

На правах рукописи

Арнаутова Александра Олеговна

**Химико-ферментативный синтез и биологические свойства
3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина и
бензимидазола**

Специальность: 1.4.9 Биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва, 2025 г.

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

Научный руководитель: **Константинова Ирина Дмитриевна**, кандидат химических наук

Официальные оппоненты: **Иванов Игорь Владимирович**, доктор химических наук, профессор, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, профессор кафедры Химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского, МИРЭА - Российский технологический университет (РТУ МИРЭА)
Орецкая Татьяна Семёновна, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Защита состоится 24 сентября 2025 г. в 11.00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

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

Автореферат разослан _____
(дата)

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



Олейников
Владимир Александрович

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Модифицированные нуклеозиды относятся к важнейшему классу антиметаболитов и обладают широким спектром биологической активности. Многие из нуклеозидных аналогов находят применение в качестве противовирусных (рибавирин, азидотимидин, видарабин, марибавир), противоопухолевых препаратов (кладрибин, фосфат флударабина, цитарабин) и иммуносупрессоров (кладрибин).

Модификация природных нуклеозидов по гетероциклическому основанию и/или по углеводному остатку может привести к появлению или усилению биологических свойств. Среди активных нуклеозидов, модифицированных по углеводному остатку, известен кордицепин (3'-дезоксиаденозин) – природный аналог аденозина, используемый с древних времен в китайской медицине. Кордицепин обладает противовирусным, противоопухолевым, антибактериальным, противовоспалительным и антидепрессивным действиями, но его применение как лекарственного препарата ограничено из-за короткого периода полураспада и быстрого выведения из организма.

Введение заместителей в структуру аденина или его замена на другое гетероциклическое основание в молекуле 3'-дезоксирибозидов – первая ступень в дизайне новых нуклеозидов.

Актуальность темы исследования обусловлена постоянным поиском новых эффективных противовирусных и противоопухолевых препаратов, ввиду часто развивающейся резистентностью к существующим препаратам в результате их длительного использования, а также возникновения побочных эффектов.

Цель работы и основные задачи исследования

Цель работы - получение серии новых 3'-дезоксид- β -D-эритропентофуранозидов (3'-дезоксирибозидов) замещенных аденинов и бензимидазолов для проведения первичного скрининга противовирусной активности и цитотоксичности *in vitro*.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

- осуществить химический синтез 3'-деоксиинозина – донора углеводного остатка в реакции трансгликозилирования;
- изучить субстратную специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к 3'-деоксиинозину и замещенным аналогам аденина, оптимизировать условия проведения ферментативного синтеза, осуществить синтез 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина;
- провести скрининг противоопухолевой активности 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина *in vitro* на линиях опухолевых клеток человека;
- изучить субстратную специфичность пуриннуклеозидфосфорилазы *E. coli* по отношению к замещенным аналогам бензимидазола, оптимизировать условия проведения ферментативного синтеза, осуществить синтез 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола;
- оценить противогерпетическую активность 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола *in vitro*.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Научная новизна исследования заключается в использовании пурипнуклеозидфосфорилазы *E. coli* для получения новых 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина и бензимидазола. В отличие от химического синтеза такой метод получения аналогов нуклеозидов является более простым, регио- и стереоспецифичным, не требует введения защитных групп и отвечает принципам «зеленой химии».

Теоретическая значимость работы заключается в модификации стадии синтеза 3'-дезоксиинозина, изучении особенностей протекания реакции трансгликозилирования в присутствии 2',3'-ангидроинозина и в изучении возможности использования генно-инженерной пурипнуклеозидфосфорилазы в синтезе новых нуклеозидов ряда 3'-дезоксирибозы. Практическая значимость работы заключается в синтезе новых нуклеозидов и скрининге их биологической активности с целью выявления соединений, перспективных для лечения различных заболеваний. В работе впервые показана противоопухолевая активность аналогов кордицепина *in vitro* на линиях опухолевых клеток человека - Jurkat, Raji, MCF-7, TNP-1, U937, SKOV3, A549, LS174T, а также на линии клеток фибробластов человека WI-26. Наиболее цитотоксичным оказался 2-фторкордицепин в отношении всех исследуемых линий кроме клеток линий рака яичников. Также проведена оценка противогерпетической активности 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола *in vitro*. Среди полученных соединений определены лидерные соединения, требующие дальнейших исследований их противовирусной активности.

Личный вклад соискателя

Вклад автора заключался в выборе направления исследования, разработке вариантов химической и ферментативной модификации структур нуклеозидов, синтезе соединений, получении спектра физико-химических характеристик новых соединений и установления их структуры.

Положения, выносимые на защиту

1. Химический синтез 3'-дезоксиинозина;
2. ферментативный синтез 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина;
3. изучение особенностей протекания реакции трансгликозилирования в присутствии 2',3'-ангидроинозина;
4. ферментативный синтез 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола;
5. оценка противоопухолевой активности 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина *in vitro*;
6. изучение противовирусной активности 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола *in vitro*.

Апробация результатов и публикации

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 11 всероссийских и международных конференциях в формате устных и стендовых докладов, по теме работы было опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science, глава в книге.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 144 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть, заключение, список сокращений и список использованной литературы. Материал проиллюстрирован 104 рисунками и 5 таблицами. Библиографический указатель содержит ссылки на 279 источников.

Основное содержание работы

3'-Дезоксирибозиды замещенных аналогов аденина и бензимидазола относятся к классу антиметаболитов и представляют интерес в качестве объекта исследования. Введение заместителей в гетероциклическое основание, а также замена рибозы на 3-дезоксирибозу в структуре нуклеозидов может влиять на появление или усиление биологических свойств.

Синтез 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина и бензимидазола включал в себя два этапа. Первый этап – получение 3'-дезоксиинозина (донора 3-дезоксирибозы) химическим способом, второй этап – синтез модифицированных 3'-дезоксирибозидов с использованием 3'-дезоксиинозина, соответствующих гетероциклических оснований и пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli* (PNP).

Генно-инженерная PNP *E. coli* представляет собой гексамерный белок с молекулярной массой 162 кДа. Структура активного центра фермента обуславливает его широкую субстратную специфичность в отношении многих соединений ряда пуриновых нуклеозидов, что позволяет синтезировать множество новых модифицированных нуклеозидов с интересными биологическими свойствами.

PNP катализирует реакцию трансгликозилирования в ряду пентофураноз. Первая стадия этой реакции – нуклеофильное замещение по С1-атому остатка пентофуранозы неорганическим фосфатом с образованием основания и пентозо-1-фосфата. На второй стадии фермент катализирует присоединение гетероциклического основания (ГЦО) к С1-атому фуранозы с образованием нового нуклеозида. Обе стадии обратимы (Рисунок 1).

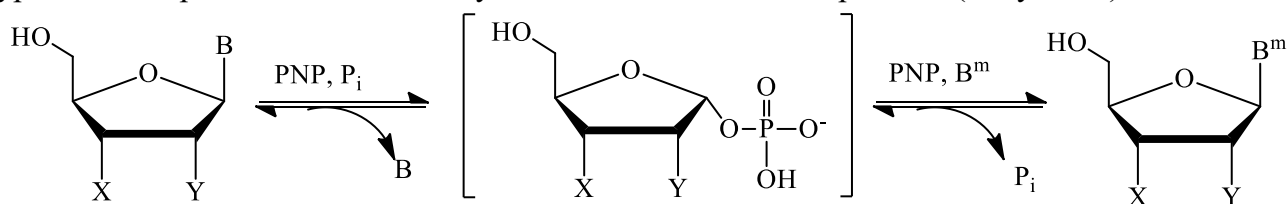


Рисунок 1 – Общая схема реакции трансгликозилирования. В – природное ГЦО; В^m – модифицированное ГЦО; X, Y = H, OH, F и др.; P_i – неорганический фосфат.

Дизайн ферментативного синтеза строится следующим образом:

- тестовые реакции для оптимизации таких условий, как соотношение субстратов, концентрация фермента и, при необходимости, дополнительных параметров, например, температуры и pH буферного раствора;
- масштабирование синтеза;
- выделение целевых соединений;
- подтверждение структур полученных соединений с помощью масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии.

1. Синтез и противоопухолевые свойства 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина

1.1 Синтез 3'-дезоксиинозина

Химический синтез 3'-дезоксиинозина (3'-dIno) представлен на схеме на Рисунке 2. Суспензию инозина (Ino, **1**) в ДМФА обрабатывали триметилортоацетатом (ТМОА) с образованием 2',3'-ортоацетата инозина (**2**). Соединение **2** выделяли высаживанием в гексан с выходом 98%.

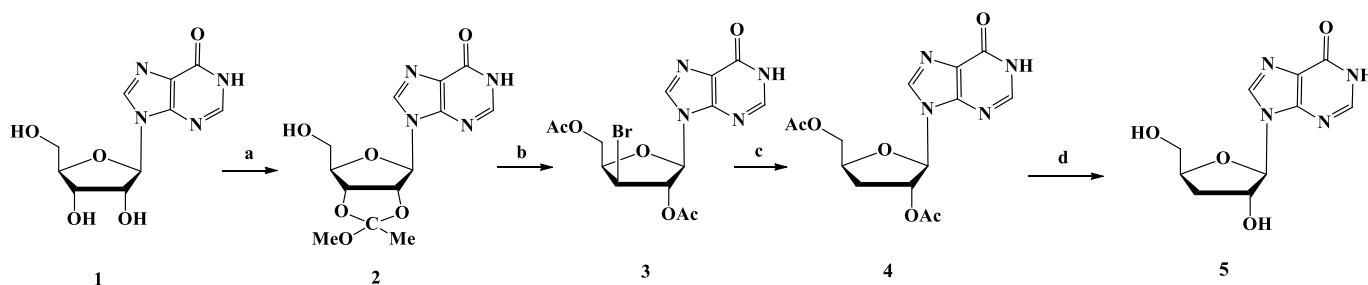


Рисунок 2 – Схема синтеза 3'-дезоксиинозина **5**.

