

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)**

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Константинова И.Д.

Москва, 2025 г

Оглавление

Введение	4
1 Обзор литературы.....	9
1.1 Биологическая активность 3'-дезоксинуклеозидов	9
1.1.1 Противовирусная активность 3'-дезоксинуклеозидов	9
1.1.2 Противоопухолевая активность 3'-дезоксинуклеозидов	12
1.2 Биологическая активность кордицепина.....	13
1.2.1 Противовирусная активность кордицепина	15
1.2.2 Противоопухолевая активность кордицепина	16
1.3 Аналоги кордицепина	22
1.3.1 N6-производные кордицепина.....	22
1.3.2 C2-замещенные аналоги кордицепина	24
1.4 Способы получения кордицепина и его аналогов	25
1.4.1 Химический синтез кордицепина.....	25
1.4.2 Химический синтез аналогов кордицепина	27
1.4.3 Химико-ферментативный синтез	28
1.5 Биологическая активность нуклеозидов замещенного бензимидазола	30
1.5.1 Противовирусная активность нуклеозидов замещенного бензимидазола.....	32
1.5.2 Противоопухолевая активность нуклеозидов бензимидазола	36
1.6 Способы получения нуклеозидов бензимидазола	38
1.6.1 Химические способы синтеза нуклеозидов бензимидазола	38
1.6.2 Ферментативный синтез нуклеозидов бензимидазола.....	41
1.6.3 Ферментативный синтез нуклеозидов бензимидазола с использованием NDTs	41
1.6.4 Ферментативный синтез нуклеозидов бензимидазола с использованием NPs	43
2 Обсуждение результатов	46
2.1 Синтез 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина.....	46
2.1.1 Синтез 3'-дезоксиинозина	46

2.1.2	Синтез 2-фторкордицепина с использованием 3'-дезоксидезоксинозина.....	48
2.1.3	Изучение механизма образования примесного нуклеотида	50
2.1.4	Синтез 2-фторкордицепина с использованием фосфата 3-дезоксидезоксирибозы....	59
2.1.5	Химический синтез 2-фторкордицепина.....	62
2.1.6	Ферментативный синтез 2-хлоркордицепина	63
2.1.7	Синтез 2-хлор-6-N-замещенных аналогов кордицепина	66
2.1.8	Синтез 6-O-метокси-3'-дезоксидезоксигуанозина	69
2.1.9	Синтез 2-амино-6-хлор-9-(3'-дезоксидезоксирибофуранозил)пурина.....	73
2.2	Синтез 3'-дезоксидезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола.....	75
2.3	Исследование биологических свойств 3'-дезоксидезоксирибозидов замещенных аналогов аденина и бензимидазола	83
2.3.1	Исследование цитотоксической активности 3'-дезоксидезоксирибозидов производных аденина на опухолевых клетках человека <i>in vitro</i>	83
2.3.2	Исследование противовирусной активности 3'-дезоксидезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола <i>in vitro</i>	86
2.3.3	Сравнение противовирусной активности нуклеотидов замещенных бензимидазолов	90
3	Материалы и методы	93
3.1	Синтез соединений	94
3.2	Биологические эксперименты	113
3.2.1	Оценка противоопухолевой активности.....	113
3.2.2	Оценка противовирусной активности	115
4	Заключение	117
	Список сокращений.....	118
	Список использованной литературы	120

Введение

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), 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, 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.

Способы химического синтеза модифицированных нуклеозидов остаются в современной практике наиболее востребованными в силу бесконечности вариантов модификации структуры нуклеозида. Однако в последние годы в синтезе новых нуклеозидов все чаще используется биокатализ. Такой подход, несмотря на ограниченность субстратной специфичности ферментов, обладает преимуществами перед химическими способами: не нужно вводить защитные группы в синтоны при гликозилировании, что сокращает число синтетических стадий и облегчает выделение продуктов.

В ферментативном синтезе все чаще используются бактериальные нуклеозидфосфорилазы. Такой способ получения аналогов нуклеозидов является более простым, регио- и стереоспецифичным, не требует введения защитных групп и отвечает принципам «зеленой химии».

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

Работа выполнена в Лаборатории биосинтеза низкомолекулярных физиологически активных соединений ГНЦ ИБХ РАН при участии сотрудников Института диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н.

Блохина, Института вирусологии им. Д.И. Ивановского и Московского педагогического государственного университета.

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. Научная новизна исследования заключается в использовании нуклеозидфосфорилаз для получения новых нуклеозидов замещенных аденинов и бензимидазолов с остатком 3-дезоксирибозы.

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 пурииннуклеозидфосфорилазы 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 настоящей диссертации приводятся экспериментальные данные, получены лично автором. 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.

Автор участвовал в подготовке к публикации статей и тезисов докладов на научных конференциях.

По теме диссертации опубликованы следующие статьи:

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. Eletskaya, 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. **A.O. Arnautova**, Irina A. Aleksakhina, Ekaterina A. Zorina, Maria Ya. Berzina, Ilya V. Fateev, Barbara Z. Eletskaya, 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.

Результаты работы доложены на 11 международных и всероссийских конференциях:

- Irina D. Konstantinova, **A. O. Mekhovykh**, 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-Fluorocordicepins. // XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acid, Poznan, 2014.
- **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.
- 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.
- **Arnautova A.**, Antonov K., Konstantinova I., Kayushin A. New method of chemoenzymatic synthesis of 2-fluorocordycepin // XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acid. 2022. Stockholm
- Зорина Е.А., Каюшин А.Л., **Арнаутова А.О.**, Константинова И.Д. Химический синтез 3'-дезоксирибозиды 2-аминобензимидазола // Материалы XXXV Зимней молодежной

научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2023.

- 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.
- **A.O. Arnautova**, A.L. Kayushin, K.V. Antonov, I.D. Konstantinova. SYNTHESIS OF 2-FLUOROCORDYCEPINE // International Scientific Conference Actual Problems of the Chemistry of Natural Compounds. 2023. Tashkent.
- 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.
- 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.
- **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.
- **A.O. Arnautova**, I.A. Aleksakhina, A.L. Kayushin, I.D. Konstantinova. New Benzimidazole 3'-Deoxynucleosides. 15th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. 2023. Antalya, Turkey.
- 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.
- **A.O. Arnautova**, A.L. Kayushin, I.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.
- 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.

- **Арнаутова А.О.**, Берзина М.Я., Елецкая Б.З., Симонова М.А., Стельмах К.Д., Миронов А.Ф., Константинова И.Д. Применение рекомбинантной пуриноклеозидфосфорилазы *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.

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

1 Обзор литературы

1.1 Биологическая активность 3'-дезоксинуклеозидов

Замена рибозы на дезоксирибозу или введение атомов галогенов, азидо- или ацильных групп в 3'-положение приводит к появлению или к усилению противовирусной и противоопухолевой активности. Такие структурные изменения нуклеозидов могут повлиять на:

- проникновение в клетки и накопление в тканях-мишенях;
- устойчивость к действию ферментов;
- сродство к клеточным транспортерам и ферментам-активаторам;
- селективность в отношении вирусных или опухолевых клеток.

1.1.1 Противовирусная активность 3'-дезоксинуклеозидов

Среди одобренных противовирусных препаратов на основе 3-дезоксирибозы – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ (НИОТ). Первым препаратом, одобренным для лечения ВИЧ, стал зидовудин (Рисунок 1), в 1987 году он был разрешен для клинического применения [1, 2].

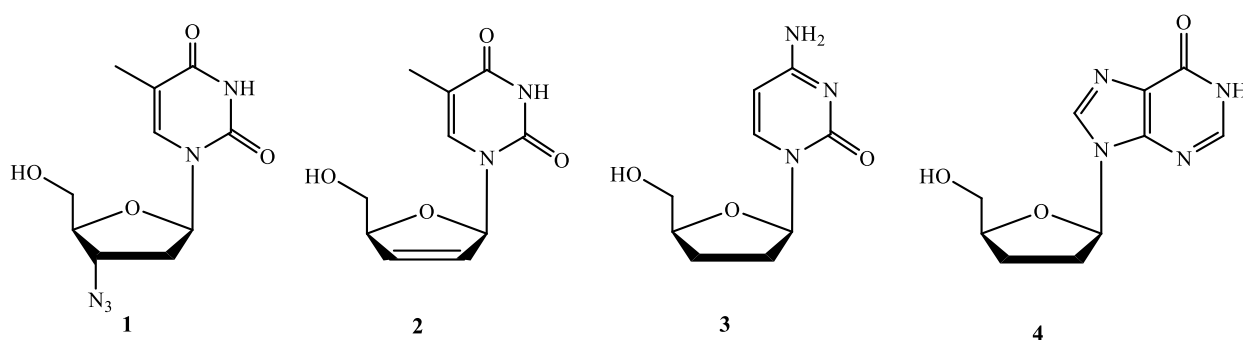


Рисунок 1 – Структуры препаратов группы НИОТ – зидовудина (1), ставудина (2), залцитабина (3), диданозина (4).

Впоследствии были одобрены для лечения ВИЧ и вируса гепатита В (HBV) ставудин [3-5], залцитабин, диданозин [6] (Рисунок 1) и другие.

Соединения группы НИОТ имеют схожий механизм действия. После попадания ингибиторов в клетку происходит их фосфорилирование до 5'-трифосфатов клеточными киназами. Затем НИОТ действуют как терминаторы обратной транскрипции по двум механизмам: ингибирование обратной транскриптазы вируса и встраивание в растущую цепь ДНК вместо природного нуклеозида, что приводит к обрыву цепи. (Рисунок 2) [7].

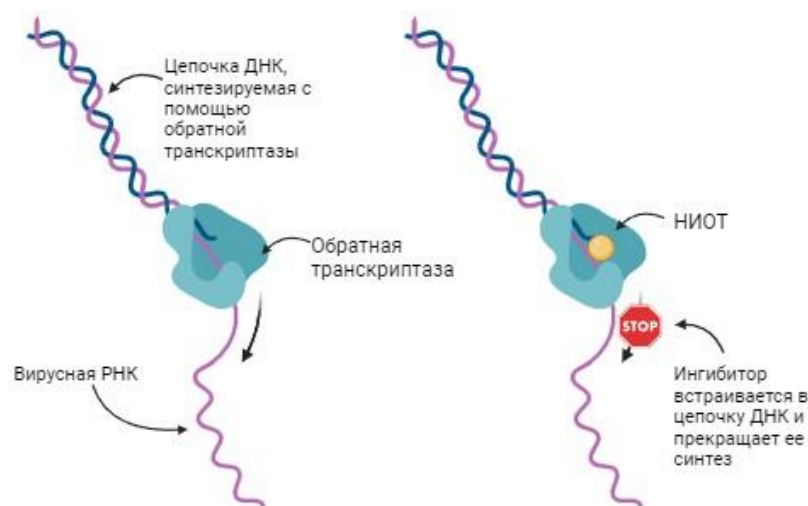


Рисунок 2 – Механизм действия НИОТ.

В работе Де Клерка [8] была проведена оценка активности туберцидина, формицина и их 3'-дезоксипроизводных (структуры показаны на Рисунке 3) в отношении ряда вирусов: простого герпеса типа 1 (HSV-1), простого герпеса типа 2 (HSV-2), коревой оспы (VV), везикулярного стоматита (VSV), полиомиелита (тип 1), вируса Коксаки (тип В-4), парагриппа (тип 3), вируса Синдбиса и кори.

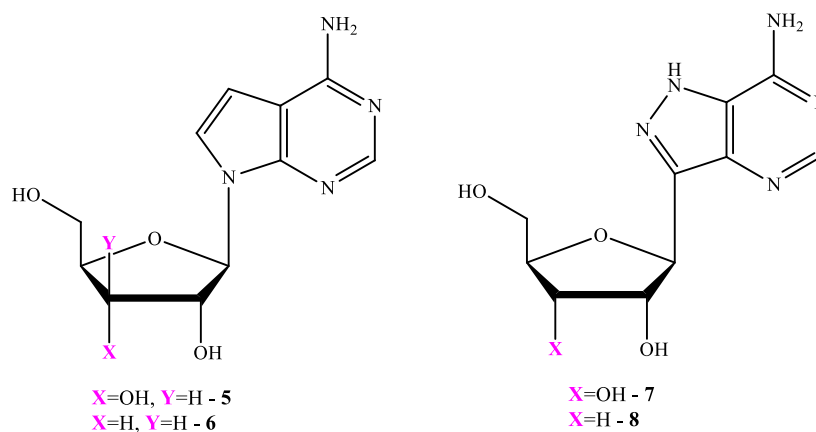


Рисунок 3 — Структуры туберцидина (5), 3'-дезокситуберцидина (6), формицина (7) и 3'-дезоксиформицина (8).

Туберцидин **5** является эффективным, но неспецифическим противовирусным агентом, он ингибирует рост многих ДНК- и РНК-содержащих вирусов, но только при концентрации чуть ниже уровня цитотоксичности [9]. Замена рибозы в структуре туберцидина на 3-дезоксирибозу привела к значительному уменьшению цитотоксичности: минимальная токсическая доза 3'-дезокситуберцидина **6** - 40 мкг/мл.

В работе [10] оценивали противовирусную активность формицина **7** и его производных в отношении таких вирусов, как VV, HSV и VSV в первичных клетках почек кролика. В результате экспериментов формицин **7** проявил низкую ингибирующую активность, а 3'-дезоксиформицин **8** оказался неактивным.

Показано, что 3'-дезоксиз-3'-фтортимидин **9** (Рисунок 4) обладает высокой активностью в отношении ВИЧ (модель с использованием клеточной линии МТ-4) [11]. Было установлено, что соединение **9** является более эффективным ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ, чем зидовудин **1** (эффективная доза $EC_{50} = 0.001$ и 0.003 мкМ, цитотоксическая доза $CD_{50} = 0.197$ и 4.8 мкМ соответственно).

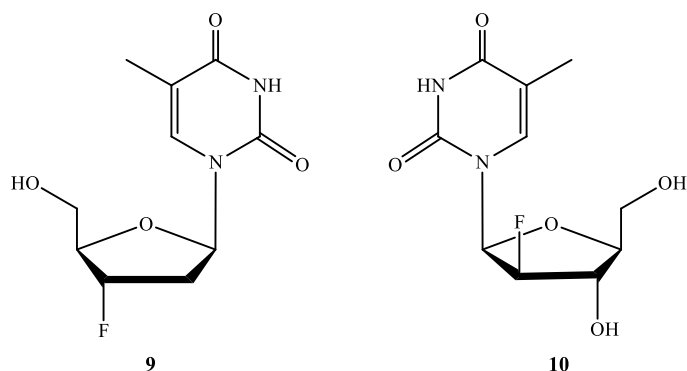


Рисунок 4 – Структуры 3'-дезоксиз-3'-фтортимидина **9** и клевудина **10**.

Клевудин **10** (Рисунок 4) (аналог тимидина) активен против вируса гепатита В и используется в клинической практике с 2006 г в Южной Корее [12]. Считается, что механизм его действия основан на ингибировании вирусной ДНК-полимеразы [13, 14].

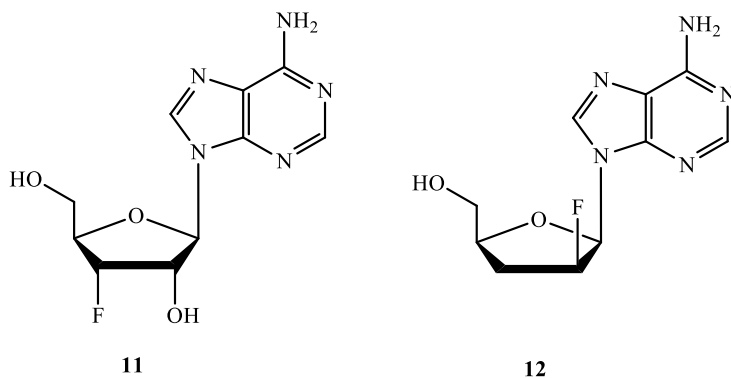


Рисунок 5 – Структуры 3'-дезоксиз-3'-фтораденозина **11** и 2',3'-дидезокси-2'-фторарабинозиладенина **12**.

Среди модифицированных пуриновых нуклеозидов 3'-дезоксиз-3'-фтораденозин (**11**, Рисунок 5) интересен спектром антивирусной активности: в интервале концентраций EC_{50} 1-7 мкг/мл он влияет на репродукцию РНК-вирусов полиомиелита, Коксаки и Синдбис [15].

Интервал активных концентраций ощутимо ниже его цитотоксичных доз ($CC_{50} > 40$ мкг/мл) (модель изучения антивирусной активности на клетках HeLA и Vero). В работе [16] показано, что 3'-дезоксигуанозин (**11**) в низких концентрациях действует на вирусы клещевого энцефалита, вируса Зика и вируса Западного Нила.

Соединение **11** проявило заметный цитостатический эффект, приводящий к подавлению пролиферации клеток при концентрациях 12.5 мкМ.

В исследованиях [17, 18] показано, что 2',3'-дидезокси-2'-фтор-арабинозиладенин (**12**) (Рисунок 5) в комбинации с другими препаратами группы НИОТ усиливает их противовирусное действие в отношении ВИЧ.

1.1.2 Противоопухолевая активность 3'-дезоксинуклеозидов

На четырех опухолевых клеточных линиях показано, что 3'-дезоксигуанозин **11** обладает высокой цитотоксической активностью (Таблица 1). Наилучший цитотоксический эффект соединение **11** проявило на клеточной линии МТ-4 ($IC_{50} = 0.22$ мкМ) [15].

Таблица 1 - Цитостатическая активность 3'-дезоксигуанозина **11**.

Клеточная линия	L1210 ¹	Raji ²	MOLT/4F ³	MT-4 ⁴
IC_{50} (μM)	1.6	3.9	28	0.22

Примечания: ¹лимфоцитарная лейкемия мышей; ²В-лимфобластный лейкоз человека; ³Т-лимфобластный лейкоз человека; ⁴Т-клеточный лейкоз человека.

Исследования [19] показали, что 2',3'-дидезокси-2'-фтор-арабинозиладенин **12** обладает цитостатической активностью против острого лимфобластного лейкоза. Как и другие нуклеозидные аналоги, соединение **12** оказывает противоопухолевое действие, вызывая апоптоз путем блокирования синтеза ДНК, а также через ингибирование репарации ДНК [20].

В статье [21] 3'-фторнебуларин (**13**) (Рисунок 6) был протестирован на клеточных линиях карциномы прямой кишки человека НСТ116 и остеосаркомы кости человека 143В.

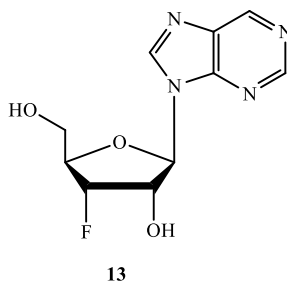


Рисунок 6 – 3'-фторнебуларин **13**.

3'-Фторнебуларин **13** показал мощное ингибирование роста опухолевых клеток при субмикромольных концентрациях с $IC_{50} = 0.5 - 1.0$ мкМ для клеток линии НСТ116 и $IC_{50} = 0.5 - 1.0$ мкМ для клеток линии 143В.

1.2 Биологическая активность кордицепина

Один из представителей семейства 3'-дезоксинуклеозидов - кордицепин (3'-дезоксияденозин) (**14**) - известный природный аналог аденозина (Рисунок 7). Он представляет огромный интерес в качестве лекарственного препарата ввиду его биологической активности и терапевтического потенциала. До появления синтетических антибиотиков кордицепин использовался в восточной медицине при воспалениях разной этиологии, при туберкулезе и в онкологии.

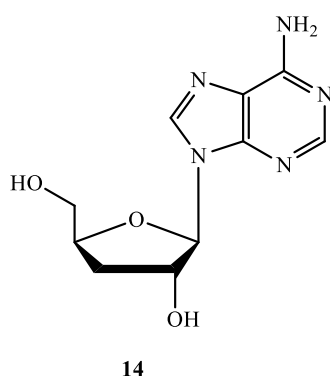


Рисунок 7 – 3'-Дезоксияденозин
(кордицепин).



Рисунок 8 – Плодовые тела гриба
Cordyceps, паразитирующего в теле
насекомого.

Впервые кордицепин был выделен в 1950 г. из тел энтомопатогенного гриба рода *Cordyceps militaris* [22], а позднее и из *Aspergillus nidulans*, паразитирующих в организме определенных видов насекомых и членистоногих. Плодовые тела гриба *Cordyceps* (Рисунок 8) издревле используются в Китайской медицине. С 1993 г производятся препараты и БАДы на основе биологически активных соединений, выделенных из экстракта *Cordyceps militaris* [23, 24].

Начиная с 1950-х годов и до настоящего времени, значительное количество исследований сосредоточено на изучении биологической активности кордицепина и механизма его действия [25-32]. Известно, что кордицепин обладает противовирусной, противоопухолевой, противовоспалительной, антидепрессивной, антиоксидантной, антибактериальной и другими активностями.

В 1950-е годы китайские исследователи показали, что кордицепин может подавлять рост различных видов патогенных бактерий, таких как *Streptococcus*, *Bacillus mallei*, *Bacillus*

anthracis, *Bacillus bipolaris septicus* и *Staphylococcus* [33]. Кордицепин, ошибочно распознаваемый клеточными ферментами как аденозин, встраивается в растущую цепь РНК и прерывает полиаденилирование мРНК, ингибируя рост патогенных микроорганизмов.

Позднее другие ученые сообщили о результатах тестирования кордицепина в качестве ингибитора роста микроорганизмов *Clostridium paraputrificum* и *Clostridium perfringens*: первый известен как возбудитель пищевых отравлений и газовой гангрены. Он оказался активен в режиме профилактики этих заболеваний [34]. Показано [35, 36], что кордицепин активен в отношении *Culex pipie L*, *Aedes aegypt L*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi*. Показано, что комбинация кордицепина (2 мг/кг) и пентастатина (PTN) (0.2 мг/кг) оказывает значительный терапевтический эффект у мышей, зараженных *T. evansi* [37].

Кроме того, кордицепин проявляет противогрибковую активность, например, против *Candida* [38]. Учитывая, что хитин является основным компонентом клеточной стенки грибов, комбинация кордицепина и ингибиторов хитин-синтазы является перспективной стратегией в инсектицидном и противогрибковом применении.

