.33 (м, 4 H, CH_2CH_2)

*Выходы целевых оснований указаны по данным ИОС УРО РАН