Условия и реагенты: (a) - ДМФА, ТМОА; (b) – AcBr; (c) – Bu₃SnH, Bz₂O₂; (d) – NH₄OH.

На следующей стадии взаимодействием ортоацетата **2** с ацетилбромидом был получен 2',5'-диацетил-3'-деокси-3'-ксилоброминозин (**3**), выделенный колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 85%.

Соединение **3** было дегалоидировано до 2',5'-диацетил-3'-дезоксиинозина (**4**) радикальным восстановлением (гидрид трибутиллола и перекись бензоила). За ходом реакции следили при помощи ВЭЖХ. Продукт **4** был выделен колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 70%.

Наконец в результате обработки соединения **4** водно-метанольным раствором аммиака был получен целевой продукт - 3'-дезоксиинозин (**5**). За ходом реакции следили при помощи ТСХ. Соединение **5** было выделено колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 63% и охарактеризовано данными масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии.

1.2 Синтез 2-фторкордицепина с использованием 3'-дезоксиинозина

Наиболее перспективным аналогом кордицепина на данный момент является 2-фторкордицепин (2-FCord) (**7**). Обычно его получают химическим способом из кордицепина или прямым рибозилированием 2-фтораденина (2-FAde) с выходом до 50%.

Нами предложен и осуществлен ферментативный синтез в присутствии генно-инженерной PNP *E. coli* (Рисунок 3). В качестве донора основания использовали 2-фтораденозин (2-FAdo) (**6**), а не само свободное основание, что связано с чрезвычайно низкой растворимостью 2-FAde в воде (менее 0.5 мМ при 50 °С). В качестве донора 3-дезоксирибозы использовали 3'-дезоксиинозин **5**.

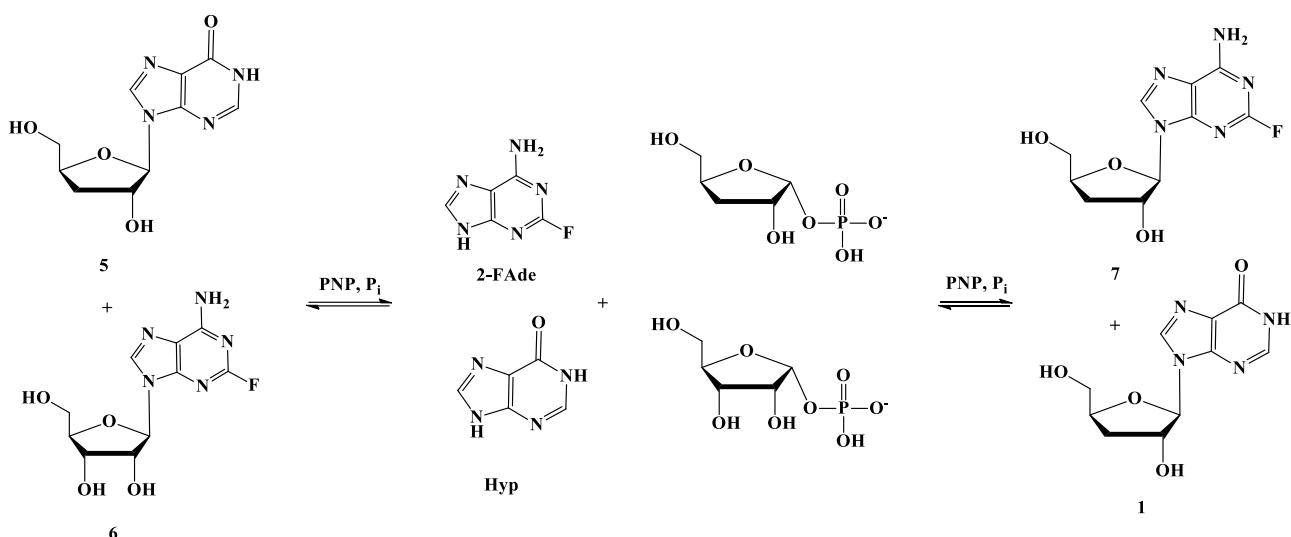


Рисунок 3 – Схема ферментативного синтеза 2-FCord, где Нур – гипоксантин.

На первом этапе подбирали оптимальное соотношение субстратов: 3'-dIno к 2-FAdo (Рисунок 4) и концентрацию PNP (Рисунок 5). По данным, представленным на Рисунках 3 и 4, очевидно, что наибольшее значение конверсии достигается при 1.5- и 2-кратном избытке 3'-dIno и при концентрации PNP 5.5 и 7.0 е.а./мл.

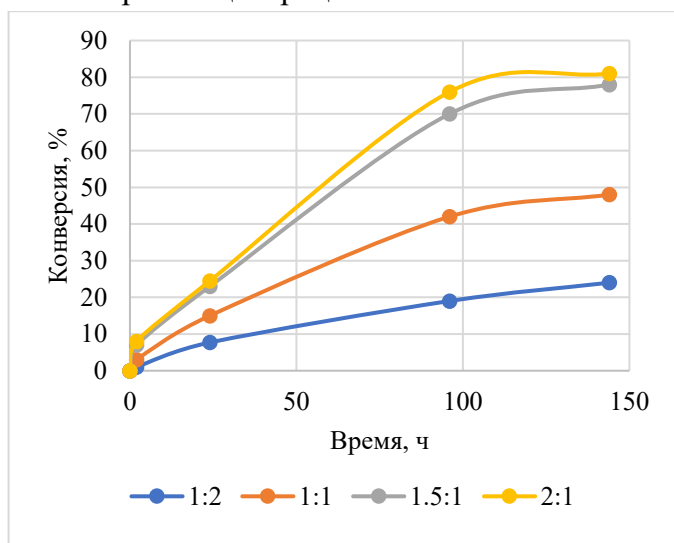


Рисунок 4 – Динамика накопления 2-FCord в зависимости от соотношения 3'-dIno к 2-FAdo. Условия: объем реакции 1 мл, 50 °C, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP 2.3 е.а./мл.

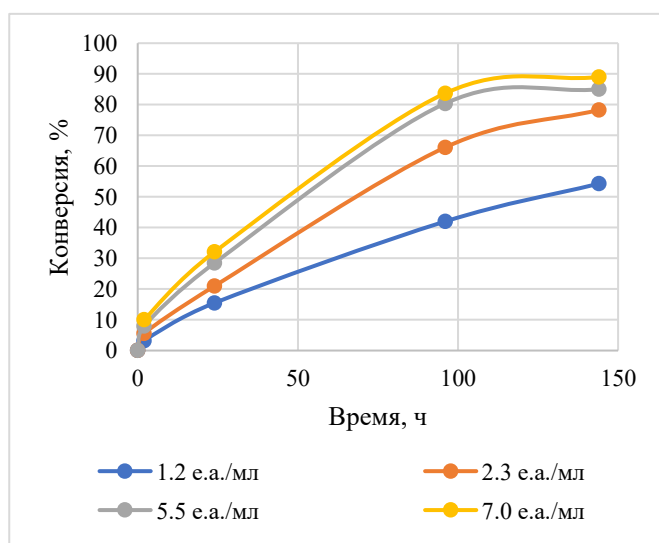


Рисунок 5 – Динамика накопления 2-FCord в зависимости от концентрации PNP. Условия: объем реакции 1 мл, 50 °C, 3'-dIno к 2-FAdo – 1.5:1, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7).

После оптимизации основных параметров осуществили синтез 2-FCord в следующих условиях: объем реакции 315 мл, 50 °C, соотношение 3'-dIno к 2-FAdo – 1.5:1, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7), концентрация PNP 17.2 е.а./мл. Реакцию остановили через 12 дней при достижении значения конверсии 70%. Целевое соединение 7 было выделено колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 58 % и охарактеризовано данными масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии.

1.3 Изучение механизма образования примесного нуклеозида

При масштабировании синтеза 2-FCord до сотен миллиграммов произошло неожиданное замедление реакции и снижение конверсии 2-FAdo в 2-FCord до 5%. Хотя PNP работала нормально, смесь содержала малое количество фосфата 3-дезоксирибозы (судя по количеству гипоксантина, 5.45%), в то время как основным продуктом реакции был 2-фтораденин. В реакционной смеси через 14 дней после начала реакции был обнаружен нуклеозид неизвестной структуры с молекулярным ионом $[M+H]^+ = 241.0923$.

Перед нами стояла задача определить, что влияет на нормальный ход реакции трансгликозилирования, связано ли снижение конверсии с присутствием в реакционной смеси неизвестного нуклеозида и какова его природа.

Через 6 дней после начала реакции смесь содержала уже 30% неизвестного нуклеозида (**8**). Этот процент не изменился в ходе дальнейшей инкубации. Неизвестное соединение **8** выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 17% (10.6 мг) и охарактеризовали с помощью масс-спектрометрии. Расшифровка ЯМР-спектров (^1H , ^{13}C , COSY и HSQC, HMBC [^1H , ^{13}C] и [^1H , ^{15}N]) примесного нуклеозида позволила определить его структуру (Рисунок 6а).