С 2006 года исследователи начали изучать противовоспалительный эффект кордицепина. Результаты показали, что кордицепин является потенциальным агентом для ингибирования воспалительных процессов. Так, в 2010 году исследования воспалительных реакций ишемии показали, что кордицепин уменьшает высвобождение воспалительных медиаторов (NO, простагландин E2, TNF- α и интерлейкин-1 β) путем предотвращения активации NF-kB и ингибирования деградации IkB- α . Такое действие кордицепина позволяет считать его эффективным средством для лечения большого числа нейродегенеративных заболеваний [39].

Исследование [40] посвящено изучению антиоксидантной активности кордицепина, а именно - влиянию кордицепина на антиоксидацию и перекисное окисление липидов у старых крыс. Кордицепин при лечении пожилых крыс повышал активность каталазы, супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы, глутатиона и глутатионредуктазы, а также уровень витаминов E, C и восстановленного глутатиона по сравнению со значениями этих параметров у молодых крыс, что свидетельствует о влиянии кордицепина на антиоксидантную активность. Кроме того, было отмечено снижение уровня креатинина, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и малондиальдегида при использовании кордицепина на пожилых крысах. Авторы предложили кордицепин в качестве эффективного средства для снижения перекисного окисления липидов и восстановления антиоксидантного статуса.

В 2007 г. ученые обнаружили, что экстракт *C. Militaris* продемонстрировал антидепрессивный эффект на мышцах в тесте на подвеску хвоста (Tail suspension test - TST) [41]. Позднее было показано, что кордицепин [42] оказывал благоприятное воздействие на мышей в

тесте на принудительное плавание (Forced swim test - FST) с 6-недельным хроническим непредсказуемым легким стрессом [43].

В работе [44] обнаружили, что инъекция кордицепина привела к быстрому и надежному антидепрессивному эффекту, который наступил значительно быстрее и сильнее, чем у известного антидепрессанта - имипрамина, через 45 мин в тестах TST и FST. Этот антидепрессивный эффект сохранялся после 5 дней лечения кордицепином. В отличие от психостимуляторов, кордицепин не проявлял гиперактивного эффекта в тесте "Открытое поле". Роль кордицепина в регуляции депрессивноподобного поведения изучается в настоящее время.

В некоторых исследованиях сообщалось, что экстракт *C. militaris* демонстрировал значительное снижение уровня глюкозы в крови за счет усиления метаболизма глюкозы, а также защиту от диабетической нефропатии [45]. В другом исследовании антидиабетическая активность кордицепина была отмечена на мышинной модели диабета, вызванного аллоксаном. Полученные результаты свидетельствовали о значительном улучшении показателей теста на толерантность к глюкозе после введения кордицепина [46]. Кроме того, сообщалось о влиянии кордицепина на диабетическую нефропатию путем подавления апоптоза клеток, фиброза почек и восстановления аутофагии клеток в модели диабетической нефропатии у крыс [47]. Имеется ряд работ, свидетельствующих о том, что кордицепин имеет очень хороший потенциал для использования в качестве безопасного антидиабетического фармацевтического средства [45, 48, 49].

1.2.1 Противовирусная активность кордицепина

Известно, что кордицепин обладает противовирусной активностью в отношении ряда РНК-содержащих вирусов. В 1970-х годах было обнаружено противовирусное действие кордицепина на риновирусы, полиовирусы [50], вирус саркомы мышей [51], и вирус западного лошадиного энцефаломиелита [52]. Кроме того, проводились исследования кордицепина в отношении вируса болезни Ньюкасла [51], вируса табачной мозаики [50], вируса коровьей оспы [53] и вируса гепатита С [54].

Позднее было показано [55], что кордицепин и его 5'-монофосфат проявляют выраженную противовирусную активность *in vitro* в отношении ВИЧ путем ингибирования ОТ ВИЧ. Несколько исследовательских групп сообщали о том, что кордицепин обладает противовирусной активностью в отношении вируса лейкоза крупнорогатого скота (BLV) [56] и вируса Эпштейна-Барр (EBV) [57, 58].

В недавних исследованиях [59] впервые показано, что кордицепин способен эффективно подавлять размножение новых резистентных штаммов SARS-CoV-2 с очень малой долей анти-

SARS-CoV-2 *in vitro*. EC₅₀ против SARS-CoV-2 *in vitro* составляет около 2 мкМ, опережая как ремдесивир, так и его активный метаболит GS-441524.

Идеальные фармакофорные свойства молекулы кордицепина делают ее типичным ингибитором репликации SARS-CoV-2, а ее гибкая структура открыта для разнообразных модификаций.

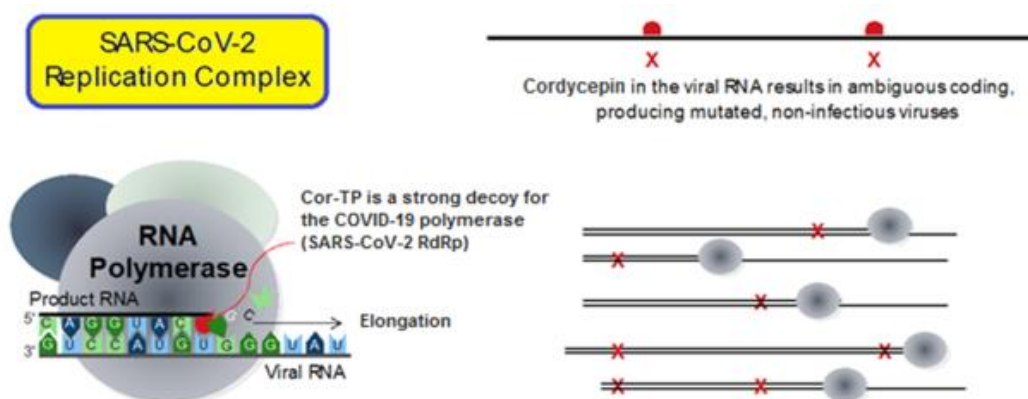


Рисунок 9 – Механизм действия нуклеозидного аналога на вирус SARS-CoV-2. [59]

Как антиметаболит, кордицепин «обманывает» РНК-зависимую РНК-полимеразу SARS-CoV-2 (RdRp) путем включения и встраивания в вирусные генетические цепочки вместо нормального аденозина, что приводит к повторному избыточному неоднозначному кодированию и преждевременному прекращению синтеза мРНК с образованием нечетких нитей РНК на конце; эти псевдонити, в свою очередь, образуют аномальные неинфекционные и неактивные вирусные частицы, и поэтому дальнейшая репликация вируса не происходит (Рисунок 9).

1.2.2 Противоопухолевая активность кордицепина

Противоопухолевая активность кордицепина является наиболее изученным биологическим действием среди остальных эффектов. Известно, что дисбаланс клеточного цикла и апоптоза может привести к возникновению и развитию опухоли [60]. Действие большинства противоопухолевых препаратов основаны на антипролиферативном эффекте и/или индуцировании апоптоза. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что кордицепин обладает антинеопластическими свойствами [61], благодаря сходству его структуры с аденозином. Считается, что суперэкспрессия ферментов, продуцирующих аденозин, и рост популяции аденозиновых рецепторов (adenosine receptors, ADORAs) коррелируют с активным развитием опухоли [62]. Кордицепин ингибирует активность поли(А)-полимераз, замедляя процесс полиаденилирования мРНК, что приводит к подавлению трансляции этих мРНК и, как следствие, снижению синтеза белков, необходимых для роста и деления клеток [63]. Внутри

клетки кордицепин фосфорилируется до 5'-моно-, ди- и трифосфатов [64]. Показано, что 5'-монофосфат кордицепина подавляет активность фосфорибозил-пирофосфат-амидотрансферазы, что приводит к затруднению биосинтеза пуринов *de novo* [65].

Кордицепин провоцирует терминацию элонгации цепи РНК. В процессе транскрипции некоторые ферменты не способны различить структуры монофосфатов кордицепина и аденозина. Это приводит к включению в растущую цепь 3'-дезоксаденозина вместо нормального аденозина и к преждевременному прекращению транскрипции [66]. Это явление было показано на дрожжах [66, 67] и клетках млекопитающих [68].

Показано, что кордицепин индуцирует апоптоз в клетках рака печени [69-71], карциномы почек [72, 73], рака легкого, рака простаты [74-77], лейкемических клетках [78-81], глиобластомы [82] и нейробластомы [83], молочной железы [69] и печени [78]. Кроме того, другие ученые пришли к выводу, что применение кордицепина инициирует остановку клеточного цикла на клеточных линиях рака толстого кишечника и мочевого пузыря [84-86].

Кордицепин частично ингибировал активность полиаденилат-полимеразы (РАР) в клетках лейкемии человека [61]. В работах [87, 88] показано, что кордицепин вызывает укорачивание концевых поли(А)-фрагментов, нарушая функционирование мРНК *Cdkn1a*, играющую важнейшую роль в апоптозе клеток.

Показано, что при обработке кордицепином клеток линий BEL-7402, HeLa, Molt-4, и ОЕС-М1 происходит увеличение количества клеток в фазе G1 клеточного цикла и их апоптоз. Возможно, это также связано с изменением активности РАР, вызванным действием кордицепина [89]. При анализе активности каспазы-6 [90] заметили, что кордицепин индуцирует апоптоз при эндонуклеосомальном расщеплении ДНК.

В 1990-е годы кордицепин рассматривали в качестве потенциального препарата для лечения терминального дезоксинуклеотидилтрансфераза-позитивного (TdT⁺) лейкоза. В результате оценки специфической цитотоксичности кордицепина к TdT⁺-лейкозных клеток выяснилось, что TdT⁺-клетки, обработанные кордицепином, претерпевали характерные изменения, связанные с апоптозом. Исследователи предположили, что монофосфат кордицепина в TdT⁺-клетках активирует протеинкиназу (PK-A), а затем фосфорилирует TdT [81]. Безопасность и эффективность кордицепина как средства лечения TdT-позитивной лейкемии оценивается в фазе I клинических испытаний [91], клиническое применение кордицепина для лечения TdT-позитивной лейкемии пока не разрешено.

Выдвинута гипотеза, что противоопухолевая активность кордицепина может быть связана не только с аденозиновыми рецепторами ADORAs [92-95], но и с рецепторами смерти (Death Receptors, DRs) [96] и рецепторами эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor, EGFR) (Рисунок 10, по лит. [96 и 97]).

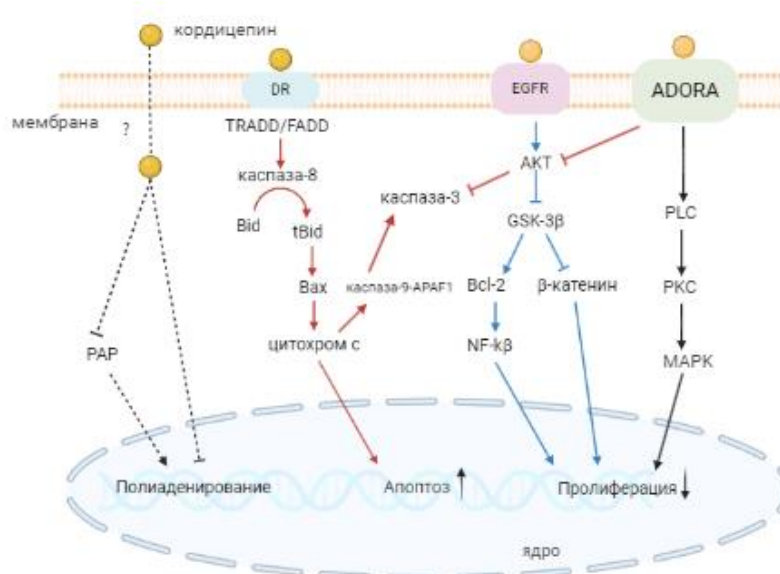


Рисунок 10 – Метаболические пути, стимулируемые кордицепином.

Примечание. Стрелками обозначена активация, линиями с планкой – ингибирование. Линии красного и голубого цвета показывают пути, приводящие к апоптозу и пролиферации соответственно. Линии черного цвета указывают на процессы, включенные в активность ДНК и/или РНК полимераз.

Кордицепин запускает апоптоз через ADORAs в клетках глиомы, меланомы и карциномы легкого [92-95] и через DRs в клетках рака толстой кишки и простаты [96].

5'-Трифосфат кордицепина, синтезируемый *in vivo*, может конкурировать с АТФ. Известно, что АТФ стимулирует рецептор EGFR посредством прямого связывания. Предполагают, что 5'-трифосфат кордицепина вместо АТФ встраивается в сайт связывания EGFR, блокируя его фосфорилирование. Однако неизвестно, связывается ли 5'-трифосфат кордицепина напрямую с каким-либо из рецепторов [80, 97, 98].

Очевидно, что механизмы, лежащие в основе противоопухолевого действия кордицепина, изучены не до конца. Приведенные данные очерчивают предполагаемые механизмы действия кордицепина, индуцирующие апоптоз и/или блокирующие пролиферацию клеток (см. рис. 10 [99]).

Считается, что апоптоз клеток может стимулироваться внутренним стрессом из-за присутствия активных форм кислорода или стресса эндоплазматического ретикулума. Кроме того, этот процесс может запускаться внешними сигналами от DRs [96]. Адаптерные белки домена смерти (Death domain, DD) (Fas белок (FADD), и рецептор фактора некроза опухоли типа 1 (TRADD), ассоциированные с DD) передают сигналы от связывания внешних стимулов с DRs. После присоединения к DRs каспаза-8 расщепляется и активирует запуск каспазного каскада, расщепляя каспазу-3 в опухолевых клетках человека [100].

На рисунке 10 показано, как кордицепин может участвовать в DRs-опосредованных путях. Введение кордицепина повышало экспрессию DR3 и DR5 в клетках HT-29 рака толстой кишки человека, а также уровни регуляторов апоптоза Fas и Bax в карциноме простаты человека, что приводило к индукции клеточной гибели [96, 97]. Более того, кордицепин при обработке клеток NB-4 высвобождал цитохром из митохондрий в цитозоль, вызывая внутренний апоптоз [73]. Уровень Bax увеличивался, вызывая высвобождение цитохрома с в ответ на индукцию проапоптотического белка tBid [101].

Вышеописанный механизм действия кордицепина считается основным и нашел подтверждение в экспериментах с клетками рака печени [62], простаты [65], легких [69], лейкемии [71], нейробластомы [74, 75] и молочной железы [98, 101, 102].

Аденозиновые рецепторы подтипа A₃, связанные с G-белками, все чаще признаются в качестве перспективных терапевтических мишеней для лечения злокачественных поражений организма человека [103]. Аденозиновые рецепторы человека ADORA подразделяют на подтипы A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR, и A₃AR [106]. Так, A_{2A}AR, и A₃AR рассматриваются как возможные мишени для действия кордицепина [93 - 95] (Рисунок 10).

Повышенная экспрессия рецепторов A₃AR в клетках рака мочевого пузыря человека усиливала действие экстракта кордицепса, содержащего кордицепин в качестве основного компонента, в то время как снижение уровня экспрессии подавляло [93]. Обработка кордицепином клеток глиомы C6 показала, что кордицепин индуцировал апоптоз через активацию A_{2A}AR [92].

Аденозиновые рецепторы могут регулировать активность фосфолипазы C (PLC) через G-белок, (показано на клетках базофильной лейкемии крыс) [105, 106]. Оказалось, что кордицепин может действовать на малигнизированные клетки опосредованно через путь ADORA-G-белок-PLC, вызывая апоптоз клеток [107].

Фосфолипаза C участвует в трансмембранной сигнализации [108], расщепляя 4,5-дифосфат фосфатидилинозитола (PIP₂) до 1,4,5-трифосфата инозитола (IP₃) и диацилглицерида (DAG). Последние вместе с ионами Ca²⁺ активируют протеинкиназу C (PKC) [109]. При использовании кордицепина было отмечено повышение внутриклеточных уровней PLC/PKC и митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) в клетках опухоли Сертоли–Лейдига на мышях MA-10, что приводило к гибели клеток [110].

Показано, что кордицепин - селективный агонист аденозиновых A₃ рецепторов, ингибирующий рост клеток B16-BL6 меланомы и карциномы легких Льюиса *in vitro* [50, 111]. Эти же ученые показали, что кордицепин подавлял рост HL60 клеток, стимулируя аденозиновые A₃ рецепторы с последующей активацией гликоген киназы-3β (GSK-3β) [112].

Антипролиферативный эффект через GSK-3 β -путь. В работе [72] было показано, что кордицепин подавлял ядерную транслокацию β -катенина в клетках лейкемии человека, снижая стабильность β -катенина. Любопытно, но аденозин не оказывал никакого влияния на β -катенин. Кордицепин-специфическое подавление β -катенина было опосредовано снижением фосфорилирования GSK-3 β и ее предшественника - протеинкиназы АКТ (Рисунок 10).

Известно, что АКТ активируется фосфоинозитид-3 киназой (PI3K), а в раковых клетках компоненты сигнального пути PI3K/АКТ часто изменяются [113].

В клетках рака легких человека лечение кордицепином снижало уровень фосфорилирования EGFR и АКТ [114]. Известно, что фосфорилирование GSK-3 β также регулируется А₃AR. А₃AR-опосредованный G-белок, выработка которого, возможно, стимулируется кордицепином, угнетает образование циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что приводит к подавлению протеинкиназы А (ПКА) и впоследствии - GSK-3 β , а затем и к ингибированию пролиферации [115].

Кордицепин может действовать синергически с другими химиотерапевтическими препаратами. В 2004 году группа ученых обнаружила, что при сочетании кордицепина с 5-фторурацилом или с альфа-интерфероном повышается чувствительность химиорезистентных клеток K562 к апоптозу, за которым следовало увеличение активности PAR до и после появления характерных признаков апоптоза. Как оказалось, увеличение активности PAR важно для сенсibilизации K562 [116].

В работе [117] провели серию функциональных тестов для изучения влияния лекарственной терапии на клетки рака пищевода. Животная модель *in vivo* подтвердила результаты экспериментов *in vitro*. Совместное лечение кордицепином и цисплатином подавляло рост клеток, миграцию и метастазирование, а также индуцировало апоптоз. Было обнаружено, что кордицепин эффективно усиливал активацию МРК и подавлял активность АКТ. Комбинированная терапия кордицепином и цисплатином представляет собой новый потенциальный метод лечения рака пищевода.

Несмотря на широкий спектр биологической активности кордицепина, существует ряд проблем клинического применения кордицепина:

а) Возможная токсичность для здоровых клеток: кордицепин токсичен для злокачественных раковых клеток и нетоксичен для здоровых клеток [118, 119]. Однако ранее также было заявлено, что кордицепин проявляет токсичность в отношении здоровых эритроцитов [120] и повреждает здоровые органы (печень и почки) *in vivo* у мышей [37].

Для снижения токсичности кордицепина применяют несколько потенциальных стратегий:

- (i) снижение дозы;

- (ii) применение структурных аналогов кордицепина, например, N-октаноилкордицепин демонстрирует более низкую скорость метаболизма и более высокую биодоступность, чем кордицепин [121].;
- (iii) использование носителей кордицепина для таргетированного лечения и специфического накопления кордицепина [122, 123].

б) Неблагоприятная фармакокинетика: кордицепин быстро теряет свою активность под воздействием аденозиндезаминазы (ADA) [124], а также имеет короткий период полураспада и быстро выводится из организма [125].

ADA дезаминирует кордицепин до 3'-дезоксиинозина **15** (рисунок 11), что серьезно ограничивает его применение для лечения.

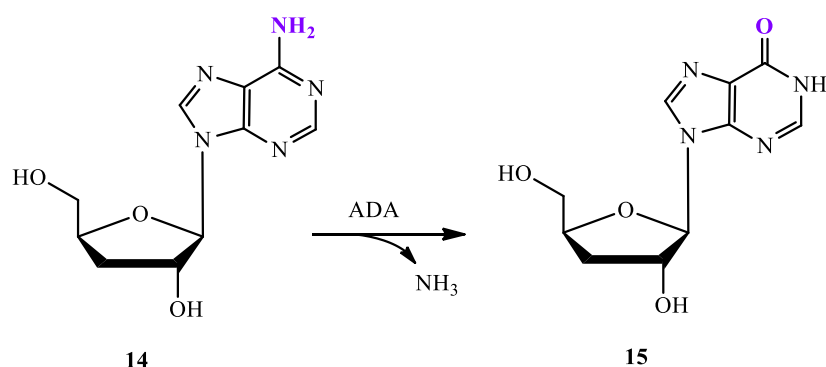


Рисунок 11 - Схема дезаминирования кордицепина под действием ADA.

Для решения этой проблемы используют три стратегии:

- (i) комбинированное применение кордицепина и ингибитора ADA: комбинация кордицепина и ингибитора ADA (например, актиномицин D [126], эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)-аденин [125] и PTN [127]) заметно повышает стабильность и биодоступность кордицепина;
- (ii) применение природных и разработанных ADA-устойчивых производных кордицепина: 2-фтор-3'-дезоксияденозин имеет значения цитотоксичности (IC₅₀) 2.44 ± 0.69 мкМ, в то время как кордицепин имеет IC₅₀ более 100 мкМ для клеток MOLT4 *in vitro* [128];
- (iii) использование наноносителя для ADA-устойчивости: например, наногибрид [Mg-Al-кордицепина] ингибирует рост клеток U937 со скоростью больше чем в 3 раза превышающей скорость роста при использовании кордицепина [129].

в) Сложные механизмы действия: кордицепин ингибирует и/или индуцирует множество мишеней дозозависимым, условно-зависимым и неспецифическим образом. Например, в работе [130] показано, что различные концентрации кордицепина оказывают различное воздействие на опухолевые клетки Лейдига мыши MA-10. Кроме того, кордицепин проявляет двунаправленную

регуляторную активность в различных стресс-индуцированных условиях и в различных типах клеток [131, 132].

Изучение механизмов действия при лечении болезней такими химиотерапевтическими препаратами как кордицепин - это сложный и актуальный вопрос. Необходимо разрабатывать способы получения новых аналогов, подходящих для клинического применения.

1.3 Аналоги кордицепина

1.3.1 N6-производные кордицепина

Известно, что повышенная липофильность алкилированных производных нуклеозидов может привести к улучшению их проникновения через мембраны. Для преодоления метаболической нестабильности кордицепина (дезаминирование под действием АДА и деградация в плазме крови) и повышения его биодоступности были получены N-ацил- (пропионил-, октаноил-, лауроил-, стеароил-) производные кордицепина **16-19** (Рисунок 12) и изучены их фармакокинетические профили [121].