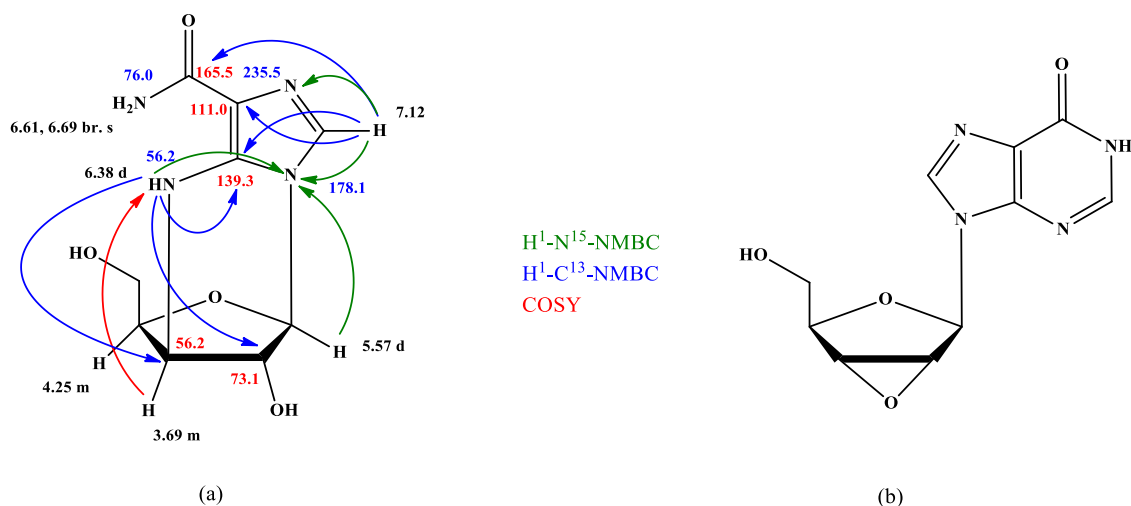


Рисунок 6 – (а) - Структура нуклеозида **8** и схема взаимодействия некоторых ядер; (b) - Структура нуклеозида **9**.

Мы проверили возможность образования этого продукта при прямом фосфорилизе 3'-dIno. Оказалось, что за неделю в реакционной смеси, содержащей 3'-dIno, PNP *E. coli* и калий-фосфатный буфер, при 50 °C образовывалось до 14% этого соединения. Для контроля проверили устойчивость 3'-деоксиинозина в водном растворе при 50 °C без фермента. В этих условиях также образовывался нуклеозид **8**. Поскольку 3'-dIno должен быть устойчив в этих условиях, мы предположили, что в нем есть некая примесь, из которой и образуется нуклеозид **8**.

После проведения более тщательного хроматомасс-спектрометрического анализа 3'-dIno, из которого образовывался примесный нуклеозид **8**, оказалось, что в образце 3'-dIno присутствует 16.3% примеси с молекулярным ионом $[M+H]^+ = 251.0765$. Раньше мы не заметили эту примесь из-за плохо подобранных условий хроматографии. Такой массе соответствует 2',3'-ангидроинозин **9**, структура которого подтверждена спектрами ЯМР (Рисунок 6b).

Мы предположили, что соединение **9** образуется на стадии дегалоидирования защищенного нуклеозида **3**. Чтобы проверить эту гипотезу, мы заменили обработку соединения **3** гидридом трибутилолова на дегалоидирование с использованием H_2/Pd (Рисунок 7).

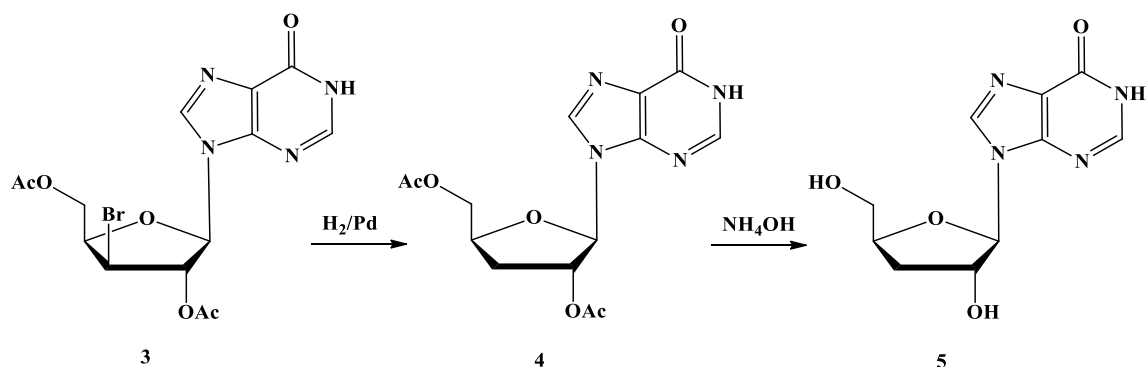


Рисунок 7 – Стадия каталитического гидрирования с последующим снятием ацетильных групп в синтезе 3'-dIno.

Ход реакции контролировали при помощи ТСХ в системе этилацетат-этанол (3:2) и ВЭЖХ. Диацетат **4** выделили колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 67%, после чего обработали **4** водно-метанольным раствором аммиака с образованием 3'-дезоксиинозина **5**. Целевое соединение **5** выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 71%. Полученные соединения **4** и **5** были идентичны соединениям, полученным ранее (по данным масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии). В образце 3'-dIno **5** следов соединения **9** обнаружено не было.

Образование нуклеозида **8** из 2',3'-ангидроинозина **9** было описано более чем 40 лет назад, но реакция протекала в более жестких условиях – 0.1M NaOH, 80 °C.

Мы решили исследовать реакцию образования нуклеозида **8** из эпоксида **9**. Соединение **9** было стабильно в чистой воде при 50 °С в течение 72 часов. Но при инкубации соединения **9** в 5 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.0) при 50 °С через 96 ч мы обнаружили пики на профиле ВЭЖХ, соответствующие исходному веществу **9** (RT 13.288 мин.), нуклеозиду **8** (RT 7.038 мин.) и нескольким дополнительным продуктам (RT 4.380, 7.923 и 11.188).

Мы предположили, что компоненты смеси (RT 4.380, 7.923 и 11.188) являются искомыми промежуточными продуктами, присвоили им номера **10**, **11** и **12**, соответственно. Однако количество этих промежуточных продуктов было недостаточно для их выделения из реакционной смеси и идентификации. Скорее всего, время жизни промежуточных продуктов слишком мало, и нужно было найти способ замедлить реакцию и накопить вещества в достаточном количестве.

Мы решили, что самый простой способ увеличить содержание промежуточных продуктов **10**, **11** и **12** – использовать D₂O вместо H₂O. Наше предположение полностью подтвердилось: количество промежуточных нуклеозидов в реакционной смеси увеличилось с 3 - 5% до 15%.

Однако при pH 7.0 образование ациклического соединения **8** происходило довольно быстро, поэтому была изучена зависимость скорости образования нуклеозида **8** от pH реакционной смеси в диапазоне pH от 3 до 11: наиболее низкая конверсия нуклеозида **8** (32.07 %) наблюдалась при pH 4.

Мы провели гидролиз соединения **9** при pH 4.1 в D₂O, выделили промежуточные соединения **10** (5 мг, 9%), **12** (8 мг, 13%), структуры которых показаны на Рисунке 8, и охарактеризовали их с помощью ЯМР-спектроскопии.

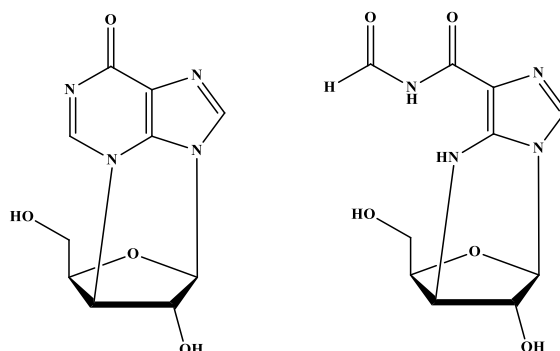


Рисунок 8 – Структуры промежуточных соединений **10** и **12**.

Чтобы определить последовательность превращений, мы провели гидролиз соединений **9**, **10** и **12**. При этом исследовали изменение УФ-спектров реакционных смесей при инкубации водных растворов от 0 до 312 ч. Анализ динамики спектров позволил определить цепь превращения нуклеозида **9**: **9**→**10**→**12**→**8**, и предположить возможный механизм образования нуклеозида **8** в D₂O (Рисунок 9).

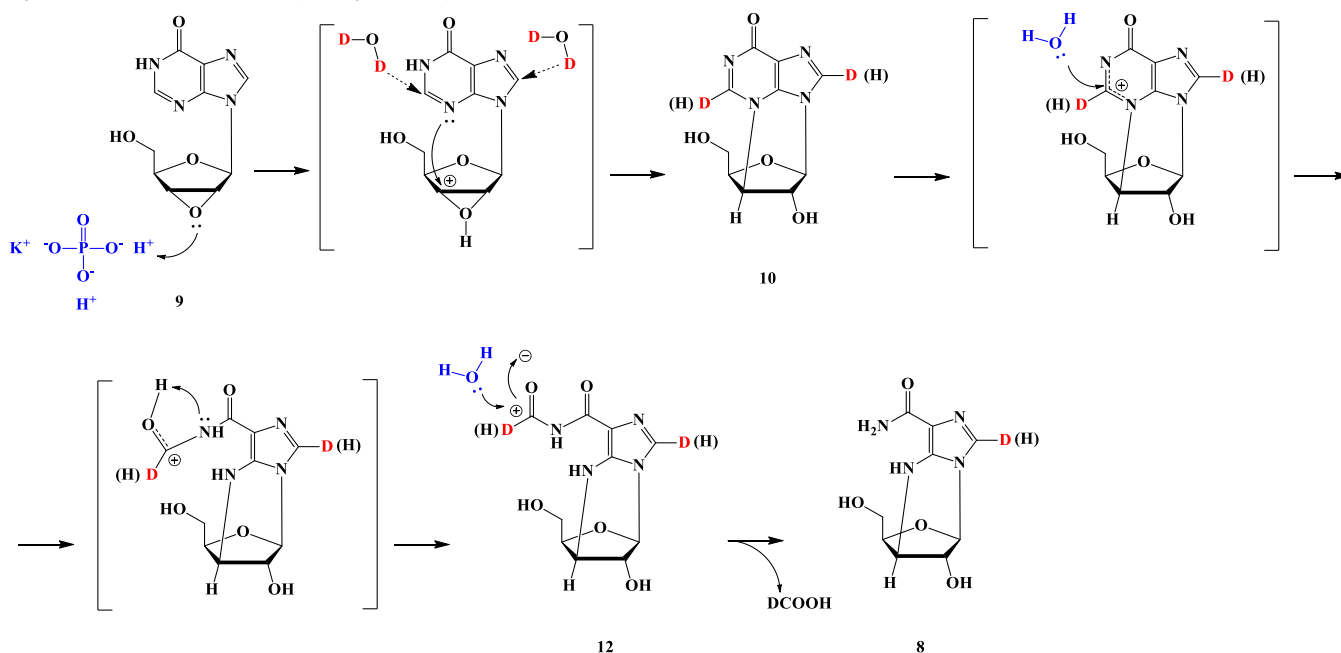


Рисунок 9 – Возможный механизм гидролиза эпоксида **9** с переходными состояниями и внутримолекулярными перегруппировками.