Результаты показали, что время достижения максимальной концентрации (T_{max}) и период полувыведения ($t_{1/2}$) увеличиваются с увеличением длины алкильной цепи, а максимальная концентрация (C_{max}) и площадь под кривой концентрация-время (AUC) сначала увеличиваются, а затем уменьшаются, если количество алкильных углеродов превышает восемь. T_{max} , C_{max} и AUC N-октаноил-кордицепина (17) были почти в 4, 30 и 68 раз выше, чем у кордицепина. Все производные могли трансформироваться в кордицепин *in vivo*, а концентрация трансформированного кордицепина была пропорциональна концентрации производных. Это указывает на то, что N-октаноильная модификация может снизить скорость метаболизма, увеличить биодоступность кордицепина и может служить перспективным пролекарством кордицепина [121].

В работе [133] были получены новые производные кордицепина **20 - 22**, содержащие остатки ненасыщенных жирных кислот, включая линолевую, арахидоновую и α -линоленовую кислоты, соответственно (Рисунок 12).

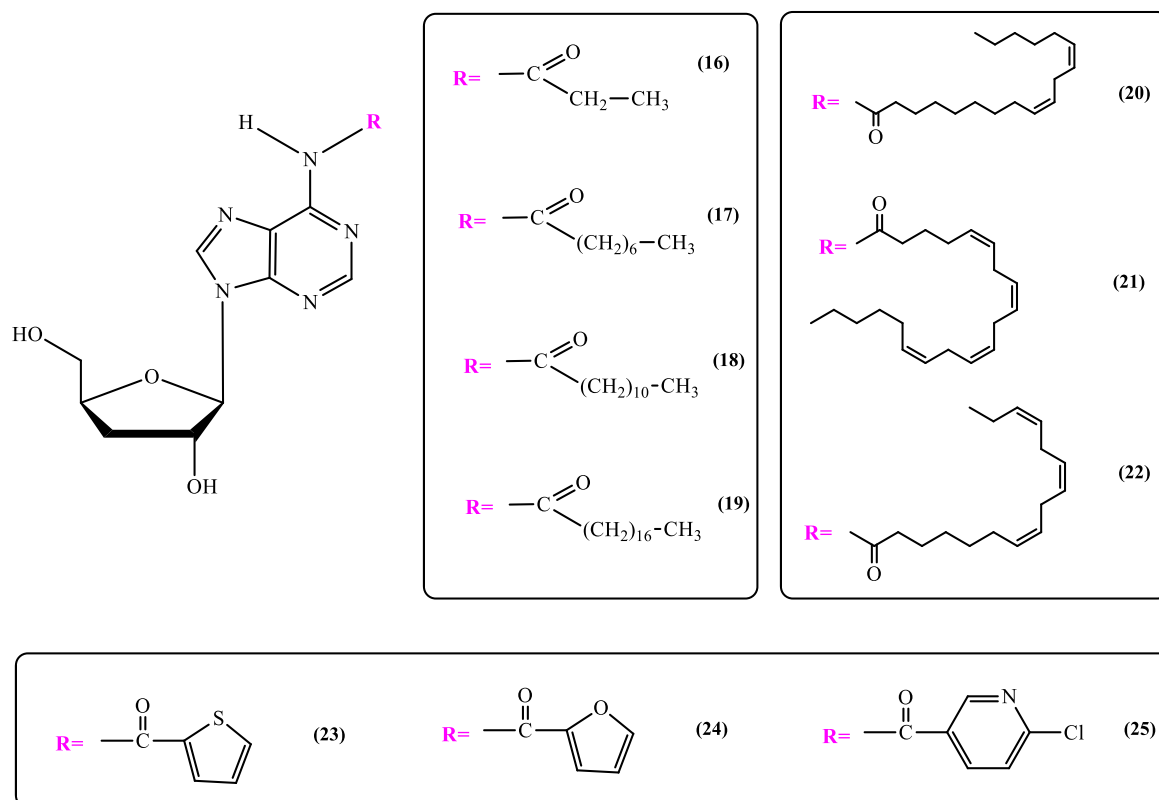


Рисунок 12 - N-Пропионил-, октаноил-, лауроил- и стеароил-кордицепин (**16–19** соответственно); производные кордицепина **20–22**, содержащие остатки линолевой, арахидоновой и α -линоленовой кислот соответственно; производные кордицепина **23–25**.

Соединения **20 – 22** проявили повышенную противоопухолевую активность по сравнению с кордицепином против клеточных линий: рака шейки матки человека HeLa, немелкоклеточного рака легких человека A549, рака молочной железы человека MCF-7 и гепатомы человека SMMC-7721. Примечательно, что аналоги **20** и **21** продемонстрировали противоопухолевую активность выше даже положительного контроля - 5-фторурацила (5-ФУ), а также повышенную стабильность как в растворе ADA, так и в плазме крови мыши.

В исследовании [134] синтезировали производные кордицепина **23–25** (Рисунок 12) и оценили противоопухолевую активность *in vitro* соединений против клеточных линий рака молочной железы человека MCF7, рака печени HepG2 и рака желудка SGC-7901 методом МТТ.

Результаты экспериментов показали, что соединение **23** проявляло наиболее очевидное ингибирующее действие на клетки MCF7 с $IC_{50} 27.57 \pm 0.52$ мкМ по сравнению с кордицепином ($IC_{50} 46.85 \pm 1.62$ мкМ), а также высокую селективность между MCF7 и нормальными клетками MCF-10A. Дальнейшие исследования выявили, что соединение **23** способствовало апоптозу и блокировало клеточный цикл в фазе G0/G1.

1.3.2 C2-замещенные аналоги кордицепина

Установлено, что аналоги, содержащие атом галогена в C2 положении гетероциклического основания, обладают устойчивостью к ADA [135]. Наиболее известными C2-замещенными аналогами кордицепина являются 2-хлоркордицепин (**26**) и 2-фторкордицепин (**27**) (Рисунок 13).

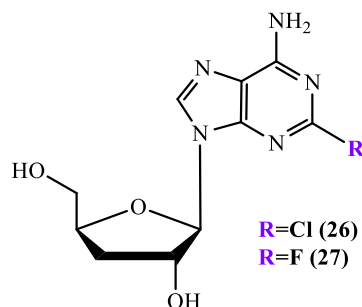


Рисунок 13 – 2-Галоген-замещенные производные кордицепина.

Несмотря на преимущество в виде ADA-резистентности, 2-хлоркордицепин **26** обладает высокой цитотоксичностью и не может использоваться как лекарственный препарат [136]. Более того, в работе [137] сообщалось о том, что применение 2-хлоркордицепина для лечения лейкоза в течение 7 дней приводило к развитию пелиоза печени - серьезному заболеванию, вызванному повреждениями синусоидов.

Об устойчивости 2-фторкордицепина к ADA человека упоминали еще в 1967 г. [138], хотя в то время было мало что известно о молекулярных взаимодействиях, ответственных за эту устойчивость. Гиллерман и Фишер на основе кристаллической структуры АДА оценили влияния заместителей по C2 и C8 положениям аденозина на связывание субстрата и ингибитора с ADA человека [139].

В работе [128] проводили оценку активности аналогов кордицепина **26** и **27** в отношении *Trypanosoma brucei* и жизнеспособности линии клеток млекопитающих L929 *in vitro*. Было показано, что 2-фторкордицепин - селективное, мощное и устойчивое к ADA трипаноцидное соединение, которое излечивало инфекцию, вызванную *T. brucei*, у мышей. Кроме того, было установлено, что аналог **27** обладает хорошими доклиническими свойствами, подходящими для перорального препарата, несмотря на относительно короткий период полураспада в плазме.

Соединение **27** проявило трипаноцидную активность *in vitro* с $\text{IC}_{50} = 174 \text{ nM}$, т.е. в 3-6 раз ниже, чем у кордицепина. Аналог **27** также проявил трипаноцидную активность против других патогенных для человека подвидов и показал 300-кратную дифференциальную токсичность для клеток L929.

Удивительно, но 2-хлоркордицепин **26** проявил очень слабую трипаноцидную активность *in vitro*. Несмотря на сходие с соединением **27** физико-химическим свойствам, стерическая масса

2-хлоркордицепина значительно больше. Вероятно, более объемные заместители препятствуют активации пролекарства до активного трифосфата путем уменьшения поглощения через аденозиновые транспортеры.

1.4 Способы получения кордицепина и его аналогов

Можно выделить два основных способа получения аналогов нуклеозидов: химический синтез [140] и химико-ферментативный синтез [141, 142].

В настоящее время большинство модифицированных нуклеозидов синтезируют химическим способом с использованием двух подходов: дивергентного и конвергентного.

Дивергентный подход заключается в химической модификаций природных нуклеозидов по углеводному остатку и/или по гетероциклическому основанию. Основным преимуществом этого метода является то, что стереохимия, особенно ключевая гликозидная связь (β -аномер), уже фиксирована. Недостаток этого подхода - использование нуклеозидов с двумя или тремя ОН-группами, которые схожи по реакционной способности и часто требуют нескольких стадий введения и снятия защитных групп.

Конвергентный подход основан на реакции гликозилирования – образовании гликозидной связи между азотистым основанием и модифицированным углеводным остатком в результате химической конденсации. Конвергентный подход широко используется и позволяет получить большое количество модифицированных нуклеозидов, но, тем не менее, даже с использованием стерео- и региоспецифических реакций образуется смесь N9- α - и β -изомеров, процесс разделения которых довольно трудоемок. К этому подходу относятся метод Фишера–Гельфериха с использованием солей металлов, метод высокотемпературного сплавления, метод Гилберта-Джонсона (реакция Форбрюггена).

1.4.1 Химический синтез кордицепина

Большую часть кордицепина (98%) для промышленных целей получают выделением из экстракта гриба *Cordyceps militaris* [143 – 146], но такой способ имеет ряд недостатков, связанных с использованием большого количества биомассы и сложностью выделения целевого соединения.

В настоящее время опубликовано более двадцати статей, посвященных химическому синтезу кордицепина. Обычно исходным соединением служит аденозин и основная задача синтетика - получение производного исключительно (или преимущественно) по 3-ему положению остатка рибозы для последующей модификации до кордицепина.

В работе [147] описан трехстадийный синтез кордицепина из аденозина с использованием α -ацетоксиизобутирилбромида (Рисунок 14, Схема 1). В результате реакции аденозина **28** с α -ацетоксиизобутирилбромидом была получена смесь бромпроизводных **29a** и **29b**.

На следующей стадии из этих соединений получали 2',3'-ангидроаденозин **30**, который восстанавливали триэтилборгидридом лития до кордицепина с выходом 97%. В этой схеме используется различие реакционной способности атомов C2 и C3 остатка рибозы - атом C3 намного более реакционноспособен.

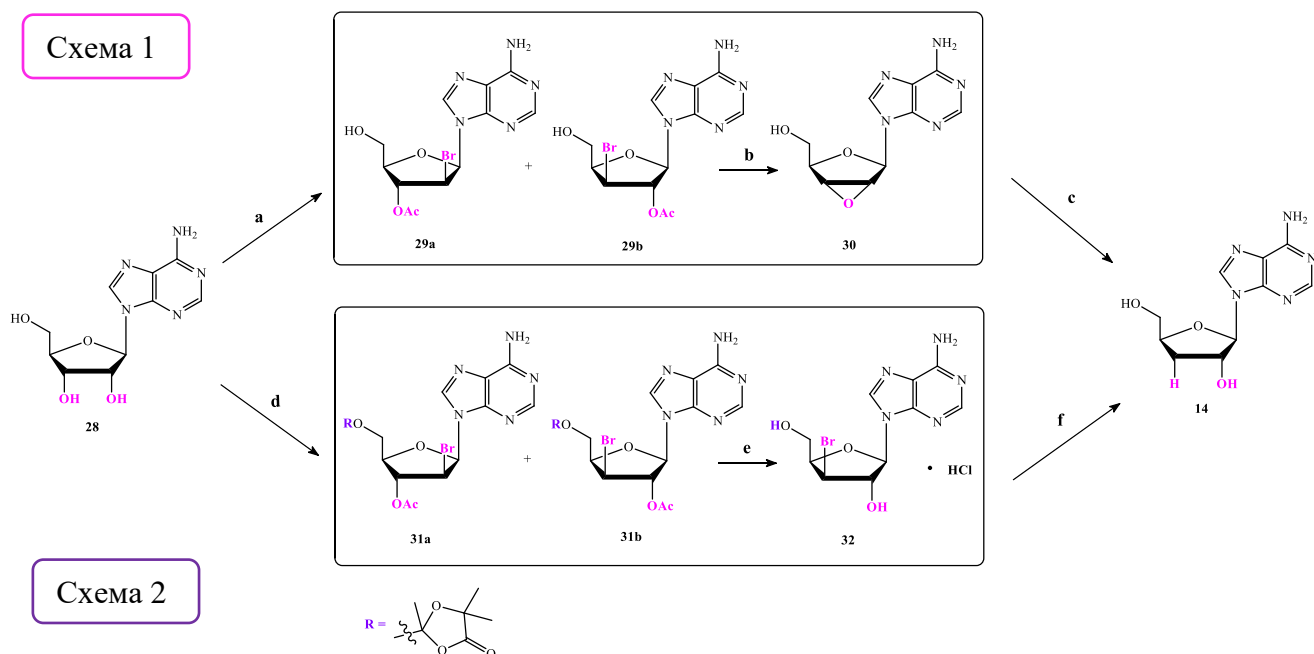


Рисунок 14 – Синтез кордицепина **14**.

Условия и реагенты:

(a) - α -ацетоксиизобутирилбромид, CH_3CN , H_2O , 20 °C, 1 ч; (b) – Amberlite 400, OH^- , MeOH, 92%; (c) – 1 M LiEt_3BH , THF, Me_2SO , 0 °C до 20 °C, затем 5% $\text{HOAc}/\text{H}_2\text{O}$, 98% (Схема 1);

(d) - α -ацетоксиизобутирилбромид, CH_3CN , EtOAc, <35 °C, 6 ч, до 52% **31b**; (e) – AcBr, MeOH, HCl, 20 °C, 2-4 дня, 70%; (f) – AcONa, EtOH, H_2O , затем Pd/C, H_2 , нагревание от 20 до 50 °C, 60% (Схема 2).

Другой подход описан в работе [148] (Рисунок 14, Схема 2). В этом варианте синтеза для разрешения проблемы специфичности использовали низкую растворимость соединения **31b** в смеси ацетонитрила и этилацетата. После ряда превращений был получен искомый кордицепин, но общий выход составил всего 10%.

1.4.2 Химический синтез аналогов кордицепина

Впервые 2-фторкордицепин **27** был получен из 2-амино-3'-дезоксиаденозина селективным диазотированием 2-аминогруппы в присутствии фтороборной кислоты с выходом 18% [138].

Позднее 2-фторкордицепин **27** синтезировали из кордицепина **14** с использованием α -ацетоксиизобутирилбромида (Рисунок 15) [128].

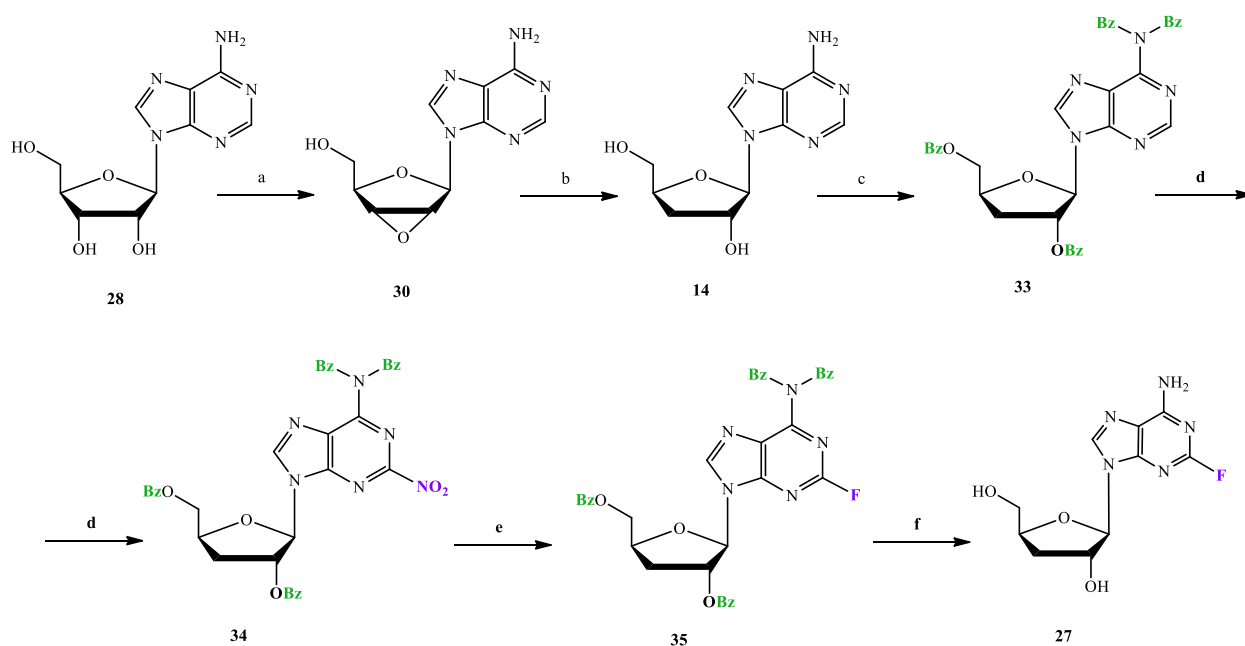


Рисунок 15 – Схема синтеза 2-фторкордицепина **27** из аденозина **28**.

Условия и реагенты:

(a) – α -ацетоксиизобутирилбромид, Amberlite 400, OH⁻, CH₃CN (62%); (b) – (C₂H₅)₃LiH, DMSO (53%); (c) – BzCl, пиридин (47%); (d) – TBAN, TFAA (45%); (e) – TBAF, CH₃CN (53%); (f) – NH₃, CH₃OH (59%).

Сокращения: TBAN – нитрат тетрабутиламмония; TFAA – ангидрид трифторуксусной кислоты; TBAF – фторид тетрабутиламмония.

Полибензоилирование **14** в присутствии пиридина позволило получить N,N,O,O-тетрабензоилированное производное кордицепина **33** с выходом 47%. Последующее нитрование по C2-положению пуринового цикла с помощью TBAN дало промежуточное соединение **34** с выходом 45 %. Атом фтора в C2-положение вводили замещением нитрогруппы при помощи TBAF с образованием промежуточного продукта **35**. Затем снимали защитные группы метанольным раствором аммиака с образованием целевого соединения **27** с общим конечным выходом 2%. Несмотря на воспроизводимость, синтез был неэффективным и требовал значительных усилий для получения достаточного количества соединения **27** для исследований *in vivo*.

Как оказалось, 2-галогензамещенные аналоги кордицепина **26** и **27** могут быть получены по стандартной методике Гилберта-Джонсона с помощью прямого рибозилирования коммерчески доступных незащищенных 2-фтораденина или 2-хлораденина 5-О-бензоил-1,2-ди-О-ацетил-3-дезоксид-Д-рибозой в присутствии N,O-бис(триметилсилил)ацетамида (BSA) и триметилсилилтрифторметансульфоната (TMSOTf) (Рисунок 16) [128].

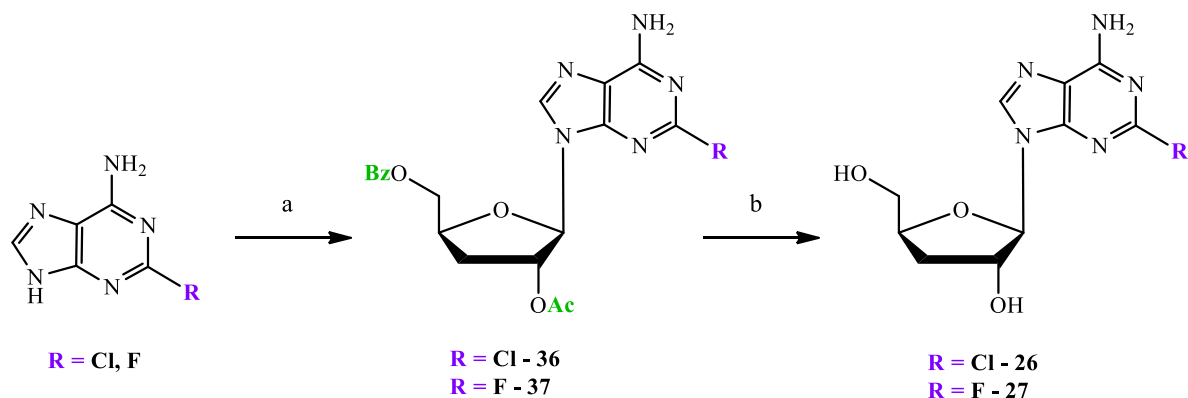


Рисунок 16 – Схема синтеза 2-галогензамещенных аналогов кордицепина **26** и **27**.

Условия и реагенты:

(a) – BSA, 5-О-бензоил-1,2-ди-О-ацетил-3-дезоксид-Д-рибоза, TMSOTf (98%); (b) – NH_3 , CH_3OH , (35-57%).

Синтез протекает с высокой стерео- и региоселективностью, не требует промежуточных очисток и может быть легко масштабирован. Последующее снятие ацильных защит с промежуточных соединений **36**, **37** метанольным раствором аммиака позволяет получить целевые продукты **26** и **27** [128].

1.4.3 Химико-ферментативный синтез

Большинство модифицированных нуклеозидов получают химическим способом, который имеет ряд недостатков: необходимость введения защитных групп, использование агрессивных растворителей и реактивов, многостадийность синтеза, образование побочных продуктов, и, как следствие, сложность выделения и очистки целевых соединений. Альтернативным методом получения аналогов нуклеозидов является химико-ферментативный синтез с использованием ферментов.

Ключевыми инструментами для синтеза модифицированных нуклеозидов можно считать ферменты, катализирующие образование гликозидной связи между гетероциклическим основанием и углеводным остатком или "обмен" углеводными остатками между нуклеозидами (нуклеозидфосфорилазы и N-дезоксирибозилтрансферазы). Обзор использования этих ферментов в синтезе нуклеозидов приведен в работе [149]. Особый интерес представляют нуклеозидфосфорилазы (NPs) *E. coli*.

Бактериальные NPs катализируют 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 к С1-атому фуранозы с образованием нового нуклеозида. Обе стадии обратимы (Рисунок 17).

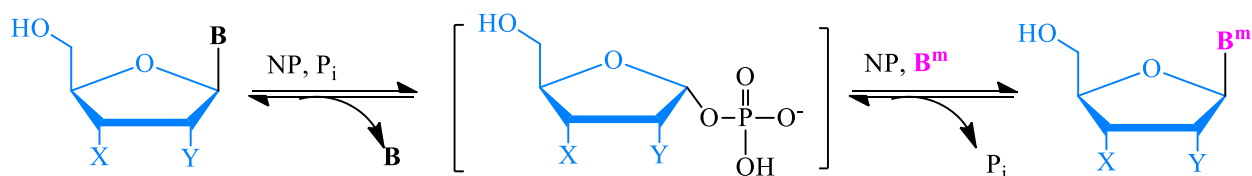


Рисунок 17 – Общая схема реакции трансгликозилирования. В – природное ГЦО; B^m – модифицированное ГЦО; NP – нуклеозидфосфорилаза; X, Y = H, OH, F и др.; P_i – неорганический фосфат.

NPs демонстрируют относительно низкую субстратную специфичность и находят применение в синтезе различных нуклеозидов на основе рибозы и арабинозы. Наиболее часто используются (PNP), уридинфосфорилаза (UP) и тимидинфосфорилаза (TP).

Первое сообщение о PNP появилось в 1950 году [150].

Этот фермент играет важную роль в метаболизме пуриновых оснований, катализируя фосфоролиз, приводящий к деградации пуриновых нуклеозидов. Генно-инженерная PNP *E. coli* представляет собой гексамерный белок с молекулярной массой 162 кДа [151]. Структура активного центра фермента обуславливает его широкую субстратную специфичность в отношении многих соединений ряда пуриновых нуклеозидов [152], что позволяет синтезировать множество новых модифицированных нуклеозидов с интересными биологическими свойствами.

В реакции трансгликозилирования можно использовать сами ферменты, селекционированные бактериальные клетки или клетки-продуценты [149].

В 2002 году был предложен химико-ферментативный синтез 3'-дезоксигуанозина с использованием селекционированных клеток *E. coli* BM-11 и BMt-4D/1A и ADA (Рисунок 18) [142]. Этот метод включает в себя конверсию 3'-дезоксцитидина **38** в 2,6-диаминопурин-3'-дезоксирибозид **39**, который затем дезаминировали с образованием 3'-дезоксигуанозина **4**.

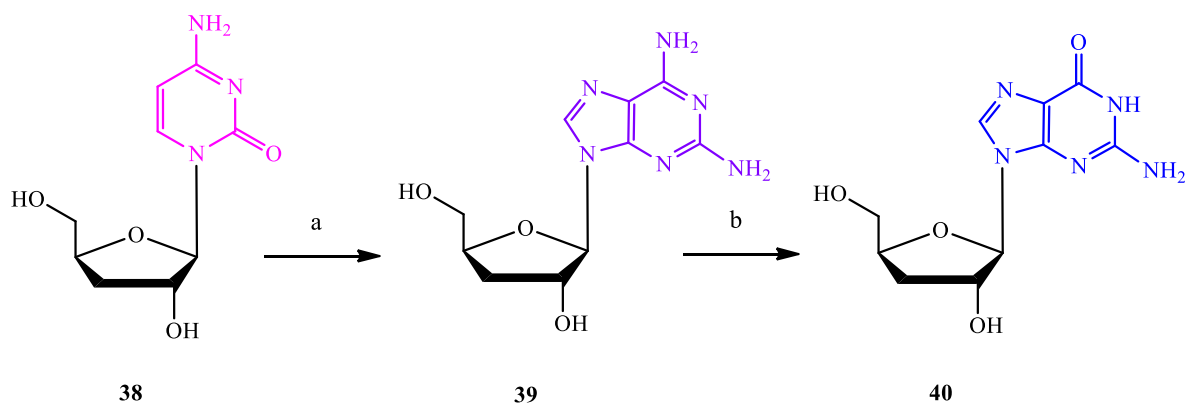


Рисунок 18 – Схема синтеза 3'-дезоксигуанозина.

Условия и реагенты:

- (a) – 2,6-диаминопурин, *E. coli* BM-11 и BMt-4D/1A, калий-фосфатный буфер, 52°C, 26 ч, 64%;
 (b) – АДА, 20°C, 16 ч, 68%.

Из 3'-дезоксигуанозина **40** химическим путем был получен 2-фторкордицепин **27** [153].

Примером использования в реакции трансгликозилирования N-дезоксирибозилтрансферазы (NDT) может служить синтез 2-фторкордицепина **27**, описанный в работе [154]. Использовалась NDT из *Chroococcidiopsis thermalis* и *Bacillus psychrosaccharolyticus*, иммобилизованная на хитозановых шариках. Примечательно, что такой фермент проявляет не свойственную ему специфичность (перенос 3-дезоксирибозы на основание), так что использование NDTs для получения 3'-дезоксинуклеозидов весьма перспективно.

Химико-ферментативный синтез пуриновых нуклеозидов имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с химическими методами:

- стерео- и региоспецифичность: образуются только N9-β-изомеры;
- выходы целевых соединений, как правило, выше;
- реакции протекают в водной среде, что более экологично и безопасно;
- отсутствие необходимости введения защитных групп;
- одна стадия синтеза.

1.5 Биологическая активность нуклеозидов замещенного бензимидазола

Бензимидазольный фрагмент является уникальным фармакофором в области медицинской химии [155 - 157]. В 1944 г. бензимидазол привлек внимание ученых своей пуриноподобной структурой и, как следствие, интересными биологическими свойствами. Позже Бринк выделил 5,6-диметилбензимидазол как продукт деградации витамина B12 (Рисунок 19), и впоследствии обнаружил несколько его аналогов, обладающих витамин B12-подобной активностью [158].

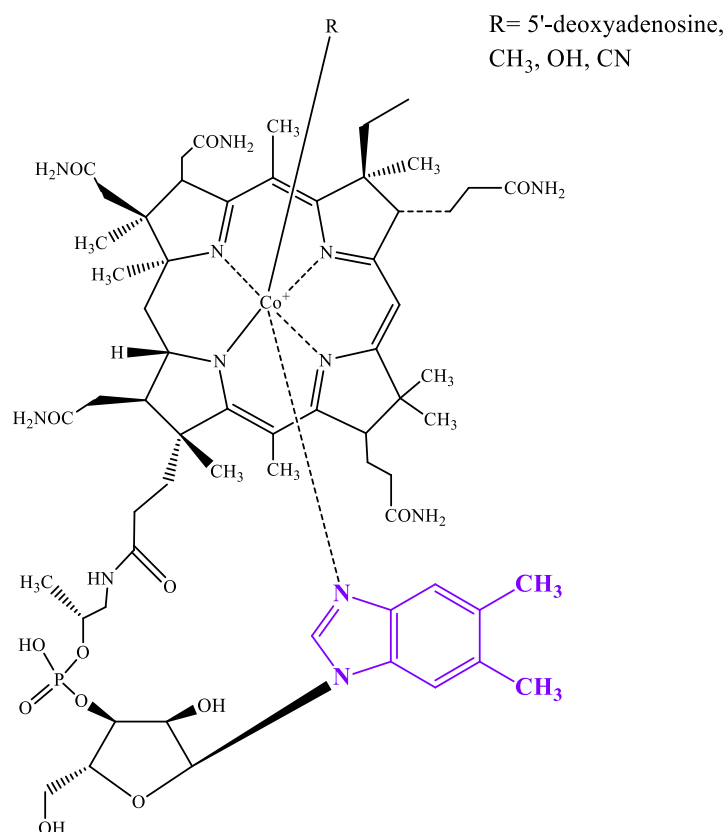


Рисунок 19 – Витамин В12 и 5,6-диметилбензимидазол.

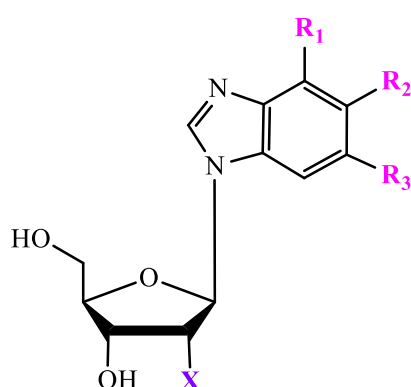
За несколько десятилетий активных исследований бензимидазол превратился в важное ГЦО с широким спектром фармакологических применений. Соединения, содержащие в структуре бензимидазольный фрагмент, могут проявлять противовирусную, антибактериальную, противогрибковую, противоопухолевую, антигипертензивную, противовоспалительную, антипаразитарную активность и часто иммунодепрессивные свойства [159]. Кроме того, в настоящее время изучают возможность лечения болезни Альцгеймера бензимидазольными производными [160].

Аналоги бензимидазола оказались мощными ингибиторами различных ферментов, вовлеченных в ряд клеточных процессов [159]. Нуклеозиды бензимидазола структурно имитируют пуриновые и проявляют широкий спектр биологической активности, взаимодействуя с ДНК, РНК и/или белками [161]. Примечательно, что для изменения биологической активности можно ввести другие заместители в бензимидазольный цикл или в углеводный остаток [162]. Даже незначительные изменения бензимидазольного фрагмента заметно изменяют биологическую активность [163].

1.5.1 Противовирусная активность нуклеозидов замещенного бензимидазола

Нуклеозиды бензимидазола активны в отношении ряда вирусов, например, цитомегаловируса (CMV) человека, вирусов простого герпеса человека 1, 2, 6 типов (HSV-1, HSV-2, HSV-6), вируса Эпштейна-Барр (EBV), а также вируса иммунодефицита человека (HIV) [164 – 167], и характеризуются невысокой системной токсичностью [168].

Галогенирование бензимидазольного кольца – эффективный способ модификации нуклеозида с целью появления или усиления противовирусной активности. Этот факт подтверждают многие исследования, посвященные синтезу галогенированных нуклеозидов бензимидазола и изучению их противовирусной активности. На Рисунке 20 представлена общая формула замещенных нуклеозидов бензимидазола, синтезированных в работе [169].



Соед.	X	R ₁	R ₂	R ₃
41	OH	H	Cl	Cl
42	H	H	Cl	Cl
43	OH	H	H	Br
44	OH	H	Br	H
45	OH	H	Br	Br
46	OH	Br	Br	Br
47	OH	Br	Cl	Cl
48	OH	Cl	Cl	Cl

Рисунок 20 – Замещенные нуклеозиды бензимидазола.

Результаты скрининга противовирусной активности соединений **41 - 48** *in vitro* показали, что соединение **41** (DRB) активно против вирусов гриппа А и В [169] и ряда других РНК- и ДНК-вирусов. Оно мало активно против вирусов HCMV и HSV-1 [170 – 173]. Соединение **42** активно против HSV и полиомавируса *in vitro* [174].

В ряду рибозидов галоген-производных бензимидазола **43 – 48**, соединение **48** проявило активность в отношении вируса гриппа А и парагриппа 1, но оказалось высоко цитотоксичным соединением, как и **41** [173]. Высокая цитотоксичность ограничивает использование **41** и **48** как противовирусных агентов.

Попытки снизить цитотоксичность и/или увеличить противовирусную активность DRB путем введения заместителей в углеводную часть молекулы не привело к значительным успехам [175, 176].

В работе [177] были получены 2'-фтор-арабинозиды фторированного бензимидазола (Рисунок 21) и протестированы против HSV-1 с использованием клеток Vero Е6.

Соединение **50** не проявило противовирусной активности, а нуклеозиды **49**, **51**, **52** обладали селективной противогерпетической активностью в нетоксических концентрациях.

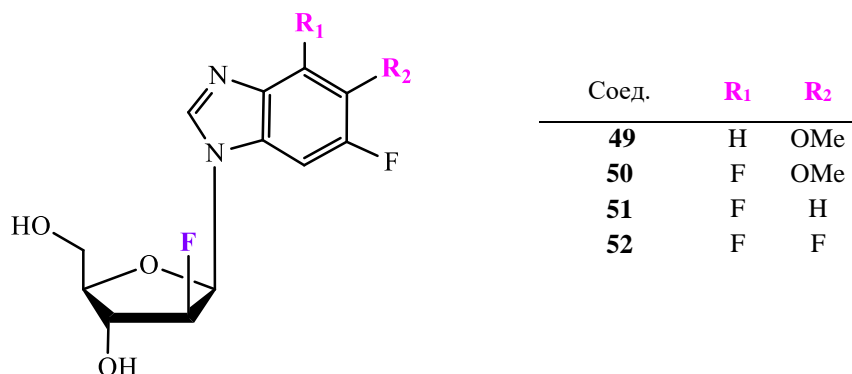


Рисунок 21 – 2'-Фтор-арабинозиды фторированного бензимидазола.

Еще один вариант модификации – введение заместителей в C2 положение бензимидазольного кольца (Рисунок 22).

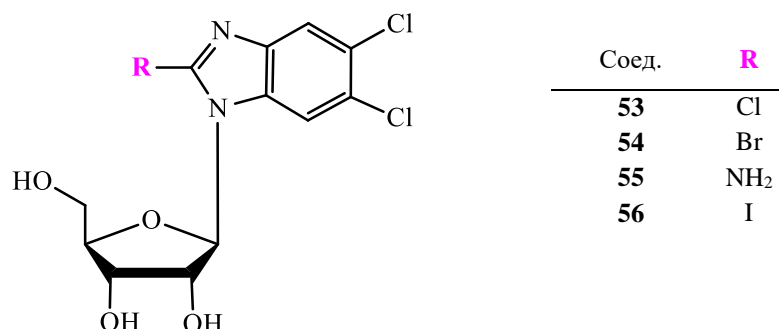


Рисунок 22 – Тризамещенные рибонуклеозиды бензимидазола.

Результаты экспериментов по изучению противовирусных свойств и цитотоксичности в отношении HCMV и HSV-1 соединений **53** – **56** показали, что соединение **53** (TCRB) и **54** (BDCRB) лишь незначительно активны против HSV-1, но высоко селективны против HCMV в нецитотоксических концентрациях. Интересно, что аналог, содержащий бром во втором положении, **54** – в 4 раза более активнее **53**. Соединения **55** и **56** проявили слабую противовирусную активность [178].

Показано, что 2'-дезоксид-β-D-рибо-формы **53** и **54** более цитотоксичны и менее активны против HSV-1 и HCMV [179].

Тот факт, что соединения TCRB и BDCRB проявляют слабую активность в отношении многих вирусов (респираторных вирусов, энтеровирусов, HIV и др.) [180] и селективную

активность в отношении цитомегаловирусов (HCMV, CMV обезьян-резусов и морских свинок [181]), вызвал интерес к изучению механизма действия этих соединений (Рисунок 23).

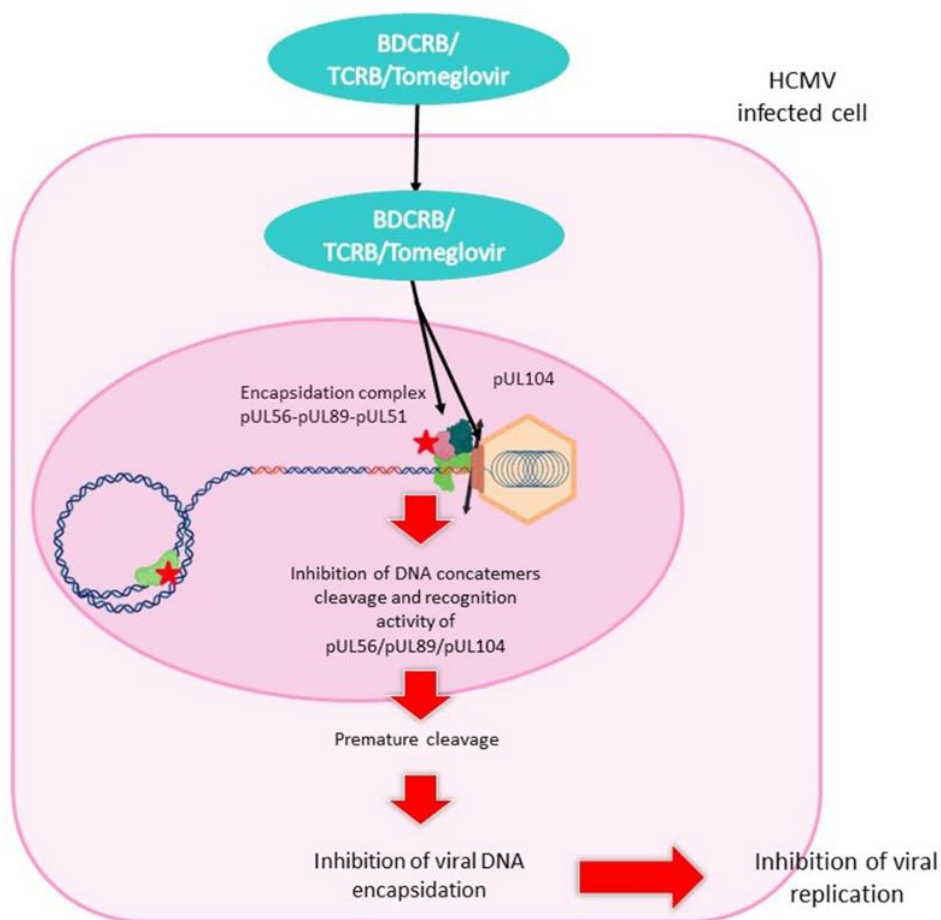


Рисунок 23 – Механизм действия аналогов бензимидазола **53** и **54** [182].

TCRB **53** и BDCRB **54** после проникновения в инфицированную HCMV клетку не фосфорилируются по 5'-положению и не ингибируют синтез ДНК [183], а сразу перемещаются в ядро. Они ингибируют инкапсидационный комплекс, состоящий из белков pUL56, pUL89 и pUL51, а также порталный белок pUL104 [182]. Реализация этого механизма приводит к предотвращению расщепления конкатомеров вирусной ДНК до мономеров, инкапсидация прерывается, и вирусная репликация останавливается [184]. Также предполагается, что BDCRB **54** заставляет терминазу HCMV пропускать обычный сайт расщепления и продолжать упаковывать ДНК до тех пор, пока не встретится следующий сайт расщепления [185].

Ранее было показано, что для проявления селективной противовирусной активности необходимо наличие заместителя во втором положении бензимидазольного цикла [178]. В результате введения заместителей в разные положения 2-галогензамещенного бензимидазола было получено несколько новых нуклеозидов и изучена зависимость "структура-активность"

[178, 186, 187]. Ни одно из таких соединений не показало активность в отношении HSV-1, а активность и цитотоксичность против HCMV оказались сопоставимы с активностью и цитотоксичностью соединений **53** и **54**.

Интересным решением в поиске аналогов нуклеозидов бензимидазола, обладающих противовирусной активностью, стал синтез L-рибозидов замещенного бензимидазола. Такие соединения более метаболически устойчивы и, как следствие, обладают лучшей биодоступностью по сравнению с D-рибозидами. В результате скрининга противовирусной активности L-рибозидов аналогов 2-амино-5,6-дихлор-бензимидазола было обнаружено наиболее эффективное соединение - 5,6-дихлор-2-изопропиламино-1-(β-L-рибофуранозил)бензимидазол (Марибавир, **57**) (Рисунок 24) [187].

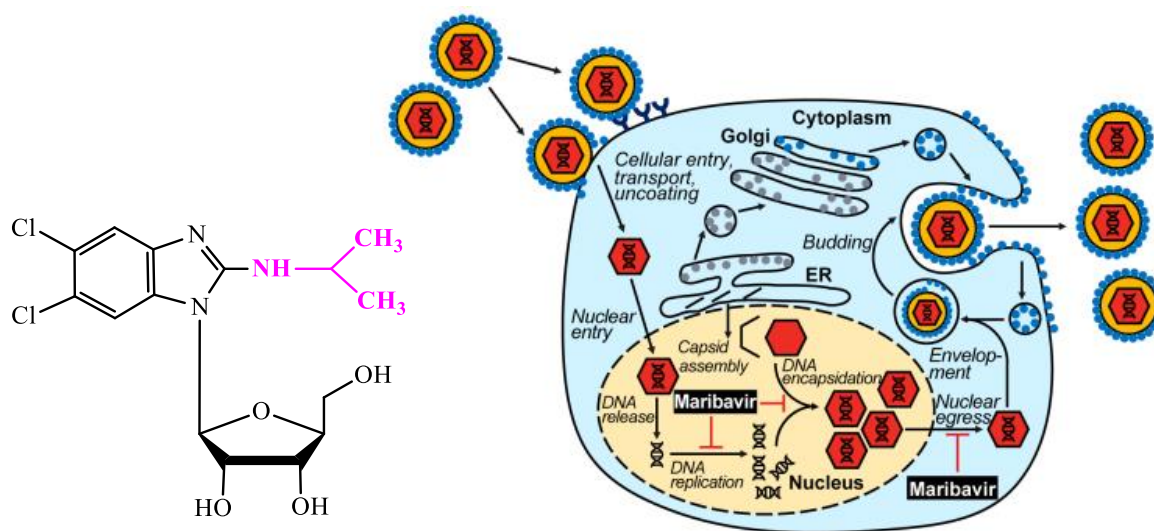


Рисунок 24 – Структура и механизм действия Марибавира **57** [188].

ER - эндоплазматический ретикулум.

Из современных противовирусных средств на основе аналогов бензимидазола только Марибавир одобрен для лечения рефрактерных или резистентных инфекций CMV у взрослых и детей (старше 12 лет). Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) относит его к препаратам первого класса [189]. Кроме того, Марибавир проявил активность *in vitro* в отношении EBV [187].

Как показано на Рисунке 24, вирионы CMV проникают в клетки-мишени хозяина путем слияния или путем эндоцитоза (в случае эндотелиальных и эпителиальных клеток хозяина), после чего капсид и белки тегумента, высвобождающиеся в цитоплазме, перемещаются к ядру клетки-хозяина, и ДНК CMV высвобождается в ядре [190]. После репликации ДНК вирусный геном CMV инкапсулируется в капсид, который выходит из ядра через ядерный выход. Капсиды

формируются в зрелые вирионы в цитоплазме клетки, приобретая гликопротеиновую оболочку из аппарата Гольджи. Затем зрелые вирионы высвобождаются во внеклеточное пространство путем экзоцитоза [191].

В отличие от других препаратов против CMV, Марибавир **57** конкурентно ингибирует вирусную протеинкиназу pUL97 и воздействует на ее естественные субстраты, которые участвуют в репликации ДНК и выходе вирусного капсида из ядра [192 – 195]. Следовательно, обработка Марибавиром приводит к накоплению незрелых вирионов в ядре [195]. Кроме того, он подавляет репликацию ДНК CMV через ингибирование pUL44. Такой механизм действия обуславливает активность **57** *in vitro* и *in vivo* против штаммов CMV, устойчивых к ганцикловиру, фоскарнету или цидофовиру [194, 196].