После определения природы и пути возникновения нуклеозида **8** нужно было понять, какое из примесных соединений - **8**, **9**, **10** или **12** - замедляет синтез 2-фторкордицепина. Для этого мы провели реакции фосфорилиза инозина, 3'-dIno и 2-FAdo в присутствии соединений **8**, **9**, **10** и **12**. Судя по полученным результатам, ни соединение **8**, ни соединения, образованные из него, не влияют на активность PNP *E. coli*.

В общем, причина замедления реакции транскликозилирования в присутствии соединения **8** остается неясной. Возможно, с активным сайтом PNP *E. coli* взаимодействуют какие-то короткоживущие промежуточные продукты, время жизни которых слишком мало,

чтобы можно было их выделить. Мы полагаем, что это соединения со структурами, подобными структурам **8**, **9**, **10** и **12**.

3'-Дезоксиинозин, полученный с помощью каталитического дегалоидирования, был использован в синтезе 2-фторкордицепина. По данным ВЭЖХ реакционная смесь не содержала примесь **8**. Конверсия 2-FAдо в продукт **7** составила 94% за 76 дней. 2-FCord выделили с помощью колоночной обращенно-фазовой хроматографии с выходом 78%.

1.4 Синтез 2-фторкордицепина с использованием фосфата 3-дезоксирибозы

Трансгликозилирование в синтезе пуриновых нуклеозидов обычно осуществляют, используя в качестве донора углеводного остатка пиримидиновые нуклеозиды. Такой процесс считается термодинамически более выгодным, чем перенос углеводного остатка с пуринового нуклеозида на модифицированное пуриновое основание. Тем не менее, нам удалось достичь конверсии 70 - 94% с выходом 2-FCord **58** – 78%. Существенным недостатком описанного способа синтеза было медленное протекание реакции (12-76 дней) при использовании высокой концентрации фермента (17.2 – 19.0 е.а./мл). Очевидно, что скорость образования 2-фторкордицепина существенно зависела от количества образовавшегося 1-альфа фосфата 3-дезоксирибозы (1-P-3-dRib) при фосфороллизе 3'-dIno. Собственно говоря, именно этот процесс оказался лимитирующим фактором в синтезе 2-фторкордицепина. Мы предположили, что использование в реакции трансгликозилирования химически синтезированного «готового» 1-P-3-dRib позволит существенно сократить время синтеза и, может быть, даже сэкономить какое-то количество PNP.

Для синтеза 2-FCord **7** в качестве исходных субстратов использовали 2-FAдо **6** и синтезированный нами 1-P-3-dRib (**13**) (Рисунок 10).

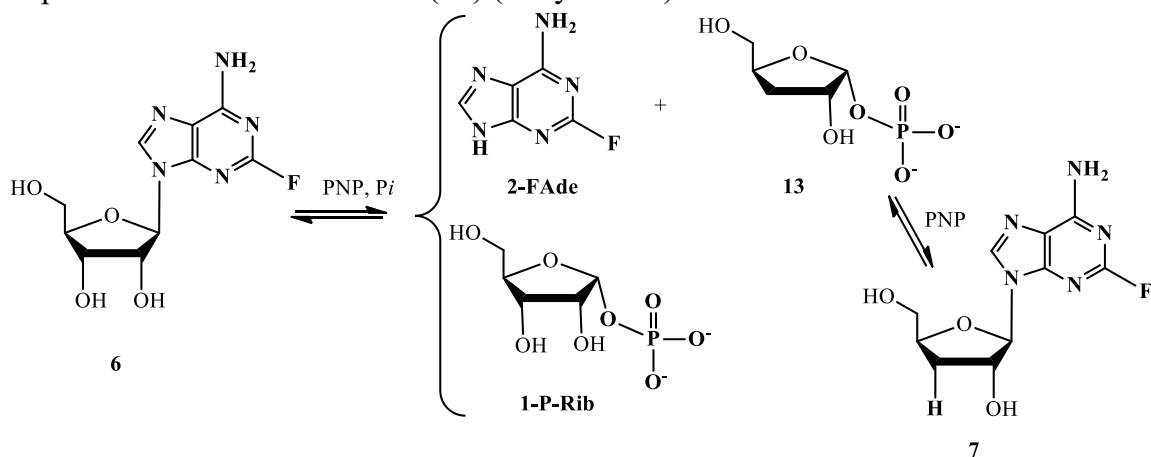


Рисунок 10 – Схема синтеза 2-FCord.

Для достижения максимальной конверсии 2-FAдо в 2-FCord были оптимизированы следующие параметры: соотношение исходных субстратов, pH, температура и концентрация PNP и проведен синтез 2-FCord в оптимальных условиях: объем реакции 100 мл, 50 °C, соотношение 2-F-Ado:1-P-3-dRib - 1:3, 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 8.0), концентрация PNP – 10.5 е.а./мл. Конверсия 2-FAдо в 2-FCord - 84.72% была достигнута за 72 часа. Продукт **7** был выделен колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 66%.

1.5 Химический синтез 2-фторкордицепина

В качестве альтернативы ферментативному способу получения был предложен и реализован химический синтез 2-FCord, в основе которого лежит подход, использовавшийся ранее для получения кордицепина с некоторыми изменениями (Рисунок 11).

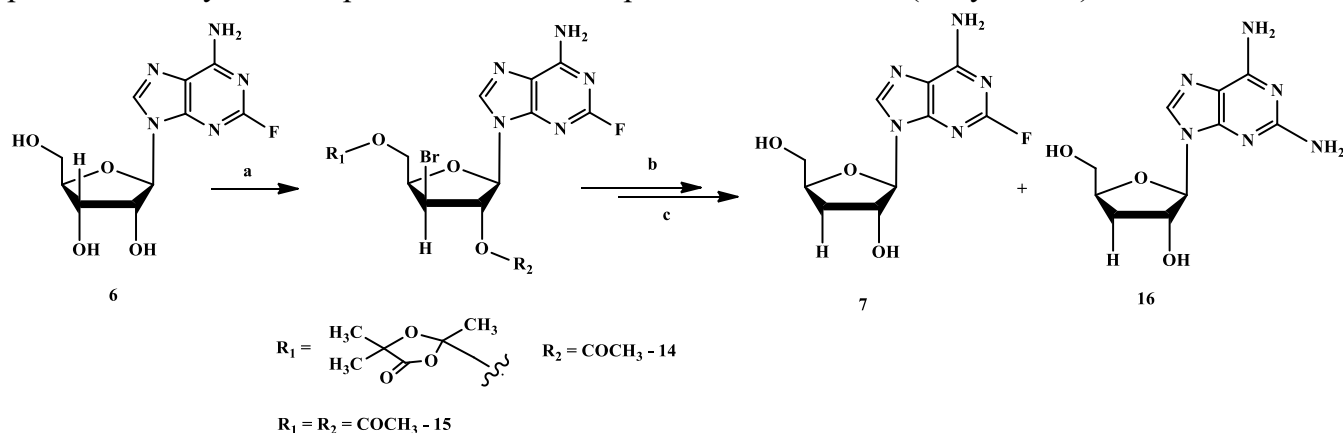


Рисунок 11 – Схема химического синтеза 2-FCord.

Условия и реагенты: (a) – α -ацетоксиизобутирилбромид/MeCN; (b) – H_2/Pd ; (c) – NH_3 , CH_3OH .

В качестве исходного соединения выбрали 2-FAdo, который обрабатывали α -ацетоксиизобутирилбромидом с образованием смеси соединений **14** и **15** (по данным LS-MS). За ходом реакции следили по ТСХ в системе хлороформ-метанол 9:1. Смесь продуктов **14** и **15** выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией с суммарным выходом 60%.

Затем проводили дегалогенирование интермедиатов **14** и **15** гидрированием на Pd и без промежуточного выделения полупродуктов реакционную смесь обрабатывали водно-метанольным раствором аммиака. В результате получили смесь двух нуклеозидов: целевого - 2-FCord и побочного - 2-амино-3'-дезоксаденозина (**16**) (по данным LC-MS). Соединения **7** и **16** выделены обращенно-фазовой колоночной хроматографией с выходом 34% и 2%, соответственно.

Предложенный нами способ получения 2-FCord оказался наиболее эффективным среди известных дивергентных методов: синтез 2-FCord из 2-амино-3'-дезоксаденозина с выходом - 18%, синтез 2-FCord из кордицепина с выходом - 2%. Этот метод региоселективен, не требует выделения промежуточных продуктов и может быть легко масштабирован.

Состав соединений **7** и **16** подтвержден данными масс-спектрометрии, а структуры - данными ЯМР-спектроскопии (^1H , ^{13}C , COSY и HSQC, HMBC [^1H , ^{13}C] и [^1H , ^{15}N]).

1.6 Ферментативный синтез 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина

Ряд структурных аналогов кордицепина **17** - **21** (Рисунок 12) был получен реакцией трансгликозилирования в присутствии PNP *E. coli*. Стратегия синтеза нуклеозидов **17** - **21** аналогична получению 2-FCord: оптимизация условий (соотношение субстратов, концентрация PNP, pH, температура) и осуществление синтеза.

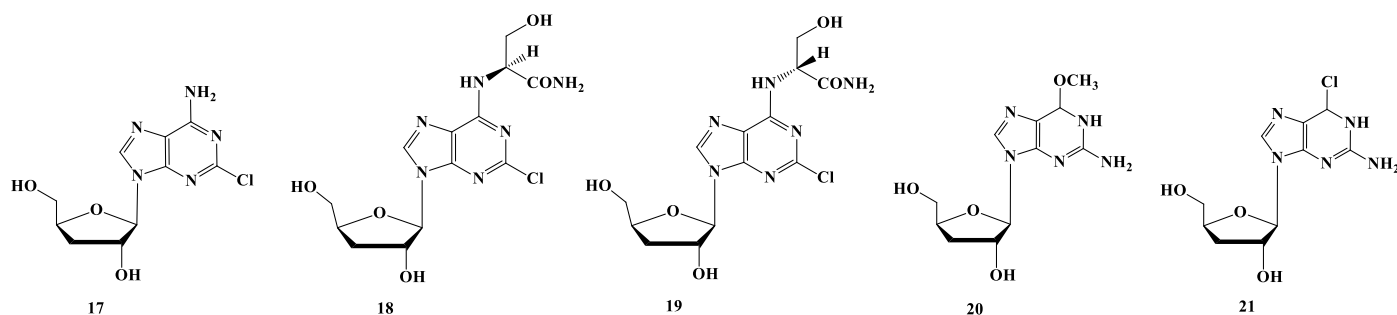
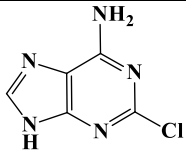
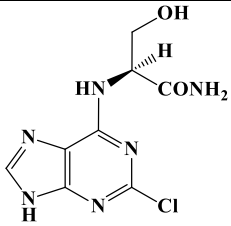


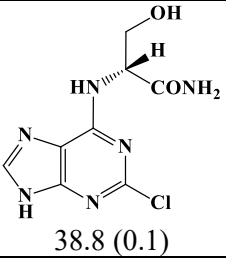
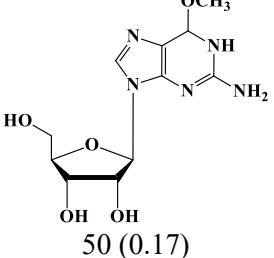
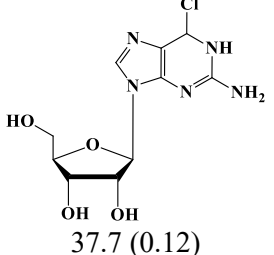
Рисунок 12 – Структуры 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина

Выбор синтезируемых нуклеозидов обоснован их структурным сходством с терапевтическими агентами. Например, структура 2-хлоркордицепина (2-ClCord) **17** близка к структуре кладрибина (2-хлор-2'-деоксиаденозина) - препарата, используемого в терапии волосатоклеточного лейкоза и рассеянного склероза. А 2-хлор-6-N-замещенные аналоги кордицепина – 2-хлор-6-N-[L-сериламидо]-кордицепин (**18**) и 2-хлор-6-N-[D-сериламидо]-кордицепин (**19**) могут обладать лучшей биодоступностью, поскольку известно, что нуклеозидные аналоги, замещенные по N6-положению аминокислотой могут оказывать влияние на внутриклеточный метаболизм модифицированного нуклеозида и его биологическую активность. Также вызывает интерес 6-O-метокси-3'-дезоксигуанозин (**20**) - аналог неларабина (2-амино-β-D-арабинофуранозил-6-метокси-9H-пурина), химиопрепарата для лечения Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза и Т-клеточной лимфобластной лимфомы. 2-Амино-6-хлор-9-(3'-дезоксирибофуранозил)-пурин (**21**) структурно напоминает 2-ClCord и кладрибин, что делает соединение **21** весьма интересным объектом исследования.

В Таблице 1 приведены данные синтеза нуклеозидов **17 – 21**, полученные в результате экспериментов по подбору оптимальных условий. Все соединения выделены обращенно-фазовой хроматографией и охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC и HMBC [^1H - ^{13}C] и [^1H - ^{15}N]).

Таблица 1 - Экспериментальные данные синтеза нуклеозидов **17 – 21**.

№ соед.	Источник основания/ основание, мг (ммоль)	3'-dIno, мг (ммоль)	Соотношение акцептор- донор углеводного остатка (по молям)	PNP, е.а./мл	Калий- фосфатный буфер (2 мМ, pH 7.0), объем, мл	Время, дни	Конверсия/ выход, % (мг)
17	 50 (0.295)	111.5 (0.442)	1:1.5	2	660	8	70/40 (34)
18	 107.2 (1.0)	210 (3.0)	1:3	5	277	17	69/52 (53.7)

19	 38.8 (0.1)	236 (0.93)	1:3	14.5	100	5	90/64 (24)
20	 50 (0.17)	97 (0.38)	1:2	7	170	37	90/71 (35)
21	 37.7 (0.12)	100 (0.4)	1:4	7	100	37	92/42 (14.9)

1.7 Исследование цитотоксической активности 3'-дезоксирибозидов производных аденина на опухолевых клетках человека *in vitro*

Проведен первичный скрининг противоопухолевой активности синтезированных 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина. Цитотоксическую активность исследовали для некоторых соединений на следующих клеточных линиях: A549 (немелкоклеточный рак легкого), Jurkat (Т-клеточная лимфома), HT-29 (карцинома эпителия толстого кишечника), LS174T (карцинома толстого кишечника), MCF-7 (карцинома молочной железы), Raji (В-клеточная лимфома), SKOV3 (рак яичников), THP-1 (моноцитарный лейкоз), U937 (лейкемическая моноцитарная лимфома), WI-26 (линия клеток фибробластов человека) (Таблица 2).

Для оценки метаболической активности клеток применялся колориметрический тест с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиума бромида (МТТ-тест).

Таблица 2 – Значения IC₅₀ исследуемых соединений для разных клеточных линий.

Соединение	IC ₅₀ , мкМ								
	U937	LS174T*	MCF-7	A549	SKOV3	Raji	THP-1	Jurkat	WI-26
Кордицепин	48.6	>100	19.5	н/а	>100	>100	>100	>100	>100
7	26	13.2	11.2	51.6	>100	38	3.8	13.5	4.6
17	50	11	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
18	50	н/и	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/и
19	н/и	н/и	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/и
21	н/и	н/и	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/и
8	н/и	н/и	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а	н/и

IC₅₀ - концентрации, при которых выживаемость клеток снижалась до 50%;

* - для соединения **17** представлены данные по клеточной линии HT-29;

н/и – не исследовали;

н/а – неактивное соединение.

2-Хлоркордицепин **17** продемонстрировал цитотоксичность в отношении клеток линии U937 и HT-29 (IC₅₀ = 50 и 11 мкМ соответственно), в отношении остальных клеточных линий активность не оценивали. Сериновые аналоги кордицепина **18** и **19** оказались неактивными в отношении большинства клеточных линий, кроме U937: 2-хлор-6-N-[L-сериламидо]-кордицепин **18** проявил цитотоксичность с IC₅₀ = 50 мкМ. Также оценили цитотоксичность циклонуклезида **8**: к сожалению, он оказался неактивным.

Наиболее активным соединением ожидаемо оказался 2-FCord **7**, он проявил токсичность в отношении всех клеточных линий, кроме SKOV3. Мы исследовали зависимость выживаемости клеток различных линий от концентраций 2-фторкордицепина **7** и кордицепина. 2-FCord проявлял цитотоксическую активность по отношению к клеткам всех линий, кроме SKOV3. Наибольшую активность 2-FCord демонстрировал на клетках моноцитарного лейкоза THP-1 и на клетках фибробластов человека WI-26, что говорит о его токсичности не только к клеткам опухолевого, но и нормального происхождения. Проблема высокой токсичности 2-фторкордицепина к нормальным клеткам может нивелироваться применением средств его таргетной доставки к опухолям или комбинированной терапией.

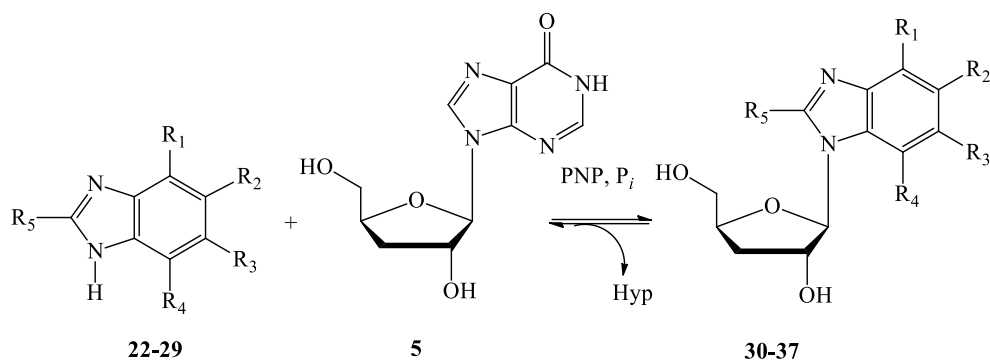
Результаты МТТ показали, что исследуемый кордицепин менее токсичен по сравнению с 2-FCord и проявляет цитотоксическую активность только к клеткам MCF-7.

Данные сравнительного изучения цитотоксичности кордицепина и его фторированного аналога однозначно свидетельствуют о том, что введение атома фтора во второе положение пуринового основания приводит к увеличению цитотоксичности нуклеозида. Исключение - линия SKOV3, на которую не действовал ни кордицепин, ни его фторированный аналог.

2. Синтез и противовирусные свойства 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола

2.1 Синтез 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола

С помощью реакции трансгликозилирования, катализируемой рекомбинантной PNP *E.coli*, синтезирован ряд 3'-дезоксирибозидов фторпроизводных бензимидазола (Рисунок 13). Выбор оснований **22** – **29** для синтеза обусловлен результатами скрининга противовирусной активности ранее синтезированных 2'-деокси-2'-фторарабинозидов замещенного бензимидазола и рибозидов замещенного 2-амино-бензимидазола. Было показано, что рибозид 2-амино-5,6-дифторбензимидазола проявил селективную противовирусную активность (индекс селективности >32) в отношении штамма вируса простого герпеса типа 1, а также в отношении штамма, устойчивого к ацикловиру, цидофовиру и фоскарнету. Поэтому мы решили синтезировать 3-дезоксирибозиды замещенного бензимидазола и проверить, обладают ли такие соединения антивирусной активностью.