Были синтезированы нуклеозиды 2-аминобензимидазола, среди которых нуклеозид **58** (Рисунок 25) проявил значительную селективную активность против HSV-1.

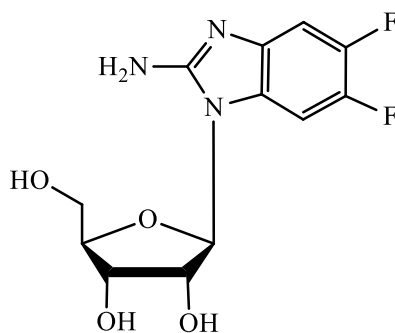


Рисунок 25 – 2-Амино-5,6-1-(β-D-рибофуранозил)-бензимидазол **58**.

Результаты исследований *in vitro* показали, что аналог **58** полностью подавляет развитие вирус-индуцированного цитопатического эффекта, вызванного вирусом в нецитотоксической концентрации (830 мМ, IC₉₅). Значение IC₅₀ 2-Амино-5,6-1-(β-D-рибофуранозил)-бензимидазола **58** составило всего 104 мМ, что в 4 раза ниже IC₅₀ рибавирина и в 8 раз ниже IC₅₀ Марибавира **57** [197].

1.5.2 Противоопухолевая активность нуклеозидов бензимидазола

Многочисленные исследования показали, что соединения, имеющие в структуре бензимидазольный фрагмент, обладают противоопухолевой активностью против различных типов раковых клеток [198, 199]. Бензимидазольное ядро является строительным блоком многих одобренных противораковых препаратов (бендамустин, нокодазол, довитиниб, биниметиниб, селуметиниб, абемациклиб, велпариб, прациностат, галетерон и назартиниб). Противоопухолевая активность может быть обусловлена различными механизмами такими, как индукция апоптоза [200, 201] или ферроптоза [202], блокада клеточного цикла на разных стадиях [203, 204], взаимодействие с ДНК [205, 206], ингибирование мишеней: рецептора

эпидермального фактора роста [207], протоонкогена B-Raf, серин/треониновой киназы [208], полимеризация тубулина [209], и топоизомеразы I и II [210, 211].

Нуклеозиды бензимидазола в качестве потенциальных противоопухолевых соединений привлекли внимание благодаря высокой цитотоксичности, обнаруженной ранее в экспериментах по изучению противовирусной активности *in vitro*. Соединение **41** проявило высокую цитотоксичность на фибробластах крайней плоти человека, на клетках эпидермоидной карциномы полости рта человека [178] и на клеточной линии карциномы гортани человека Нер-2 [212]. Другие исследования показали, что DRB **41**, являясь селективным ингибитором циклин-зависимой киназы 9, индуцировал апоптоз при различных гемопоэтических злокачественных опухолях [213] и раке молочной железы (на клеточной линии MCF-7 [214]).

В 1970-е годы синтезировали и проводили оценку противоопухолевой активности TCRB **53** и его тризамещенных аналогов. Эти соединения показали низкие противоопухолевую активность и цитотоксичность [215]. Позже было показано, что более высокую цитотоксичность проявили 5'-замещенные аналоги TCRB **53** (Рисунок 26) на клетках фибробластах крайней плоти человека [216].

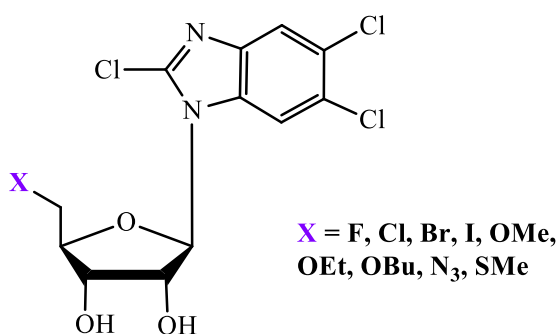


Рисунок 26 – 5'-Замещенные аналоги TCRB **53**.

Исследования зависимости «структура-активность» замещенных нуклеозидов бензимидазола продолжаются. Возможность различных структурных модификаций открывает пути для создания новых препаратов с улучшенными терапевтическими свойствами и широким спектром противоопухолевой активности. Также изучается комбинированное использование нуклеозидов бензимидазола с другими противораковыми препаратами для повышения эффективности лечения и снижения токсичности.

1.6 Способы получения нуклеозидов бензимидазола

В настоящее время нуклеозиды бензимидазола получают двумя способами: химическим и химико-ферментативным синтезом.

В ходе химического синтеза вносятся изменения в бензимидазольный цикл и/или в углеводный остаток нуклеозида бензимидазола. Используется также гликозилирование замещенного бензимидазола.

Химико-ферментативным методом новые нуклеозиды синтезируют при помощи реакции трансгликозилирования [217 – 219].

1.6.1 Химические способы синтеза нуклеозидов бензимидазола

История развития химического синтеза нуклеозидов бензимидазола берет свое начало в 1951 г. – тогда был впервые получен рибозид бензимидазола гликозилированием [220]. В основе гликозилирования оснований бензимидазола лежит классическая реакция Форбрюггена [221, 222]. В результате реакции обычно образуется смесь α - и β -нуклеозидов в разных соотношениях [223, 224]. Например, при сплавлении 3,4-дихлорбензимидазола **59** с защищенной рибозой **60** образуется смесь α - и β -изомеров **41a** и **41b** в пропорции 1:1 [225] (Рисунок 27). Чтобы предотвратить образование нежелательного α -нуклеозида, изменили условия проведения реакции и реагенты [226], региоселективно получив только β -нуклеозид - DRB **41a** с выходом 51%.

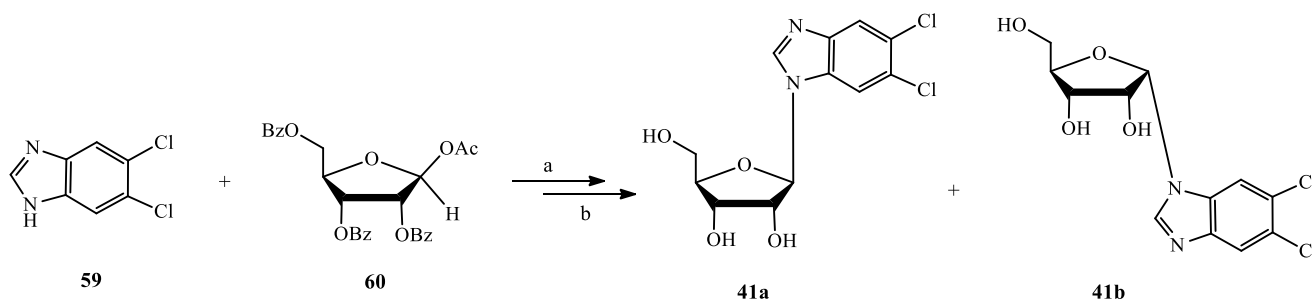


Рисунок 27 – Схема синтеза DRB **41**.

Условия и реагенты: (a) – (1) – 170-180 °C, TSA; (2) – BSA, TMSOTf, CH₃CN; (b) - NH₃/MeOH.

Для получения соединений TCRB **53** и BDCRB **54** был разработан универсальный синтез на основе реакции гликозилирования (Рисунок 28) [178]. Сначала синтезировали ГЦО - 2,5,6-трихлорбензимидазол **63** и 2-бром-5,6-дихлорбензимидазол **64** из 4,5-дихлор-О-фенилендиамина **61** замыканием цикла с образованием 2-амино-5,6-дихлорбензимидазола **62** и последующим диазотированием.

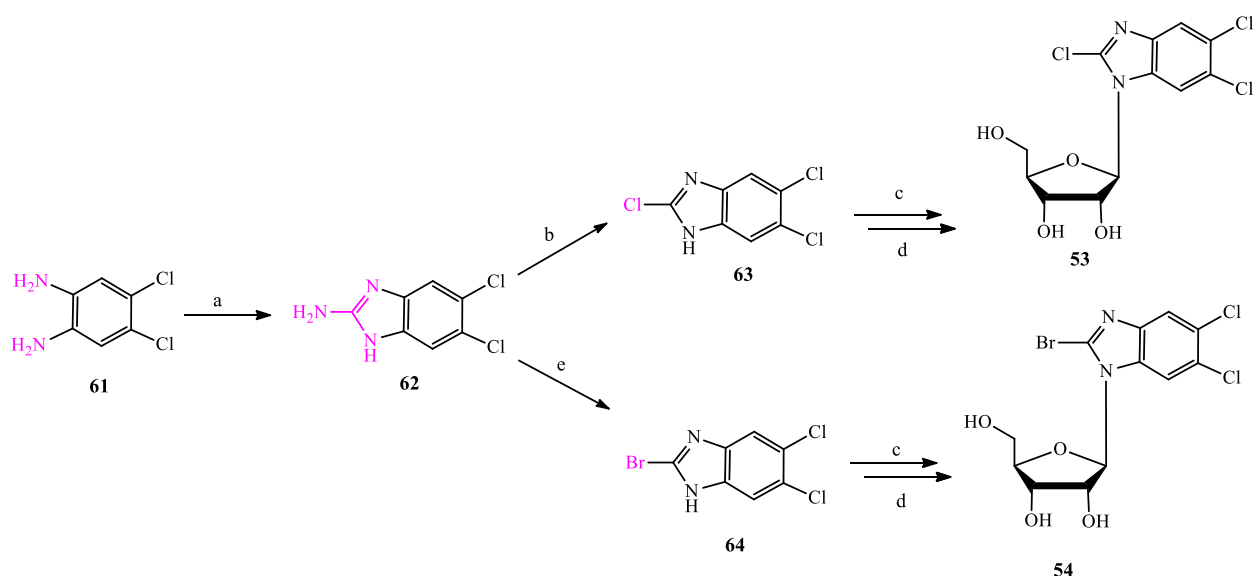


Рисунок 28 – Схема синтеза TCRB **53** и BDCRB **54**.

Условия и реагенты: (a) - CNBr, MeOH; (b) - HCl, NaNO₂, CuCl₂; (c) – (1) BSA/CH₃CN, (2) TAR, TMSOTf; (d) - NH₃/MeOH; (e) - HBr, NaNO₂, CuBr.

Затем соответствующие ГЦО **63** и **64** обрабатывали BSA с последующим рибозилированием 1,2,3,5-тетра-О-ацетил-β-D-рибофуранозой (TAR) в присутствии TMSOTf и снятием ацетильных групп с образованием TCRB **53** с выходом 74 % и BDCRB **54** с выходом 37 % [178].

2,5,6-Трихлор-1-(2'-дезоксигидро-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)бензимидазол (**66**), фторированный по углеводному остатку аналог TCRB, получали конденсацией ГЦО **63** с 1-бром-3,5-ди-О-бензоил-2-дезоксигидро-2-фтор-α-D-арабинофуранозой **65** (Рисунок 28) [227 – 229].

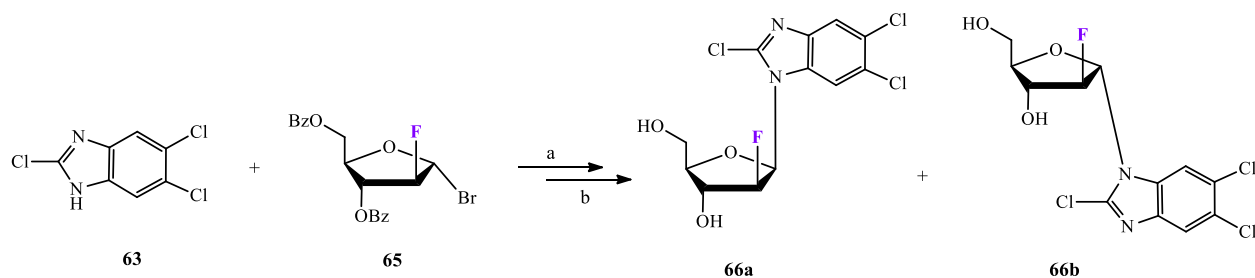


Рисунок 28 – Схема синтеза аналогов TCRB – **66a** и **66b**.

Условия и реагенты: (a) – дихлорэтан, 80 °C; (b) - NH₃/MeOH.

В результате гликозилирования и последующего снятия защитных групп образовалась смесь α- и β-изомеров (**66a** и **66b**), что затрудняло их выделение. Дальнейшие исследования подобных реакций показали, что изменение условий (температуры, растворителей, применение катализаторов) могут повлиять на соотношение продуктов реакции в смеси [223, 224, 230]. Если конденсацию проводят в неполярных растворителях (дихлорэтан, бензол), то образуется

преимущественно β -аномер **66a** (88 %), а в полярных растворителях (ацетонитрил, нитрометан) - α -аномер **66b** (87 %). Выход целевого соединения **66a** в подобранных условиях составил 50 % [216].

Аналогичным способом были синтезированы рибозиды моно- и дифторзамещенного бензимидазола **71** и **72**, соответственно. В результате кипячения исходных оснований бензимидазола **67** и **68** в BSA и реакции с TAR образуется смесь N3- и N1-изомеров – **69a** и **69b** в соотношении 1:9, **70a** и **70b** – 1:6. Последующее снятие ацетильных групп с желаемых N1-изомеров **69b** и **70b** приводило к целевым соединениям **71** (выход 89%) и **72** (выход 94%) (Рисунок 29) [231].

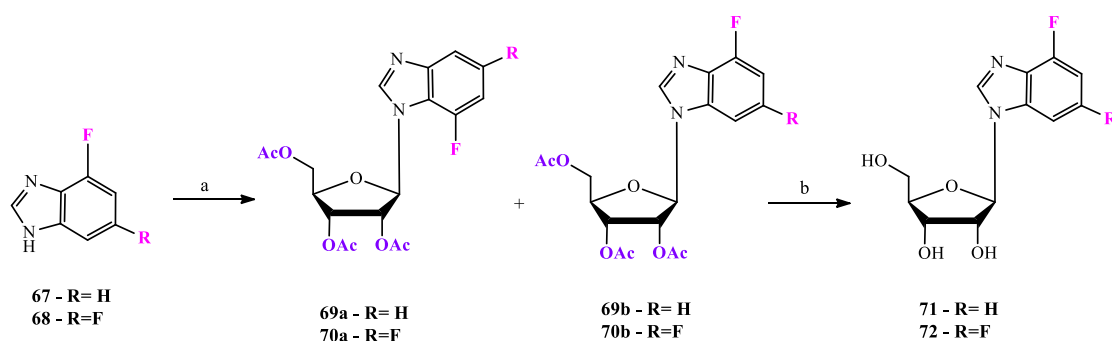


Рисунок 29 – Общая схема синтеза рибозидов фторзамещенного бензимидазола.

Условия и реагенты: (a) – BSA, TMSOTf, TAR; (b) - NH_3/MeOH .

Наряду с гликозилированием ГЦО для синтеза нуклеозидов бензимидазола применяют химическую модификацию природного или синтезированного нуклеозида.

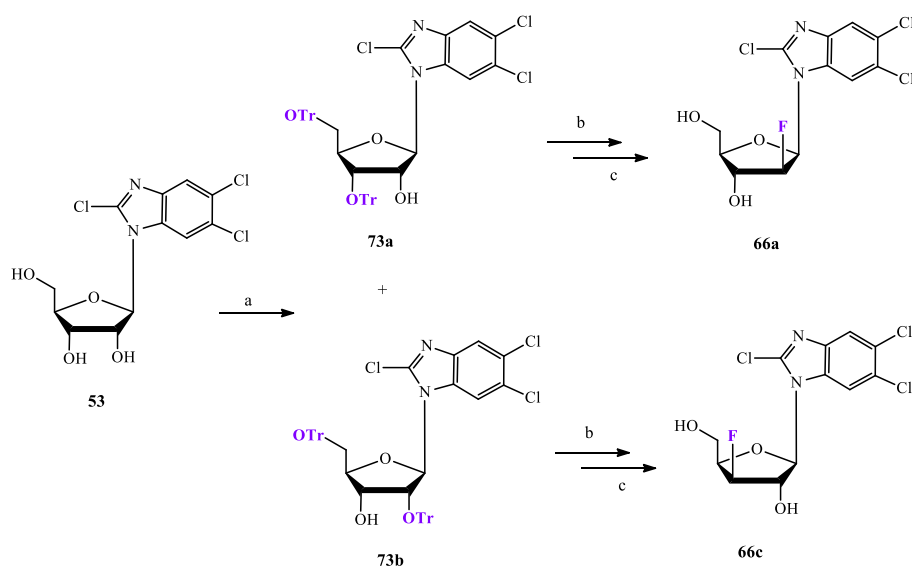


Рисунок 30 – Схема синтеза аналогов TCRB **53**.

Условия и реагенты: (a) - TrCl , DMAP, пиридин, 80°C ; (b) – DAST, CH_2Cl_2 , пиридин; (c) – CF_3COOH , CHCl_3 .

В работе [232] предложен синтез фторированных аналогов TCRB **53** – **66a** и **66c** (Рисунок 30). Обработка TCRB **53** тритилхлоридом с 4-диметиламинопиридином (DMAP) привела к образованию смеси бистритильных производных **73a** (10%) и **73b** (30%). Последующее фторирование соединений **73a** и **73b** и снятие тритильных групп дали соединения **66a** и **66c** с выходом, не превышающим 5%.

Подводя итог данного раздела, можно выделить преимущества и недостатки химического способа получения нуклеозидов бензимидазола. Преимуществом химического синтеза является то, что возможно получить практически любой нуклеозид бензимидазола. Основные недостатки заключаются в том, что в результате конденсации зачастую образуется смесь α - и β -нуклеозидов, а реакция модификации нуклеозидов может быть ограничена доступностью исходных соединений. Более того, химический синтез связан с использованием достаточно жестких условий и агрессивных реагентов. Поэтому остается актуальным вопрос поиска эффективного метода получения модифицированных нуклеозидов.

1.6.2 Ферментативный синтез нуклеозидов бензимидазола

Для получения нуклеозидов бензимидазола в настоящее время широко применяются методы, основанные на реакции трансгликозилирования с использованием бактериальных нуклеозидфосфорилаз (NPs) и N-дезоксирибозилтрансфераз (NDTs) [233 – 236]. Эти методы соответствуют принципам «зеленой химии» [237], обеспечивают регио- и стереоспецифичность, исключают применение защитных групп [238] и в целом являются ценным инструментом для синтеза новых нуклеозидов.

1.6.3 Ферментативный синтез нуклеозидов бензимидазола с использованием NDTs

NDTs были обнаружены в молочнокислых бактериях, таких как *Lactobacillus helveticus* [239], *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus fermentum* [240], *Lactobacillus reuteri* [241] и *Lactococcus lactis subsp. lactis* [242], хотя NDTs были также обнаружены в паразитических одноклеточных эукариотических организмах [243 – 245], а также у экстремофильных бактерий [237].

NDTs катализируют расщепление гликозидной связи 2'- β -дезоксинуклеозида и последующий перенос углеводного остатка на остаток пурина или пиримидина. Реакция является региоселективной (перенос донорного субстрата происходит в N-1 положение пиримидина или N-9 положение пурина) и стереоселективной (образуются исключительно β -аномеры) [243]. Интересно, что NDTs демонстрируют высокую регио- и стереоселективность в отношении широкого спектра не только природных, но и модифицированных оснований [246,

247]. Так, с помощью NDT *L. delbrueckii* (LdNDT) был синтезирован кладрибин, 2'-дезоксирибозид 2-хлораденина, известное противолейкемическое средство [248].

Было показано, что реакция, катализируемая NDT, протекает по «пинг-понг би-би»-механизму через образование промежуточного продукта – ковалентно связанного комплекса дезоксирибозил-фермент (субстрат связывается с остатком глутамина Glu98 активного центра фермента) [249, 250] (Рисунок 31).

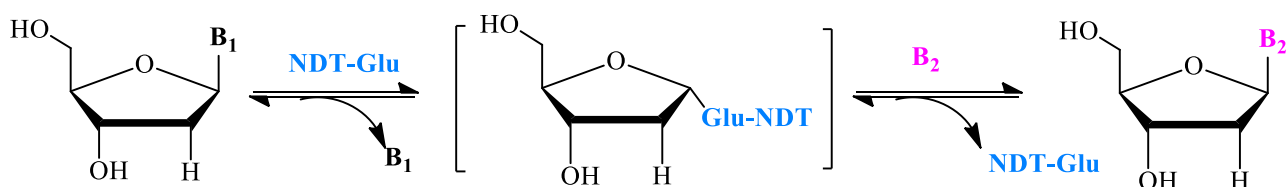


Рисунок 31 – Схема реакции, катализируемой NDT, где B₁, B₂ – основания, Glu – остаток глутамина.

2'-Дезоксирибозид бензимидазола (**74**) и 2'-дезоксирибозид 5,6-диметил-бензимидазола (**75**) (Рисунок 32) были впервые получены в результате ферментативной реакции с NDT и тимидина как донора углеводного остатка с выходом 33% и 38%, соответственно [251]. При замене исходного субстрата на 2'-дезоксцитидин в работе [217] нуклеозид **74** был синтезирован с выходом 46%. 2'-Дезоксирибозиды **76** и **77** (Рисунок 32) были получены в присутствии NDT с использованием 2'-дезоксаденозина [252], а DRB **41a** - с использованием 2'-дезоксйуридина [218].

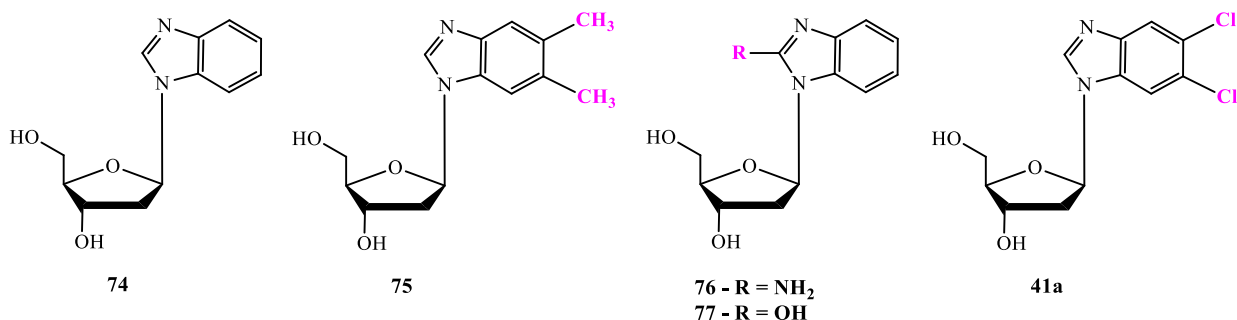


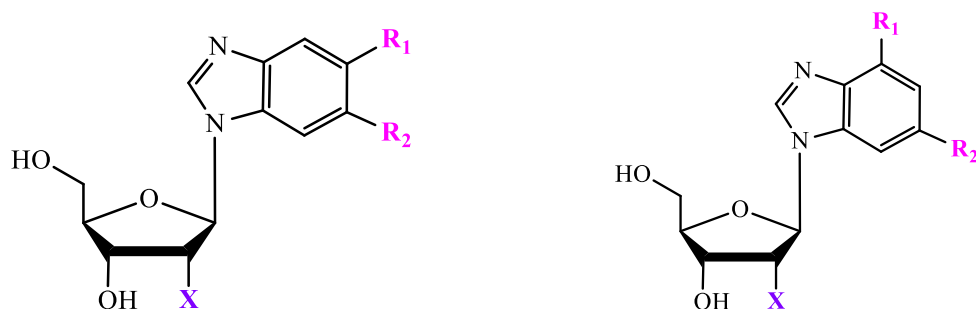
Рисунок 32 – 2'-Дезоксирибозиды бензимидазола и его аналогов, полученные с помощью NDTs.

NDT *L. reuteri* (LrNDT) - наиболее активный фермент среди известных N-дезоксирибозилтрансфераз. С его помощью был синтезирован ряд модифицированных нуклеозидов. Например, был получен 2'-дезоксирибозид бензимидазола **74** (Рисунок 32), где в качестве донора дезоксирибозы использовали 2'-дезоксаденозин или 2'-дезоксйуридин [249].

Известно, что NDTs проявляют строгую специфичность к 2'-дезоксинуклеозидам, но некоторые исследования показали, что NDTs могут быть толерантны к модификациям в C2'- и C3'-положениям 2'-дезоксирибозы [239, 241, 253, 254]. Так, например, NDT *L. Helveticus* катализирует перенос 2',3'-дидезоксирибозы на природные и галоген-замещенные основания [256, 257], а NDT *L. Leichmanii* - перенос 2',3'-дидезоксирибозы с 2',3'-дидезоксицитидина на N6-замещенные аналоги аденина [248].

1.6.4 Ферментативный синтез нуклеозидов бензимидазола с использованием NPs

В ферментативном методе синтеза активно используются NPs. В работе [219] впервые были получены рибозиды и 2'-дезоксирибозиды замещенного бензимидазола (Рисунок 33) реакцией трансгликозилирования с участием PNP *E. coli* BMT-ID/IA целых бактериальных клеток.



Соед.	R ₁	R ₂	X	Выход, %
78	H	H	OH	70
74	H	H	H	90
79	F	F	OH	75
80	F	F	H	80
42	Cl	Cl	OH	80
41a	Cl	Cl	H	72
81	CH ₃	CH ₃	OH	98
75	CH ₃	CH ₃	H	98
82	NO ₂	NO ₂	OH	32
83	NO ₂	NO ₂	H	65
84	H	NO ₂	OH	75
85	H	NO ₂	H	77

Соед.	R ₁	R ₂	X	Выход, %
86	Br	Br	OH	50
87	Br	Br	H	66
88	NO ₂	NO ₂	OH	<1
89	NO ₂	NO ₂	H	7
90	NH ₂	H	OH	<1
91	NH ₂	H	H	57

Рисунок 33 – Нуклеозиды бензимидазола, полученные с помощью PNP *E. coli* BMT-ID/IA.

В работе [219] изучали субстратную специфичность PNP *E. coli* по отношению к замещенным основаниям бензимидазола; в качестве источника углеводного остатка

использовали гуанозин и 2'-дезоксигуанозин. Экспериментальные данные показали, что бензимидазол и его 5,6-дизамещенные производные являются хорошими субстратами для PNP.

С другой стороны, образующийся в результате трансгликозилирования 1-(β-D-рибофуранозил) бензимидазол является очень плохим субстратом для фосфоролиза PNP [258]. Это связано с высокой стабильностью гликозидной связи [259].

На Рисунке 34 представлена схема синтеза нескольких 5-фтор-6-замещенных-1-(β-D-рибо- и 2'-дезоксирибофуранозил) бензимидазолов с использованием NP. Доноры углеводного остатка - уридин, 2'-дезоксидиридин или тимидин. Выходы целевых соединений - 51-98 % [260].

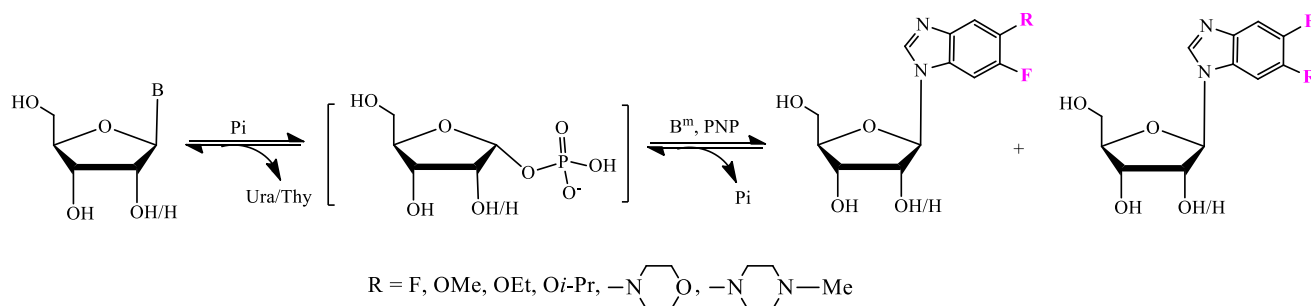


Рисунок 34 – Схема ферментативного синтеза нуклеозидов бензимидазолов.

B – природное основание, B^m – модифицированный бензимидазол.

Условия и реагенты: 50°C, калий-фосфатный буфер (pH 7).

Следует отметить, что в случае несимметрично замещенных бензимидазолов образуется смесь N1- и N3-региоизомеров. Это явление характерно как для реакции трансгликозилирования, так и для химического гликозилирования [231].

Рибозиды и 2'-дезоксирибозиды тризамещенных бензимидазолов (Рисунок 35) были синтезированы в присутствии UP и PNP с использованием уридина и 2'-дезоксидиридина в качестве донора рибозы. Во всех случаях, кроме рибозида и 2'-дезоксидиридина 4,6-дифтор-5-морфолинобензимидазола и рибозида 4,6-дифтор-5-пирролидинобензимидазола, образовались N1- и N3-региоизомеры [260].

Еще одной перспективной модификацией структуры бензимидазола является введение заместителей в C2 положение имидазольного цикла. Ввести объемные заместители ферментативно не представляется возможным из-за особенностей структуры активного центра фермента [261, 262].

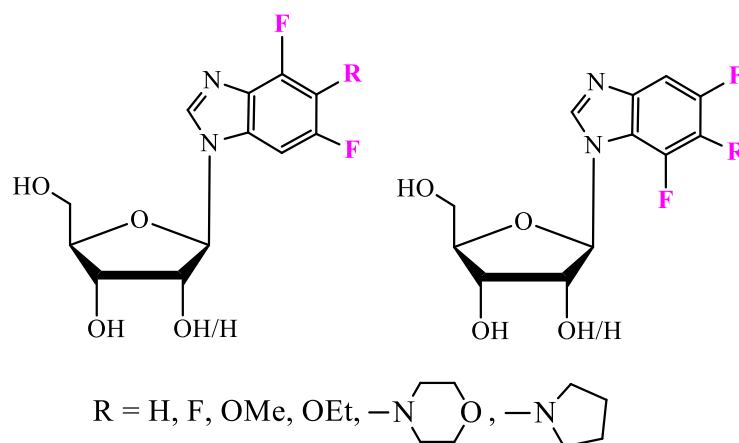


Рисунок 35 – Структуры нуклеозидов тризамещенных бензимидазолов.

Поэтому сначала получают нуклеозиды 2-аминобензимидазола ферментативно, а затем их модифицируют химически введением изопропильной или других алкильных групп. Такие нуклеозиды представляют интерес в качестве аналогов Марибавира **57**.

Известно, что 2-аминобензимидазол и его дизамещенные аналоги являются хорошими субстратом для PNP *E. coli* [258]. В работе [197] были получены нуклеозиды 2-амино-5,6-дифтор-бензимидазола (**58**, **92**) и 2-амино-5-метокси-6-дифтор бензимидазола (**93**, **94**) (Рисунок 36). Соединения **93** и **94** представляют собой смесь N1- и N3-региоизомеров.

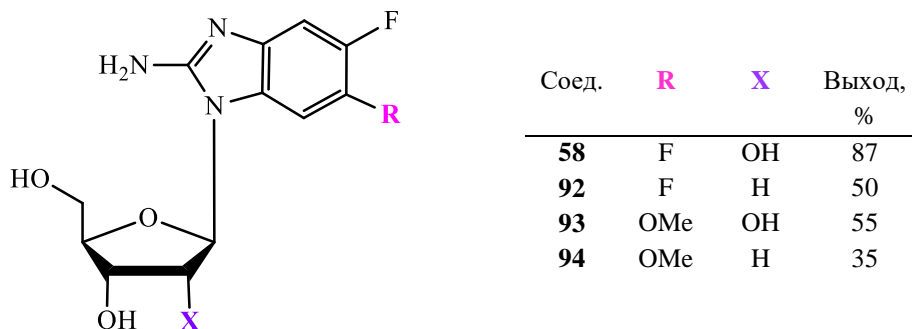


Рисунок 36 – Нуклеозиды замещенного 2-аминобензимидазола.

NDTs и NPs – основные ферменты, используемые для синтеза нуклеозидов замещенного бензимидазола. Существующие ферментативные методы получения новых модифицированных нуклеозидов стремительно развиваются благодаря глубокому изучению структуры активных центров и субстратной специфичности ферментов. Использование новых мутантных форм позволяет получать все большее количество разнообразных соединений.

2 Обсуждение результатов

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.

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

Экспериментальные работы проводились в отношении разработки химической схемы синтеза 3'-дезоксидинозина - донора углеводного фрагмента для осуществления реакции трансгликозилирования гетероциклических оснований двух типов: замещенных аналогов аденина и бензимидазола. После оптимизации условий ферментативных реакций и синтеза целевых соединений проводилось изучение их цитотоксичности и антивирусной активности в экспериментах *in vitro*.

2.1 Синтез 3'-дезоксидрибозидов замещенных аналогов аденина

Синтез 3'-дезоксидрибозидов замещенных аналогов аденина и бензимидазола включал в себя два этапа. Первый этап – получение 3'-дезоксидинозина (донора 3-дезоксидрибозы) химическим способом, второй этап - ферментативный синтез модифицированных 3'-дезоксидрибозидов с использованием 3'-дезоксидинозина и соответствующих гетероциклических оснований.

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.

2.1.1 Синтез 3'-дезоксидинозина

В основе предложенного химического синтеза 3'-дезоксидинозина (3'-dIno) лежит подход, описанный в работе [263], с некоторыми изменениями, что позволило облегчить выделение и очистку промежуточных продуктов, а также увеличить выход продукта (Рисунок 37).

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%.

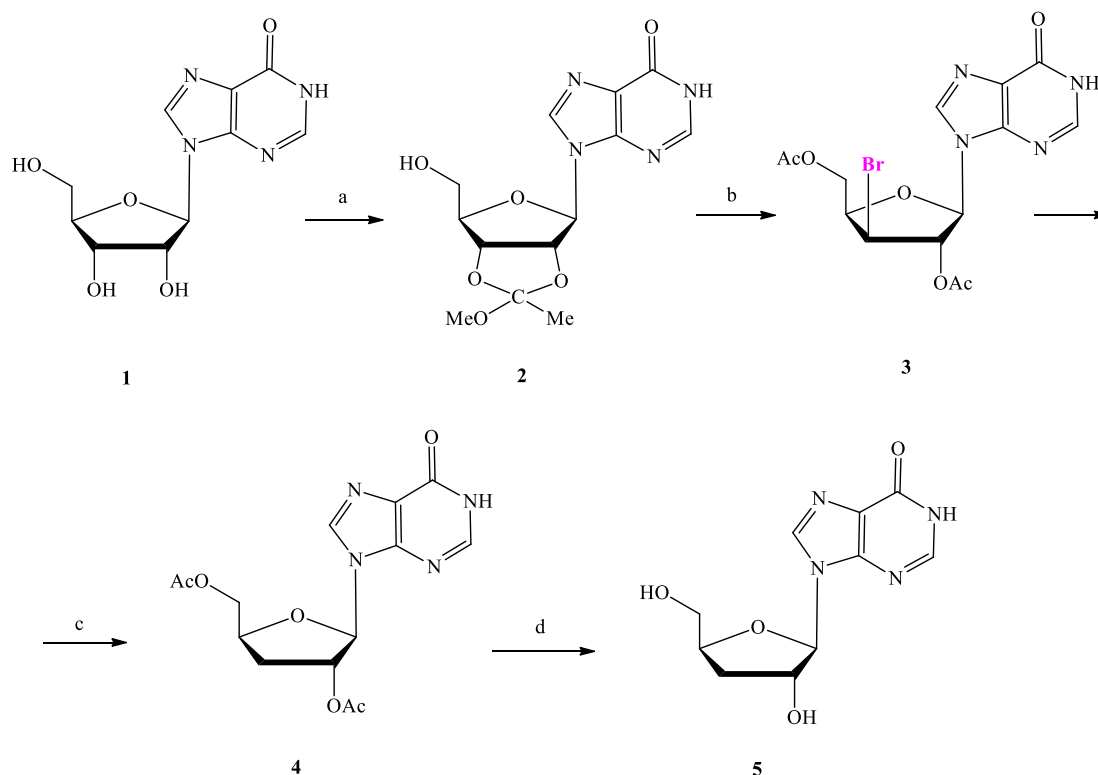


Рисунок 37 – Схема синтеза 3'-дезоксиинозина **5**.

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'-дезоксизин (3), выделенный колоночной хроматографией на силикагеле с выходом 85%.

Соединение **3** было дегалоидировано до 2',5'-диацетил-3'-дезоксиинозина (**4**) радикальным восстановлением (гидрид трибутиллолова 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.

2.1.2 Синтез 2-фторкордицепина с использованием 3'-дезоксиинозина

Наиболее перспективным АДА-устойчивым 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% [128, 138].

Нами предложен и осуществлен ферментативный синтез в присутствии генно-инженерной PNP *E. coli* (Рисунок 38). 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 синтезированный 3'-дезоксиинозин 5.

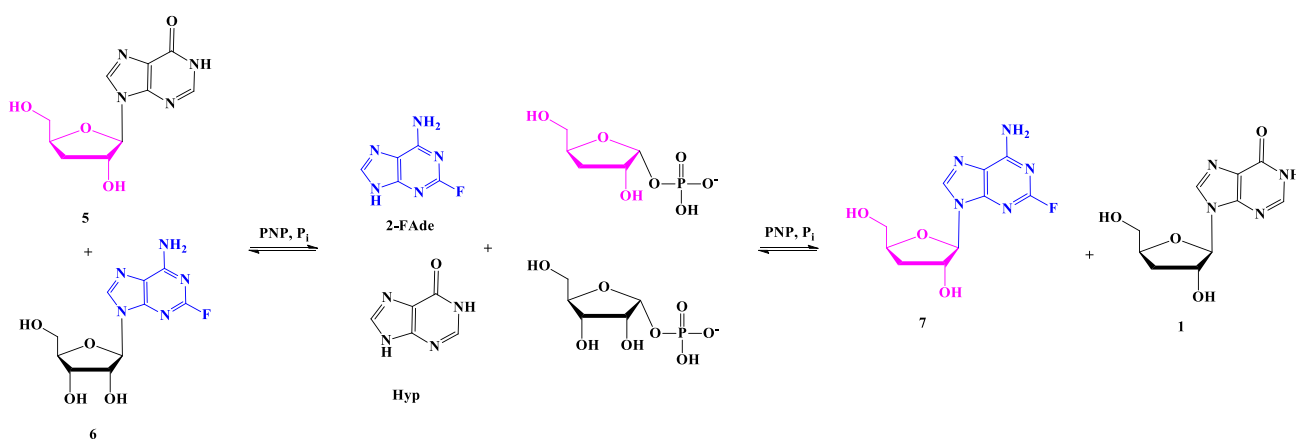


Рисунок 38 – Схема ферментативного синтеза 2-FCord, где Нур – гипоксантин.

На первом этапе подбирали оптимальное соотношение субстратов: 3'-dIno к 2-FAdo (Рисунок 39) и концентрацию PNP (Рисунок 40). По данным, представленным на Рисунках 39 и 40, 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.

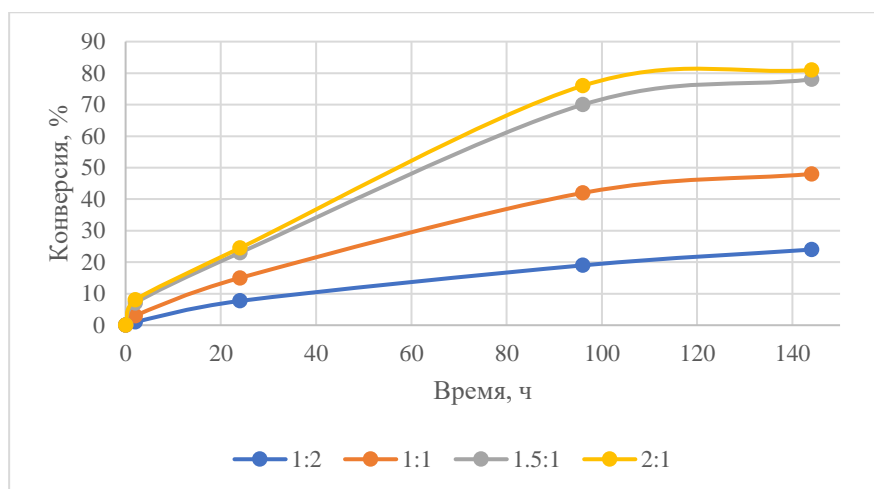


Рисунок 39 – Динамика накопления 2-FCord в зависимости от соотношения 3'-dIno к 2-FAdo. Условия: объем реакции 1 мл, 50°C, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP 2.3 е.а./мл.

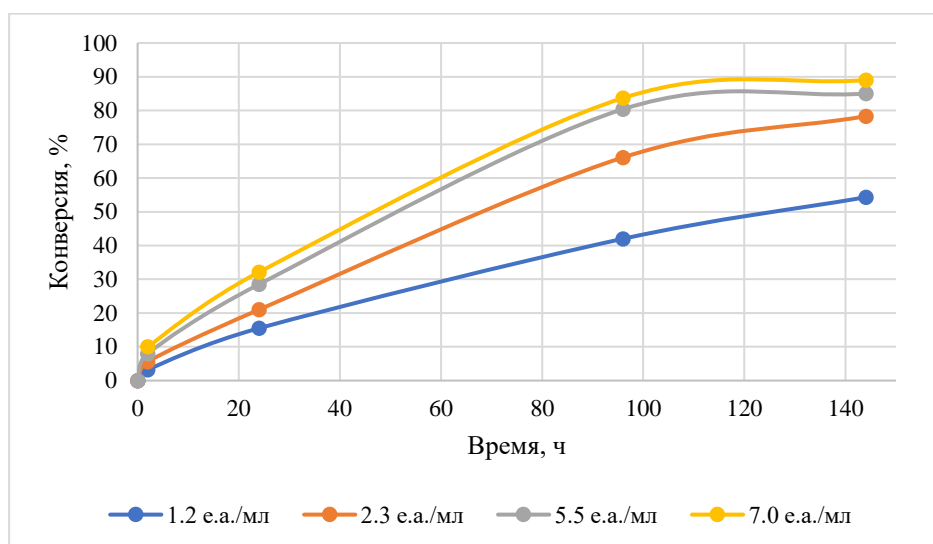


Рисунок 40 – Динамика накопления 2-FCord в зависимости от концентрации PNP.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °C, 3'-dIno к 2-FAdo – 1.5:1, 2 mM калий-фосфатный буфер (pH 7).

После оптимизации основных условий провели синтез 2-FCord (Рисунок 41). 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.

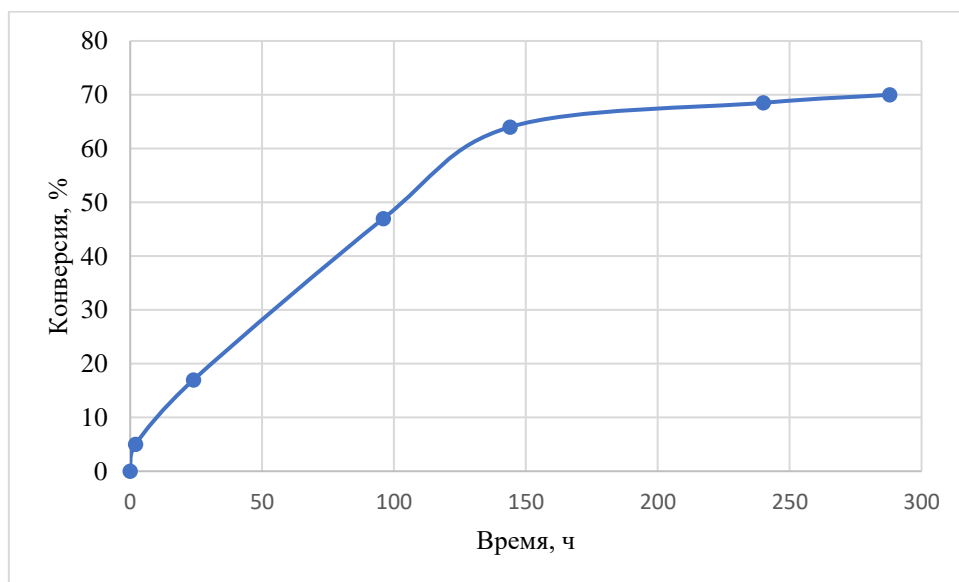


Рисунок 41 – Динамика накопления 2-FCord.

Условия: объем реакции 315 мл, 50 °C, 2-3'-dIno к 2-FAdo – 1.5:1, 2 mM калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP 17.2 е.а./мл.