Соед.	22, 30	23, 31	24, 32a	32b	25, 33a	33b	26, 34	27, 35	28, 36a	36b	29, 37
R ₁	H	H	F	H	F	H	F	H	H	H	H
R ₂	H	F	H	F	F	F	OMe	H	F	OMe	F
R ₃	H	F	F	H	F	F	F	H	OMe	F	F
R ₄	H	H	H	F	H	F	H	H	H	H	H
R ₅	H	H	H	H	H	H	H	NH ₂	NH ₂	NH ₂	NH ₂

Рисунок 13 – Общая схема синтеза 3'-дезоксирибозидов бензимидазола и его производных.

На первом этапе изучали субстратно-специфические свойства PNP по отношению к бензимидазолу **22**, выбранного в качестве основания сравнения, и замещенным основаниям **23** – **29**. В качестве донора углеводного остатка был выбран 3'-дезоксиинозин **5**. Субстратную специфичность PNP тестировали в условиях 3-кратного избытка основания бензимидазола к 3'-dIno.

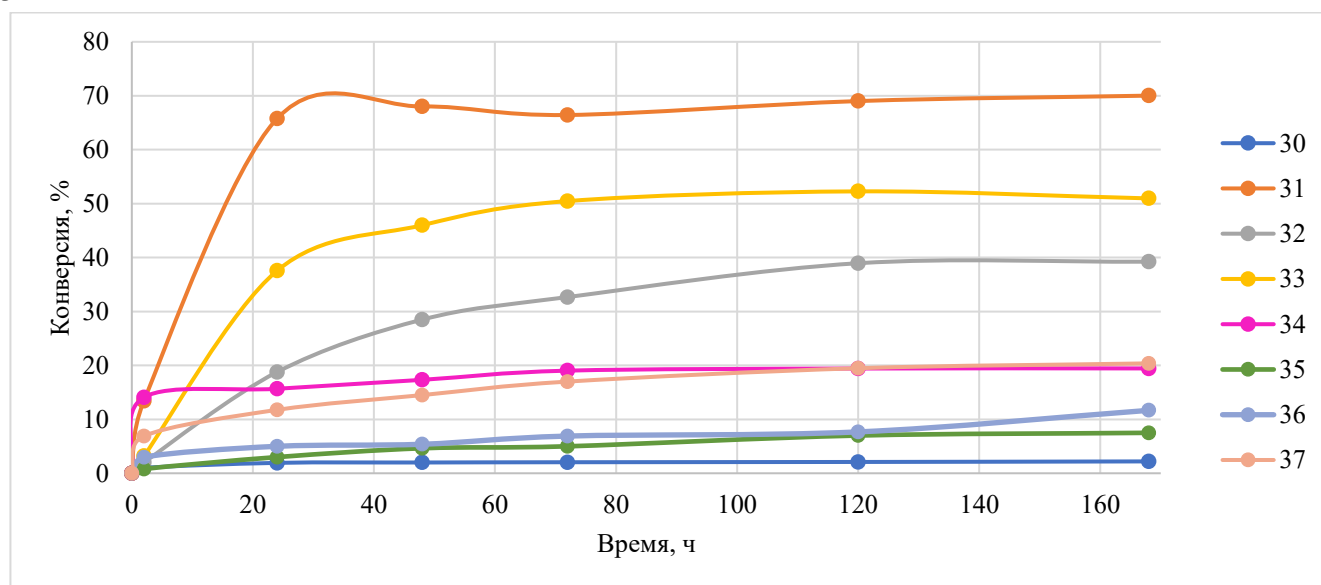
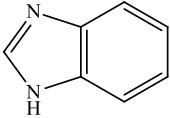
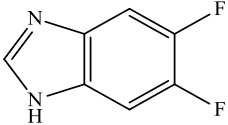
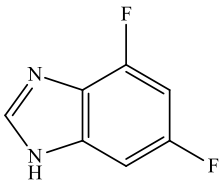
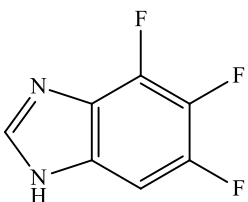
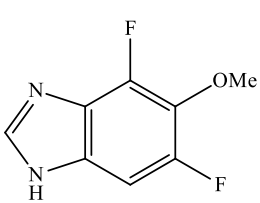
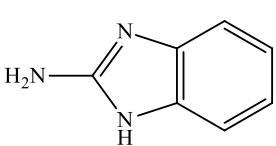
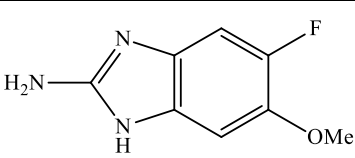
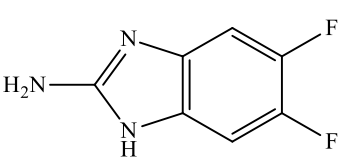


Рисунок 14 – Конверсия **5** в нуклеозиды **30** – **37**. Условия: соотношение оснований **22** – **29** к **5** – 3:1 (по молям); 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), концентрация PNP - 7 е.а./мл.

По результатам, представленным на Рисунке 14, можно сказать, что конверсия оснований в нуклеозиды **30**, **34** - **37** невысока в таких условиях, что требовало дальнейшей оптимизации синтеза. В то же время значения конверсии оснований **23** и **25** в нуклеозиды **31** и **33** соответственно, свидетельствуют, что они являются хорошими субстратами для PNP. На следующем этапе проводили подбор оптимального соотношения субстратов и концентрации PNP. Результаты экспериментов представлены в Таблице 3.

Таблица 3 - Оптимизированные условия пробных ферментативных реакций.

Нуклеозид (основание)	Структура основания	Соотношение основание:3'-dIno (по молям)	PNP (е.а./мл)	Конверсия, % за 168 ч
30 (22)		9:1	21	78
31 (23)		9:1	7	80
32 (24)		1:5	7	81
33 (25)		9:1	7	68
34 (26)		1:7	7	72
35 (27)		9:1	21	7
36 (28)		9:1	10.5	28
37 (29)		9:1	21	61

По данным, представленным в Таблице 3, видно, что в случае нуклеозидов **35** и **36** не удалось добиться высокого значения конверсии. Предположили, что одной из причин низкой конверсии может быть недостаточная растворимость оснований замещенного бензимидазола в водных растворах. Для улучшения растворимости оснований в реакционные смеси решили добавить 5% ДМСО (Рисунок 15).

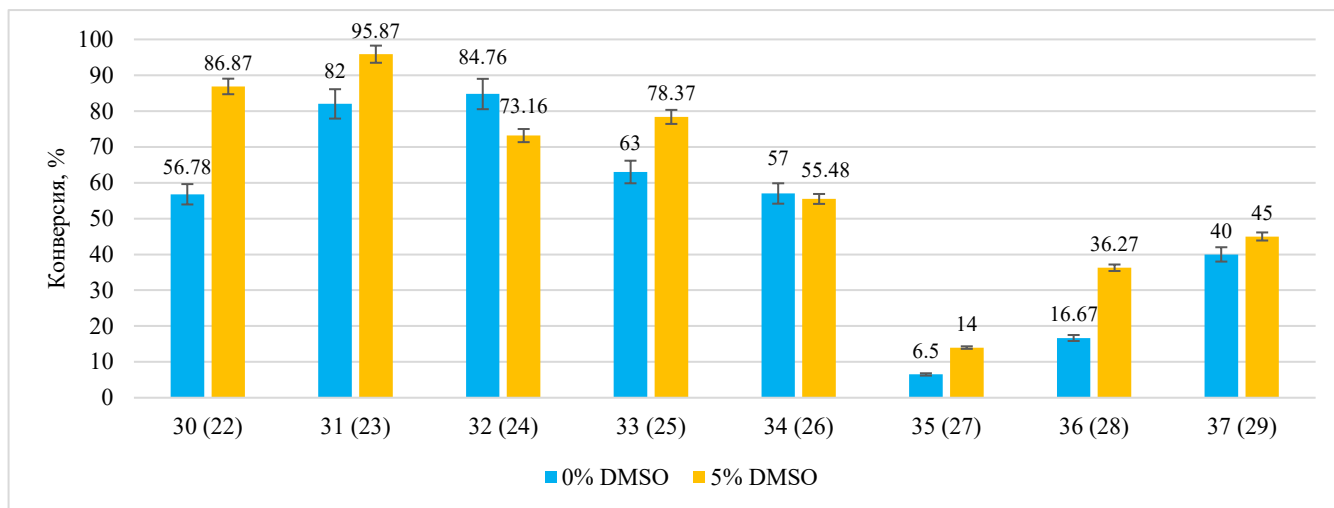


Рисунок 15 – Влияние 5% ДМСО на конверсию исходных субстратов в нуклеозиды **30 - 37**.

Условия: объем реакции 1 мл, соотношения оснований **22 – 29** к 3'-dIno, концентрация PNP - указаны в Таблице 2, 50 °С, 2 - 10 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), 168 ч.

Из данных, приведенных на диаграмме (Рисунок 15), видно, что добавление 5% ДМСО в реакционные смеси с основаниями **22, 23, 25, 28, 29** привело к увеличению конверсии, с 2-аминобензимидазолом **27** - к незначительному изменению значения конверсии (с 6.5% до 14%), а с основанием **24** - к уменьшению конверсии. Следует отметить, что увеличение конверсии характерно только для тех реакций, в которых основание было взято в избытке. Очевидно, что при улучшении растворимости оснований **22, 23, 25, 28, 29** в присутствии ДМСО возрастает их молярное содержание в реакционной смеси, что благоприятно влияет на образование продуктов реакции. Обратный эффект наблюдается в случае реакций с основаниями **24, 26**, где в избытке был взят 3'-dIno.