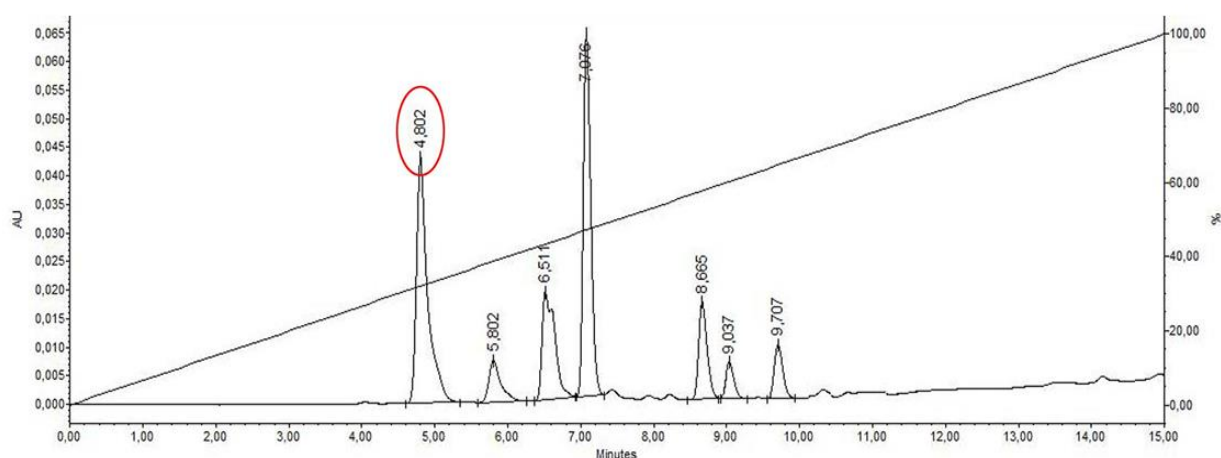
2.1.3 Изучение механизма образования примесного нуклеозида

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.

Как видно по профилю ВЭЖХ на Рисунке 42, в реакционной смеси через 14 дней после начала реакции был обнаружен нуклеозид неизвестной структуры (RT 4.802 мин) с молекулярным ионом $[M+H]^+ = 241.0923$ (Рисунок 43).

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.

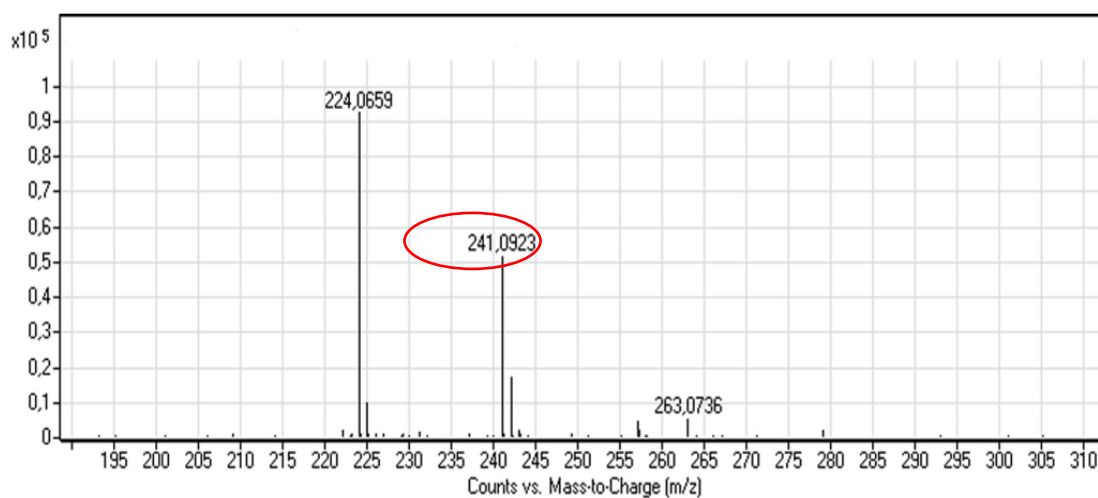
Через 6 дней после начала реакции смесь содержала уже 30% неизвестного нуклеозида (**8**). Этот процент не изменился в ходе дальнейшей инкубации. Неизвестное соединение **8** выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 17% (10.6 мг) и охарактеризовали с помощью масс-спектрометрии (Рисунок 43).



Соединение	RT (мин)	Площадь пика, %
Неизвестный нуклеозид 8	4.802	31.39
Hyp	5.802	5.45
Ino	6.511	15.50
3'-dIno	7.076	30.40
2-FAdo	8.655	8.93
2-FAdo	9.037	3.23
2-FCord	9.707	5.10

Рисунок 42 – Профиль ВЭЖХ реакционной смеси при синтезе 2-фторкордицепина.

Условия: 3'-dIno к 2-FAdo – 1.5:1, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), 100 мл, 50 °C, PNP 5.80 е.а./мл.



$[M+H]^+$ найдено (вычислено, брутто-формула)	$[M+Na]^+$ найдено (вычислено, брутто-формула)
241.0923 (241.0937, $C_9H_{13}N_4O_4$)	263.0739 (263.0756, $C_9H_{12}N_4NaO_4$)

Рисунок 43 – Масс-спектр и структура неизвестного нуклеозида **8**.

Расшифровка ЯМР-спектров (1H , ^{13}C , COSY и HSQC, HMBC [$^1H,^{13}C$], [$^1H,^{15}N$]) примесного нуклеозида позволила определить его структуру (Рисунок 44).

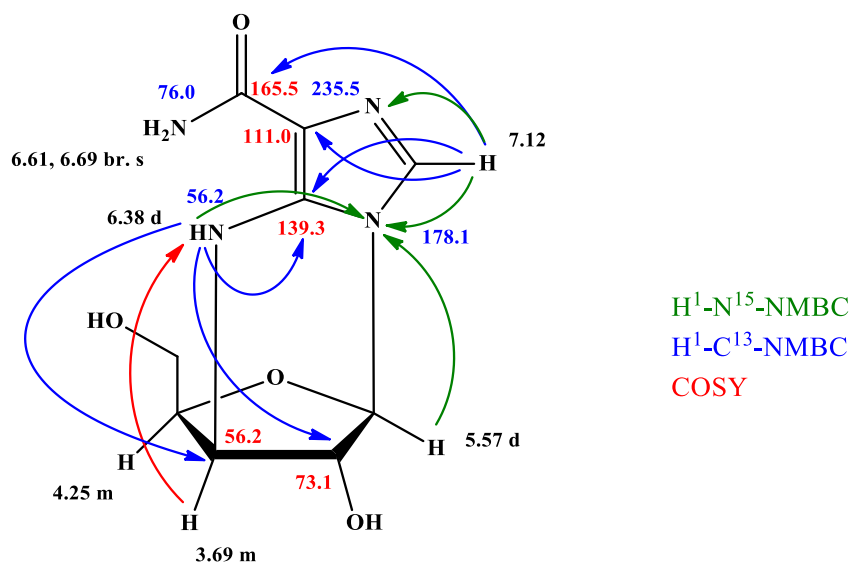
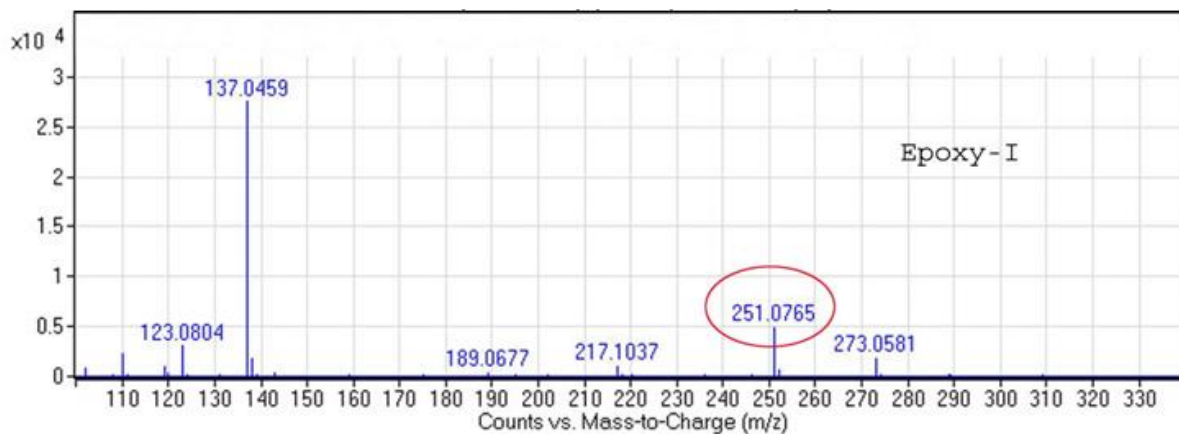


Рисунок 44 – Структура нуклеозида **8** и схема взаимодействия некоторых ядер.

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'-дезоксиинозина 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 $[M+H]^+ = 251.0765$ (Рисунок 45). 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 46).



$[M+H]^+$ найдено (вычислено, брутто-
формула)

251.0765 (251.0702, $C_{10}H_{10}N_4O_4$)

$[M+Na]^+$ найдено (вычислено, брутто-
формула)

273.0581 (273.0210, $C_9H_{12}N_4NaO_4$)

Рисунок 45 – Масс-спектр примесного соединения в образце 3'-dIno.

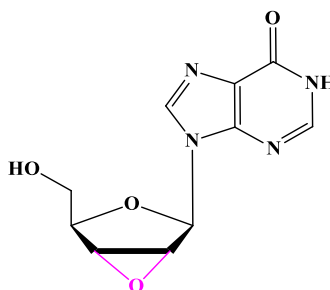


Рисунок 46 – Структура нуклеозида **9**.

Мы предположили, что соединение **9** образуется на стадии дегалоидирования защищенного нуклеозида **3**. Чтобы проверить эту гипотезу, мы заменили обработку соединения **3** гидридом трибутиллола на дегалоидирование с использованием H_2/Pd (Рисунок 47).

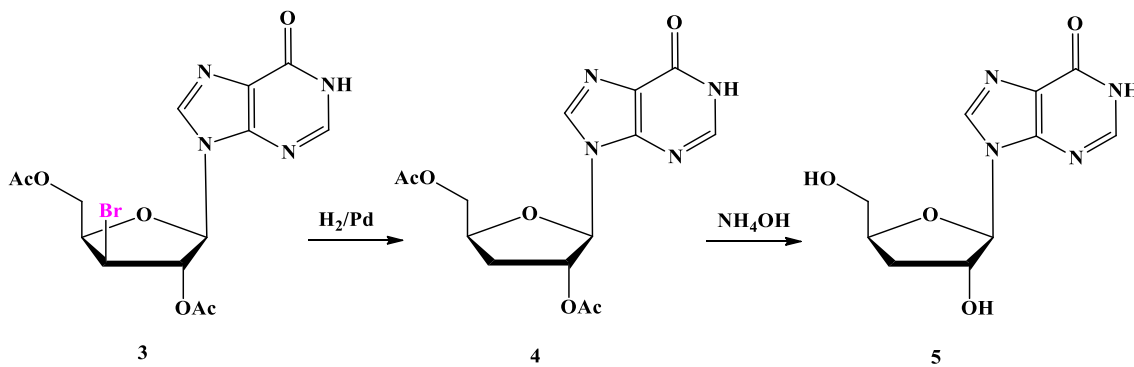


Рисунок 47 – Стадия каталитического гидрирования с последующим снятием ацетильных групп в синтезе 3'-dIno.

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 [264, 265]. Однако реакция протекала в более жестких условиях – 0.1M NaOH, 80 °C.

Мы решили исследовать реакцию образования нуклеозида **8** из эпоксида **9**. Соединение **9** получили обработкой 2',5'-диацетил-3'-дезоксигуанидина **3** водно-метанольным раствором NH_4OH с последующими упариванием и кристаллизацией с выходом 48% (Рисунок 48).

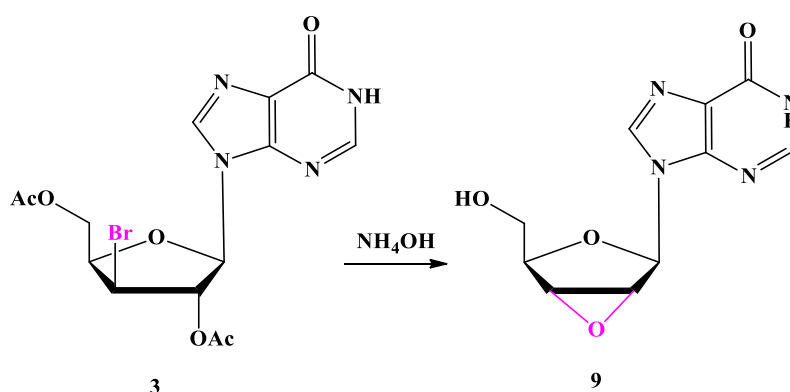


Рисунок 48 – Синтез соединения **9**.

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, 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) (Рисунок 49).

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.

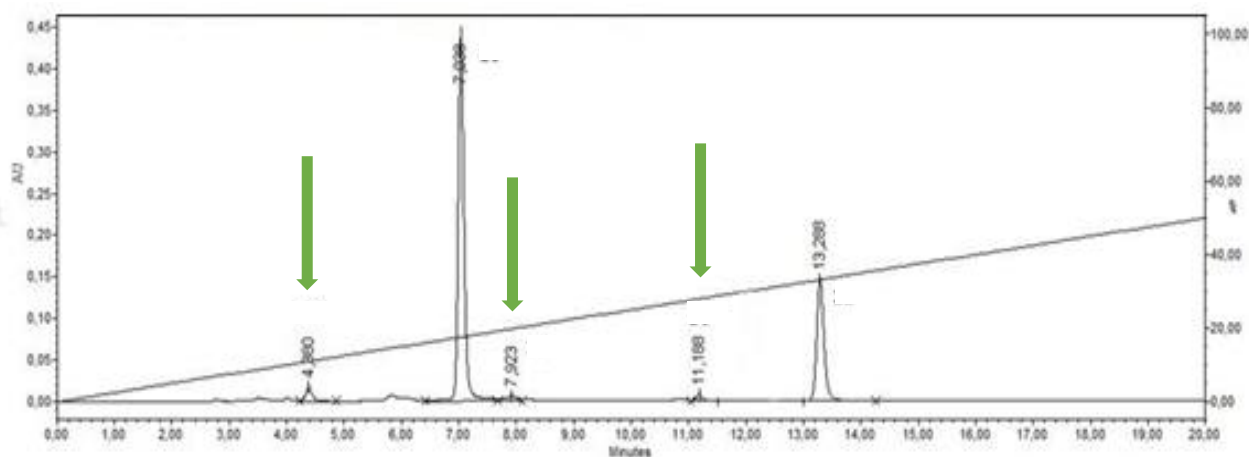


Рисунок 49 – Профиль ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при гидролизе соединения **9** через 96 ч (детекция при 260 нм) в 5 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.0).

Мы решили, что самый простой способ увеличить содержание промежуточных продуктов **10**, **11** и **12** – использовать D₂O вместо H₂O. ВЭЖХ профиль реакционной смеси (5 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.0, 50 °C, D₂O) показан на Рисунке 50. Наше предположение полностью подтвердилось: количество промежуточных нуклеозидов в реакционной смеси увеличилось с 3 - 5% до 15%.

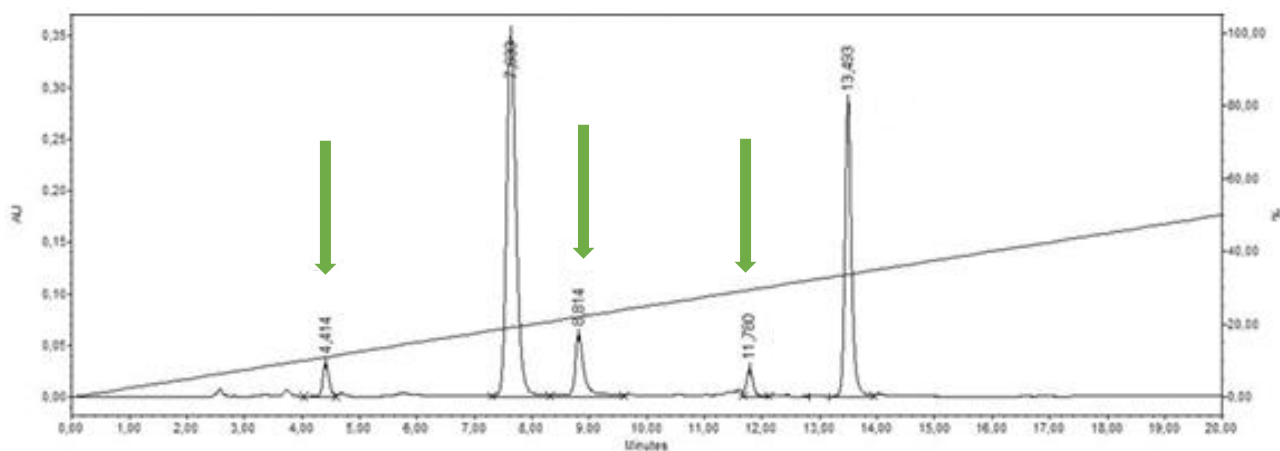


Рисунок 50 – Профиль ВЭЖХ реакционной смеси, обнаруженной при гидролизе соединения **9** через 96 ч (детекция при 260 нм) в D₂O.

Однако при pH 7.0 образование ациклического соединения **8** происходило довольно быстро. Была изучена зависимость скорости образования нуклеозида **8** от pH реакционной смеси в диапазоне pH от 3 до 11 (Рисунок 51).

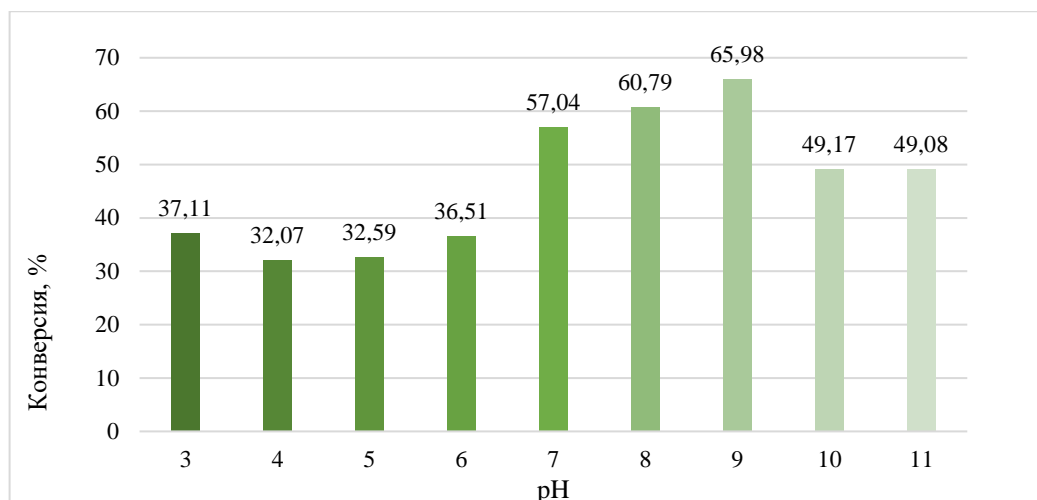


Рисунок 51 – Зависимость скорости образования нуклеозида **8** от pH реакционной смеси.

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 52, и охарактеризовали их с помощью ЯМР-спектроскопии.

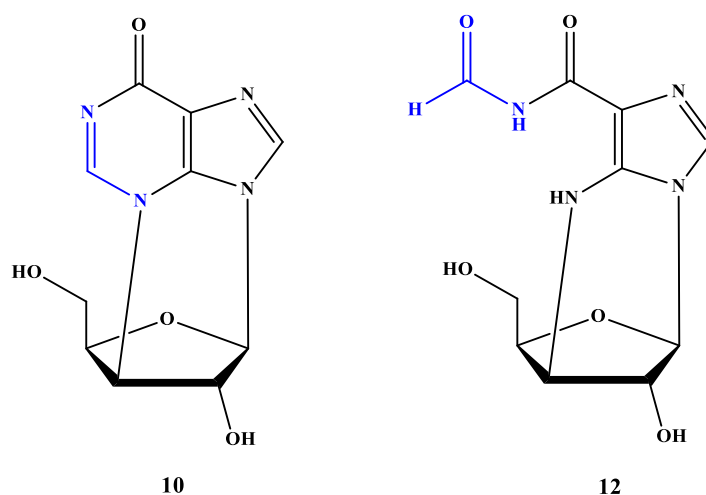


Рисунок 52 – Структуры промежуточных соединений **10** и **12**.

Чтобы определить последовательность превращений, мы провели три реакции: гидролиз соединений **9**, **10** и **12**. При этом исследовали изменение УФ-спектров реакционных смесей при инкубации водных растворов от 0 до 312 ч (Рисунки 53b-с). Каждый из выделенных нуклеозидов имеет свой максимум поглощения: нуклеозид **8** - 276, **9** - 247, **10** - 254 и **12** - 310 нм (Рисунок 53a).

Набор УФ-спектров для гидролиза **9** (Рисунок 53b) сложно интерпретируется из-за наложения спектров отдельных компонентов. Тем не менее, видно, что через 48 часов (пурпурная линия) образуется некоторое количество **10** (плечо при 270 нм) и **12** (макс. 310 нм).

Наиболее информативный набор УФ-спектров получается при гидролизе соединения **10** (Рисунок 53c). Через 24 часа после начала реакции образуется заметное количество **12** (λ_{max} 310 нм) (синяя линия). Поглощение при 254 нм (λ_{max} соединения **10**) уменьшается, и появляется дополнительный максимум при 274 нм (λ_{max} соединения **8**). Через 48 ч количество **12** и **8** увеличиваются, а количество **10** незначительно. Через 96 ч количество **12** уменьшается, а количество **8** продолжает увеличиваться. Через 144 ч (фиолетовая линия) количество **12** минимально - почти все соединение **12** преобразуется в **8**.