После оптимизации условий реакций трансгликозилирования были синтезированы нуклеозиды **30 – 34, 37** (экспериментальные данные приведены в Таблице 4).

Таблица 4 - Экспериментальные данные синтеза нуклеозидов **30 – 34, 37**.

Соед.	Основание, №, мг (ммоль)	3'-dIno, мг (ммоль)	Соотношение акцептор-донор углеводного остатка (по молям)	PNP, е.а.	Калий-фосфатный буфер (pH 7.0), объем, мл	Время, дни	Соотношение изомеров (по данным ВЭЖХ), %		Конверсия/выход, % (мг)
							N-1	N-3	
30	22 – 271 (2.29)	64 (0.25)	9:1	4200	10 мМ, 200	20	-	-	54/27 (16)
31	23 – 182.58 (1.18)	100 (0.39)	3:1	1400	10 мМ, 100	40	-	-	93/32 (33.2)
32	24 – 25 (0.16)	205 (0.81)	1:5	1400	6 мМ, 200	40	54	46	73/46 (7)
33	25 – 110 (0.64)	32.37 (0.13)	5:1	1400	10 мМ, 100	40	73	27	79/46 (17)
34	26 – 23 (0.12)	215 (0.85)	1:7	2100	6 мМ, 100	2	-	-	87/58 (20)
37	29 - 601 (3.5)	100 (0.4)	9:1	3500	9 мМ, 200	40	-	-	62/8 (8.5)

Нуклеозиды замещенного бензимидазола **30** – **34**, **37** выделены из реакционных смесей обращенно-фазовой хроматографией с чистотой в диапазоне 90-99% (по данным ВЭЖХ) и охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC и HMBC [^1H - ^{13}C] и [^1H - ^{15}N]). В случае асимметрично замещенных производных бензимидазола **24** и **25** образуются N1- и N3-нуклеозиды **32a**, **32b**, **33a**, **33b** (Рисунок 16).

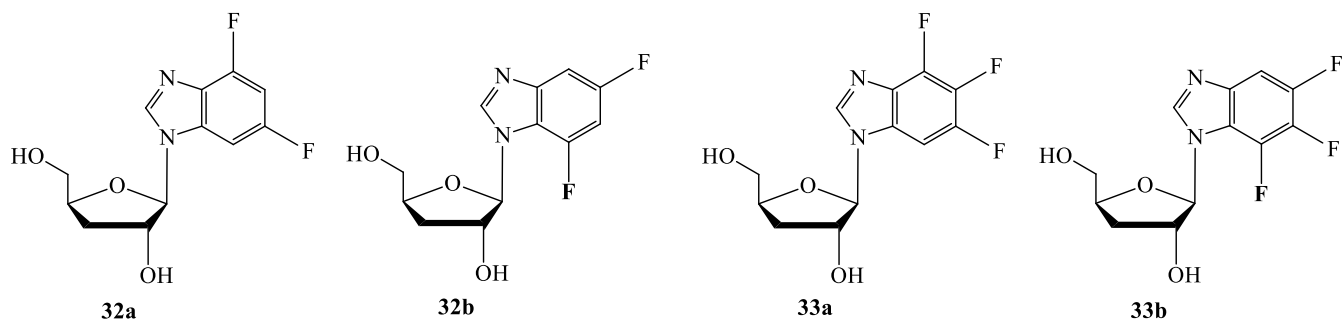


Рисунок 16 – Структуры N1- и N3-нуклеозидов **32a**, **32b**, **33a**, **33b**.

Известно, что 2-аминобензимидазол хорошо работает как субстрат PNP в реакциях получения рибозидов и 2'-дезоксирибозидов. Однако сочетание 2-аминобензимидазол - 3'-дезоксиинозин является плохой комбинацией для PNP - добиться высокой конверсии не удалось. Поэтому получение нуклеозида **35** ферментативным способом было нецелесообразно ввиду низкой конверсии. Соединение **36** также не удалось получить и выделить в количестве, достаточном для анализа структуры методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии, из-за необратимой сорбции соединения на обращенно-фазовом сорбенте.

2.2 Исследование противовирусной активности 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола *in vitro*

Для того, чтобы оценить влияние химических модификаций бензимидазола на профили противогерпесвирусной активности и цитотоксичности, синтезированные соединения и соответствующие основания были протестированы *in vitro* с использованием эталонного штамма HSV-1/L₂, включая вариант вируса, резистентный к ацикловиру HSV-1/L₂/R^{ACV} (IC₅₀ > 100 мкг/мл или >444,05 мкМ).

Из данных, приведенных на диаграммах (Рисунки 16-19) и Таблице 5, видно, что соединение **22** и его 3'-дезоксирибозид **30** мало токсичны для культуры клеток Vero E6, а минимальную противовирусную активность (IC₅₀) эти соединения проявляли в диапазоне нецитотоксических концентраций.

Таблица 5 – Результаты оценки противовирусной активности *in vitro* соединений **22** – **34**, **37** в отношении HSV-1.

Соединение	МПК ^a , мкМ	CD ₅₀ ^b , мкМ	HSV-1/L ₂			HSV-1/ L ₂ /R ^{ACV}		
			IC ₅₀ ^c	IC ₉₅	ХТИ ^d	IC ₅₀ ^c	IC ₉₅	ХТИ ^d
			м.и. 0.01, БОЕ/кл ^f					
Рибавирин (контроль)	4095.00	Н.и.	511.88	2047.0	>8	511.88	2047.0	>8
22	4235.49	6313.85±167.47	1058.87	4235.49	5.96	1058.87	4235.49	5.96
30	2505.13	>5019.25	626.28	2505.13	>8	1252.56	5019.25	>4
23	1623.06	2433.81±37.72	202.88	1623.06	12.32	405.77	1623.06	6.16
31	1970.86	2901.81±60.28	246.36	985.43	12	1478.15	≥1970.86	2

24	811.53	2489.32±92.46	811.53	1623.06	3.07	811.53	1623.06	3.07
32a	1003.68	>2007.37	250.92	1003.68	>8	<2007.37	2007.37	>1
25	1453.32	2179.98±27.03	363.33	1453.32	6.00	363.33	1453.32	6.00
33a	1999.65	≥3999.31	249.96	999.83	16	493.91	1999.65	8
26	1358.40	2909.48±123.18	1018.80	2716.80	2.86	1358.40	2716.80	2.14
34	1665.22	>3330.45	3000	3330.45	>3	3000	3330.45	>2
27	939.43	1422.89±18.04	469.71	939.43	3.03	704.57	939.43	2.02
28	1380.68	2165.79±33.74	172.59	690.34	12.55	172.59	690.34	12.55
29	739.43	1659.39±60.16	369.71	739.43	4.49	369.71	739.43	4.49
37	1991.35	3315.58±141.99	995.68	>1991.35	3	995.68	>1991.35	3

Приведены результаты трех независимых опытов. Количество окрашенных клеток в контроле – 4.95±0.07.

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

^b CD₅₀ - концентрация соединения, вызывающая гибель 50 % клеток;

^c IC₅₀ и IC₉₅ - концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта на 50% и 95%;

^d ХТИ – химиотерапевтический индекс - отношение CD₅₀ к IC₅₀;

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

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

«Н.и.» - Не исследовано

Модификации основания **22** и, соответственно, его 3'-дезоксирибозиды **30** привели к увеличению цитотоксичности. Тем не менее, 3'-дезоксирибозиды были менее токсичны, чем соответствующие им производные бензимидазола (пары **25/33a**, **26/34**, **29/37**), или показатели цитотоксичности (IC₅₀) были сопоставимы (пары **23/31**, **24/32a**).

Замена атома водорода на атом фтора в положениях С4 и С5 бензимидазольного цикла (соединения **24/32a**) или С5 и С6 (соединения **23/31**) приводила к увеличению цитотоксичности, тогда как параметры противовирусной активности (IC₅₀/IC₉₅) не изменялись существенно по сравнению с парой соединений **22/30**. Трифторзамещенный аналог бензимидазола **25** также характеризовался более высокой токсичностью для культуры клеток, но величины IC₅₀/IC₉₅ были в той же степени снижены. Таким образом, величины ХТИ, характеризующие селективность противовирусного действия оснований **25** и **22** были равны. Однако 3'-дезоксирибозид основания **25** (N1-региоизомер **33a**) оказался не только менее цитотоксичным, но и более активным противовирусным агентом. Соответственно величина ХТИ соединения **33a** оказалась выше и составила 16. По показателю ХТИ соединение **33a** превзошло все исследованные соединения. Замена атома фтора на оксиметильную группу в положении С5 гетероциклического основания соединений **26/34** привела к значительному снижению противовирусной активности соединений по сравнению с парой **25/33a**, что отразилось на величине показателя ХТИ.

Соединения, содержащие в положении С2 аминогруппу (**27**, **28**, **29**, **37**), были более токсичными для культуры клеток, но ингибировали развитие индуцированного вирусом цитопатического эффекта в более низких концентрациях, чем соединения **22** и **30**. Тем не менее, показатель ХТИ, характеризующий селективность их противогерпетического действия, был сопоставим с ХТИ соединений **22** и **30**. Исключением является основание **28** с ХТИ = 12.55. Вероятно, замена фтора на оксиметильную группу в положении С6 способствует не только снижению цитотоксичности, но и повышению противовирусной активности (пара **28/36**). К сожалению, противовирусная активность нуклеозида **36** (3'-дезоксирибозид основания **28**) не была проверена до настоящего времени из-за его отсутствия. Можно ожидать,

что химиотерапевтические характеристики 3'-дезоксирибозида будут более благоприятными, чем у основания **28**.

Интересно, что противовирусная активность как производных бензимидазола, так и соответствующих им 3'-дезоксирибозидов сохранялась против штамма вируса, резистентного к действию ацикловира, охарактеризованного нами ранее как ТК-негативный. Видимо рассматриваемая группа соединений из-за значительной разницы структуры основания бензимидазола и структуры триазолкарбоксамида имеет иной механизм активации (синтез нуклеотидов), не опосредованный действием вирусной тимидинкиназы.

Полученные нами результаты позволяют прогнозировать структуры потенциально более эффективных анти-ВПГ агентов. Выраженную активность в отношении вируса простого герпеса 1-го типа проявил 4,6-дифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)-бензимидазола (ХТИ 12), 4,5,6-трифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)-бензимидазола (ХТИ 16), а также основания бензимидазола - 4,6-дифтор-бензимидазол (ХТИ 12.32), 2-амино-5-фтор-6-О-метокси-бензимидазол (ХТИ 12.55).

Заключение

- Осуществлен и оптимизирован 4-стадийный химический синтез 3'-дезоксиинозина (выход 63%), источника 3-дезоксирибозы для реакции трансгликозилирования;
- установлен вероятный механизм образования примесного циклонуклеозида в синтезе 3'-дезоксиинозина;
- предложен и осуществлен новый химический способ получения 2-фторкордицепина (выход 34%), наиболее эффективный среди известных дивергентных методов;
- оптимизированы параметры ферментативных реакций (температура, pH, соотношение исходных компонентов, концентрация PNP, количество DMSO) для получения 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина и бензимидазола;
- получен ряд 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина с выходами 40-78%;
- получен ряд 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола с выходами 8-58%;
- проведена оценка противоопухолевой активности 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина *in vitro* на линиях опухолевых клеток человека - Jurkat, Raji, MCF-7, TNP-1, U937, SKOV3, A549, LS174T, а также на линии клеток фибробластов человека WI-26: 2-фторкордицепин проявил наилучшую цитотоксическую активность на всех исследуемых клеточных линиях за исключением SCOV3;
- проведена оценка противовирусной активности 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола и соответствующих оснований *in vitro* в отношении штаммов HSV-1 и HSV-1/L₂/R^{ACV}: выраженную активность проявили 4,6-дифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)-бензимидазола (ХТИ 12), 4,5,6-трифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)-бензимидазола (ХТИ 16), а также основания бензимидазола - 4,6-дифтор-бензимидазол (ХТИ 12.32), 2-амино-5-фтор-6-О-метокси-бензимидазол (ХТИ 12.55);
- проведена сравнительная оценка противовирусной активности полученных нами 3'-дезоксирибозидов и полученных ранее рибозидов, 2'-дезоксирибозидов, 2'-дезоксидеокси-2'-

фторарабинозидов с использованием эталонного штамма HSV-1/L₂: в большинстве случаев IC₅₀ выше у синтезированных нуклеозидов, чем у соответствующих оснований.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Denisova A.O.**, Tokunova Y.A., Fateev I.V., Breslav A.A., Leonov V.N., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Muzyka I.S., Esipov R.S., Kayushin A.L., Konstantinova I.D., Miroshnikov A.I., Stepchenko V.A., Mikhailopulo I.A. The Chemoenzymatic Synthesis of 2-Chloro- and 2-Fluorocordycepsins // *Synthesis*, 2017, V. 49. doi: 10.1055/s-0036-1590804.
2. Kharitonova M.I., **Denisova A.O.**, Andronova V.L., Kayushin A.L., Konstantinova I.D., Kotovskaya S.K., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. New modified 2-aminobenzimidazole nucleosides: Synthesis and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1. // *Bioorg. Med. Chem. Let.* 2017. V. 27 (11). P. 2484-2487. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.100.
3. A.L. Kayushin, J.A. Tokunova, I.V. Fateev, **A.O. Arnautova**, M.Ya. Berzina, A.S. Paramonov, O.I. Lutonina, E.V. Dorofeeva, K.V. Antonov, R.S. Esipov, O.S. Zhukova, M.V. Kiselevskiy, L.V. Fetisova, I.A. Mikhailopulo, A.I. Miroshnikov, I.D. Konstantinova. Radical Dehalogenation and Purine Nucleoside Phosphorylase *E. coli*: How Does an Admixture of 2',3'-Anhydroinosine Hinder 2-Fluoro-Cordycepin Synthesis // *Biomolecules* 2021, 11(4), 539. doi: 10.3390/biom11040539.
4. **A. O. Arnautova**, K. V. Antonov, E. A. Zorina, M. A. Simonova, A. S. Paramonov, O. C. Zhukova, M. V. Kiselevski, A. L. Kayushin, I. V. Fateev, E. V. Dorofeeva, B. Z. Eletskaia, M. Ya. Berzina, O. S. Smirnova, T. V. Egorova, R. S. Esipov, A. I. Miroshnikov, I. D. Konstantinova. 2-Fluorocordycepin: chemoenzymatic synthesis and study of anticancer activities *in vitro*. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2025, vol. 51, no. 3. doi: 10.1134/S1068162025601144.
5. **Aleksandra O. Arnautova**, Irina A. Aleksakhina, Ekaterina A. Zorina, Maria Ya. Berzina, Ilya V. Fateev, Barbara Z. Eletskaia, Konstantin V. Antonov, Olga S. Smirnova, Alexander S. Paramonov, Alexei L. Kayushin, Valeria L. Andronova, Georgii A. Galegov, Svetlana K. Kotovskaya, Valery N. Charushin, Roman S. Esipov, Anatoly I. Miroshnikov, Irina D. Konstantinova. New benzimidazole 3'-deoxynucleosides: synthesis and anti-herpes virus properties. // *Biomolecules*. 2025, 15, 922. doi: 10.3390/biom15070922.

Тезисы международных и всероссийских конференций:

1. Irina D. Konstantinova, **Alexandra O. Mekhovikh**, Ilja V. Fateev, Alexandra A. Breslav, Alexey L. Kayushin, Anatoly I. Miroshnikov, Vladimir A. Stepchenko and Igor A. Mikhailopulo. Chemoenzymatic synthesis of 2-Chloro- and 2-Fluorocordycepsins. // XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acid, Poznan, 2014.
2. **Меховых А.О.** Химико-ферментативный синтез кордицепина и его структурных аналогов. // Материалы XXVI Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2014.
3. О. С. Жукова, М. В. Киселевский, Л. В. Фетисова, Б. З. Елецкая, **А. О. Денисова**, М. Я. Берзина, А. Л. Каюшин, И. Д. Константинова. Цитотоксическая активность

пуриновых нуклеозидов, модифицированных хиральными аминокислотами. // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т. 14. № 1. С. 82.

4. **Alexandra Arnautova**, Konstantin Antonov, Irina Konstantinova, Alexey Kayushin. New method of chemoenzymatic synthesis of 2-fluorocordycepin // XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acid. 2022. Stockholm.
5. Зорина Е.А., Каюшин А.Л., **Арнаутова А.О.**, Константинова И.Д. Химический синтез 3'-дезоксирибозидов 2-аминобензимидазола // Материалы XXXV Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2023.
6. Алексахина И.А., Каюшин А.Л., **Арнаутова А.О.** Синтез и изучение новых модифицированных нуклеозидов // Материалы XXXV Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2023.
7. **Alexandra O. Arnautova**, Alexey L. Kayushin, Konstantin V. Antonov, Irina D. Konstantinova. SYNTHESIS OF 2-FLUOROCORDYCEPINE // International Scientific Conference Actual Problems of the Chemistry of Natural Compounds. 2023. Tashkent.
8. I.A. Aleksakhina, A.L. Kayushin, **A.O. Arnautova**. SYNTHESIS OF NEW BENZIMIDAZOLE NUCLEOSIDES // International Scientific Conference Actual Problems of the Chemistry of Natural Compounds. 2023. Tashkent.
9. Zorina E.A., Kayushin A.L., **Arnautova A.O.**, Konstantinova I.D. CHEMICAL SYNTHESIS OF 2-AMINOBENZIMIDAZOLE 3'-DEOXYRIBOSIDE // International Scientific Conference Actual Problems of the Chemistry of Natural Compounds. 2023. Tashkent.
10. **A. O. Arnautova**, I. A. Aleksakhina, A. L. Kayushin, I. D. Konstantinova. NEW BENZIMIDAZOLE NUCLEOSIDES // X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов — 2023: Сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2023 — 814 с.
11. **Aleksandra O. Arnautova**, Irina A. Aleksakhina, Alexey L. Kayushin, Irina D. Konstantinova. New Benzimidazole 3'-Deoxynucleosides. 15th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. 2023. Antalya, Turkey.
12. Зорина Е.А., Ефимова А.А., **Арнаутова А.О.**, Каюшин А.Л., Константинова И.Д. СРАВНЕНИЕ СУБСТРАТНО-СПЕЦИФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ В ФЕРМЕНТАТИВНОМ СИНТЕЗЕ 3'-ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДОВ // 6-я Российская конференция по медицинской химии Приурочена к празднованию 300-летия Российской академии Наук, 2024.
13. **Alexandra O. Arnautova**, Alexey L. Kayushin, Irina D. Konstantinova. 3'-DEOXYRIBOSIDES OF SUBSTITUTED ADENINE AND BENZIMIDAZOLE ANALOGS: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES // The 8th International Conference on Chemistry, Structure and Function of Biomolecules. Minsk, 1-5 October 2024, Book of Abstracts, p. 62.
14. Zorina Ekaterina, Efimova Alexandra, **Arnautova Alexandra**, Kayushin Alexey, Konstantinova Irina. COMPARISON OF 3-DEOXYRIBOSE RESIDUE DONORS IN THE

ENZYMATIC SYNTHESIS OF MODIFIED 3'-DEOXYRIBONUCLEOSIDES // The 8th International Conference on Chemistry, Structure and Function of Biomolecules. Minsk, 1-5 October 2024, Book of Abstracts, p. 62.

15. **Арнаутова А.О.**, Берзина М.Я., Елецкая Б.З., Симонова М.А., Стельмах К.Д., Миронов А.Ф., Константинова И.Д. Применение рекомбинантной пуриинуклеозидфосфорилазы *E. coli* в создании новых модифицированных нуклеозидов как потенциальных противоопухолевых препаратов. Всероссийская конференция с международным участием «Биохимия человека», Москва 17-19 октября 2024 г., с. 203.

Глава в книге:

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