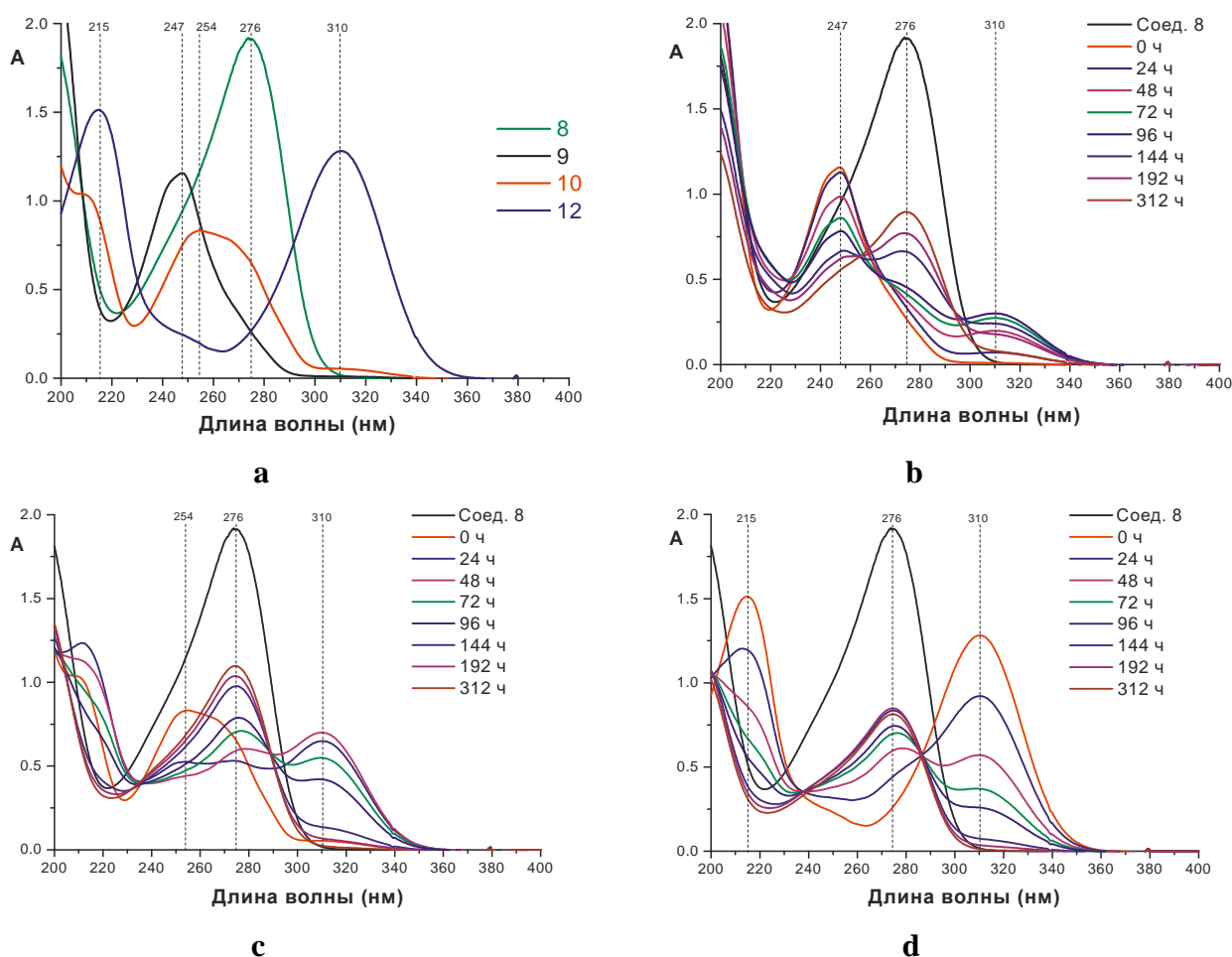


Рисунок 53 – **a** - УФ-спектры соединений **8**, **9**, **10** и **12** (D_2O , pH 4.1); **b** - изменение УФ-спектров при гидролизе **9**; **c** - изменение УФ-спектров при гидролизе **10**; **d** - изменение УФ-спектров при гидролизе **12**.

Последний набор спектров был получен при гидролизе **12** (Рисунок 53d). Поглощение при 310 нм постоянно уменьшается, в то время как поглощение при 274 нм увеличивается. Это

подтверждает то, что **12** является прямым предшественником **8**, и достигается трансформация **9**→**10**→**12**→**8**.

Анализ динамики спектров позволил определить цепь превращения нуклеозида **9** и предположить возможный механизм образования нуклеозида **8** в D₂O (Рисунок 54).

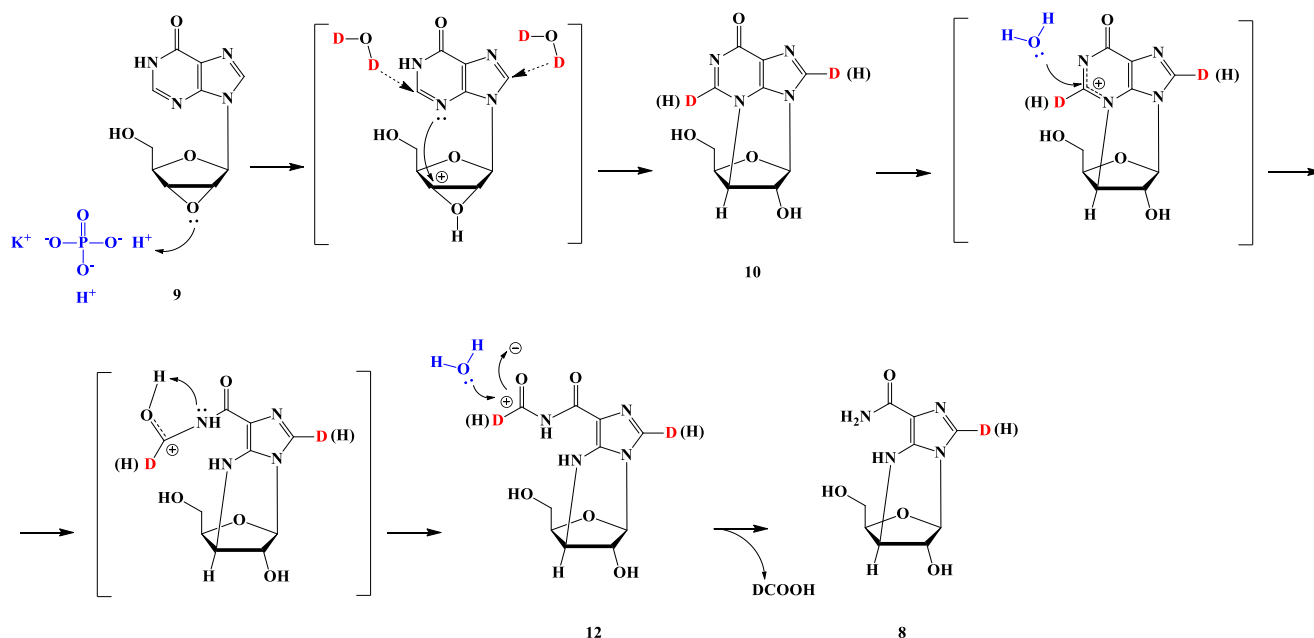


Рисунок 54 – Возможный механизм гидролиза эпоксида **9** с переходными состояниями и внутримолекулярными перегруппировками.

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'-дезоксидинозина и 2-фторадеозина в присутствии соединений **8**, **9**, **10** и **12** (Рисунок 54).

Судя по результатам, представленным на Рисунке 55, ни соединение **8**, ни соединения, образованные из него, не влияют на активность PNP *E. coli*.

В общем, причина замедления реакции трансгликозилирования 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**.

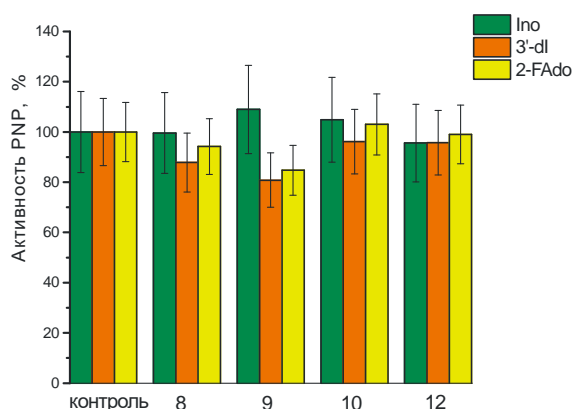


Рисунок 55 – Активность PNP при фосфорилизе Ino (зеленый), 3'-dIno (оранжевый) и 2-FAdo (желтый) в присутствии соединений **8**, **9**, **10** и **12**.

Условия: объем реакции 0.1 мл, Т комн., 1 мин, 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), концентрация тестируемого соединения (**8**, **9**, **10** или **12**) 0.5 мМ, концентрация нуклеозида (Ino, 3'-dIno или 2-FAdo) 0.5 мМ, PNP: 0.14 е.а./мл для Ino, 1400 е.а./мл для 3'-dIno или 14 е.а./мл для 2-FAdo.

3'-Дезоксиинозин, полученный с помощью каталитического дегалоидирования, был использован в синтезе 2-фторкордицепина (Рисунок 56).

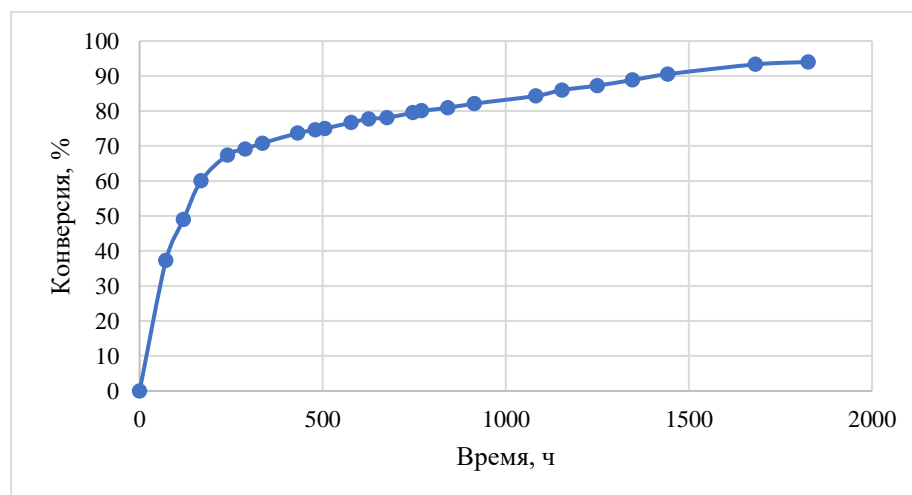


Рисунок 56 – Динамика накопления 2-FAdo.

Условия: объем реакции 100 мл, 50°C, 3'-dIno к 2-FAdo – 1.5:1, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP 19 е.а./мл.

По данным ВЭЖХ реакционная смесь не содержала примесь **8**. Конверсия 2-FAdo в продукт **7** составила 94% за 76 дней. 2-FAdo выделили с помощью колоночной обращенно-фазовой хроматографии с выходом 78%.

Результаты исследований, описанных в разделах **2.1.1** – **2.1.3**, опубликованы в работах:

1. **Denisova A. O.**, Tokunova Yu. 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. // Synthesis 2017. V. 49. P. 4853–4860. doi: 10.1055/s-0036-1590804.

2. Kayushin A. L., Tokunova Yu. A., Fateev I. V., **Arnautova A.O.**, Berzina M. Ya., Paramonov A. S., Lutonina O. I., Dorofeeva E. V., Antonov K. V., Esipov R. S., Mikhailopulo I. A., Miroshnikov A. I., Konstantinova I. D. Radical dehalogenation and purine nucleoside phosphorylase *E. coli*: How does an admixture of 2', 3'-anhydroinosine hinder 2-fluoro-cordycepin synthesis //Biomolecules 2021. V. 11. P. 539. doi: 10.3390/biom11040539

2.1.4 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 [152, 266 - 268]. 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 е.а./мл). Очевидно, что скорость образования 2-фторкордицепина существенно зависела от количества образовавшегося 1-альфа фосфата 3-дезоксирибозы (1-P-3-dRib) при фосфорилизе 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-FAdo **6** и синтезированный нами 1-P-3-dRib (**13**) [269] (Рисунок 57).

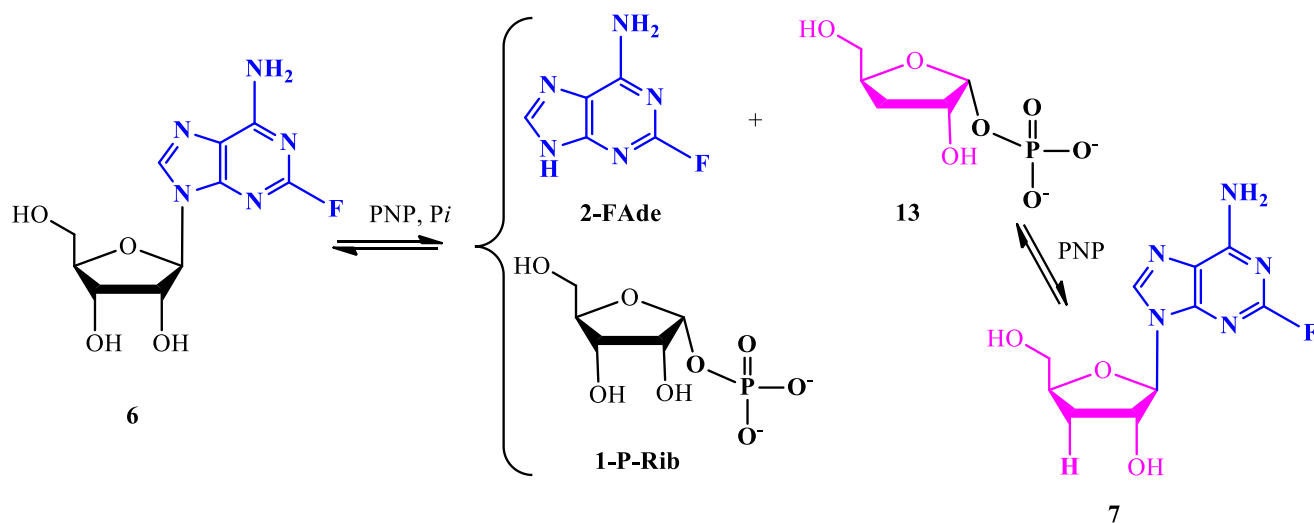


Рисунок 57 – Схема синтеза 2-FCord.

Для достижения максимальной конверсии 2-FAdo в 2-FCord необходимо было оптимизировать соотношение исходных субстратов, pH, температуру и концентрацию PNP (Рисунки 58 - 60).

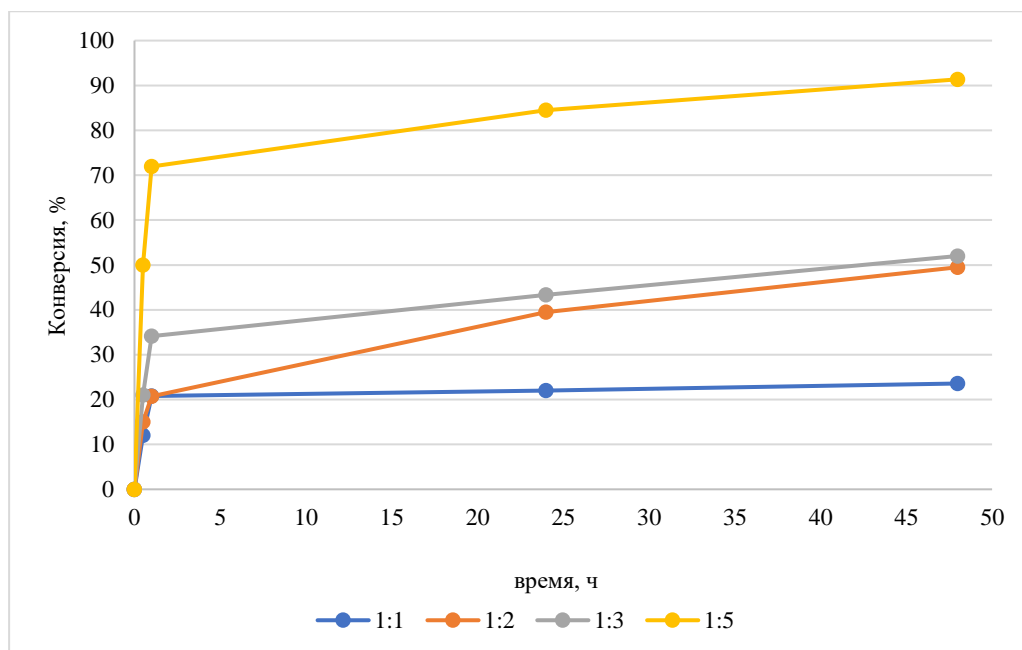


Рисунок 58 – Динамика накопления соединения **7** в зависимости от соотношения 2-FAdo к 1-P-3-dRib.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °C, 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 7.0), PNP 7 е.а./мл.

Из представленных на диаграмме данных (Рисунок 58) видно, что значение конверсии 2-FAdo **6** в 2-FCord **7** прямо пропорционально мольному избытку 1-P-3-dRib **13** в реакционной смеси. Наибольшее значение конверсии (91%) достигается при соотношении 2-FAdo к 1-P-3-dRib – 1:5 за 48 часов, но для дальнейших реакций выбрали соотношение 1:3 с конверсией 52%.

Результаты экспериментов по оптимизации pH в диапазоне значений 7.0 - 11.0 представлены на Рисунке 59. Оказалось, что изменение pH калий-фосфатного буфера с 7.0 до 8.0 существенно влияло на увеличение конверсии – содержание 2-FCord выросло в 2 раза с 43.2% до 89.67%. Дальнейшее увеличение pH приводило к снижению конверсии.

На Рисунке 60 показана зависимость конверсии 2-FAdo в соединение **7** от температуры реакционной смеси в диапазоне 25 °C ÷ 60 °C. Оптимальные температуры для проведения ферментативной реакции 40 ÷ 50 °C.

На Рисунке 61 представлена зависимость конверсии 2-FAdo в 2-FCord от концентрации PNP. Видно, что при концентрациях фермента 7 е.а./мл, 10.5 е.а./мл и 21 е.а./мл значения конверсии близкие и одинаково высокие (97.23% – 99.1%). Снижение концентрации PNP до 0.7 е.а./мл приводит к уменьшению значения конверсии до 69.28%.

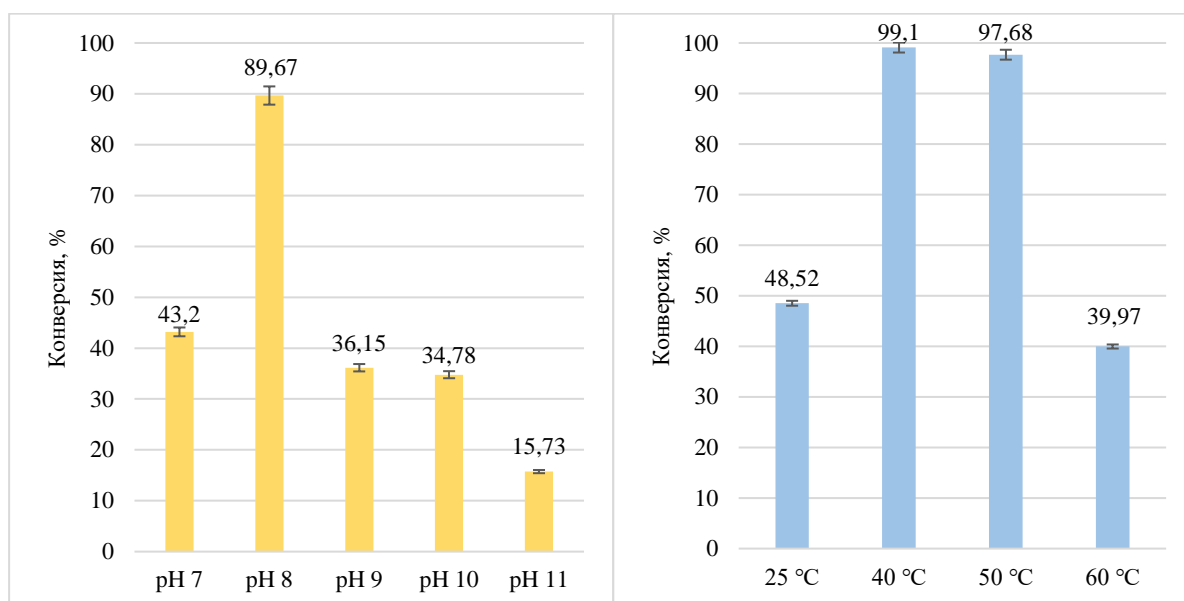


Рисунок 59 – Зависимость конверсии 2-FAdo в нуклеозид **7** (168 ч) от значения pH калий-фосфатного буфера.

Условия: объем реакции 1 мл, 50°C, 2-F-Ado:1-P-3-dRib – 1:3, 10 mM калий-фосфатный буфер, PNP 7 е.а./мл.

Рисунок 60 – Зависимость конверсии 2-FAdo в соединение **7** (120 ч) от температуры реакционной смеси.

Условия: объем реакции 1 мл, 2-F-Ado:1-P-3-dRib – 1:3, 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 8.0), PNP 7 е.а./мл.

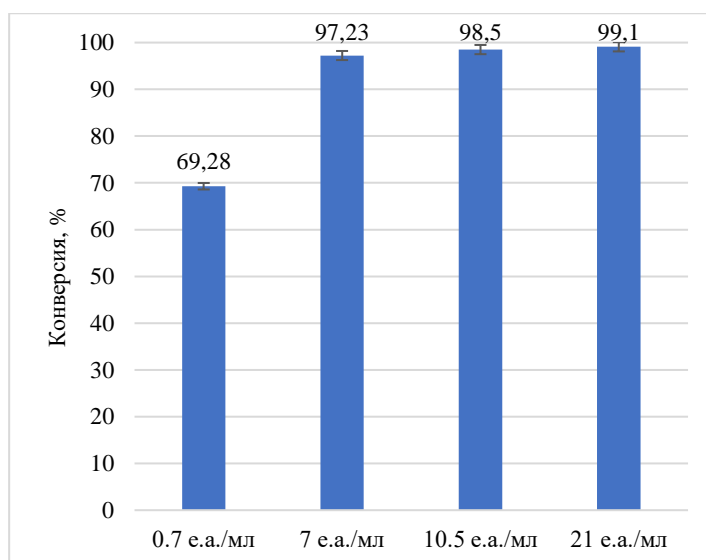


Рисунок 61 – Зависимость конверсии 2-FAdo в 2-FCord (120 ч) от концентрации PNP.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °C, 2-F-Ado:1-P-3-dRib – 1:3, 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 8.0).

После оптимизации условий был синтезирован 2-FCord. Динамика накопления нуклеозида **7** показана на Рисунке 62: конверсия 84.72% была достигнута за 72 часа. Продукт **7** был выделен колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 66%.

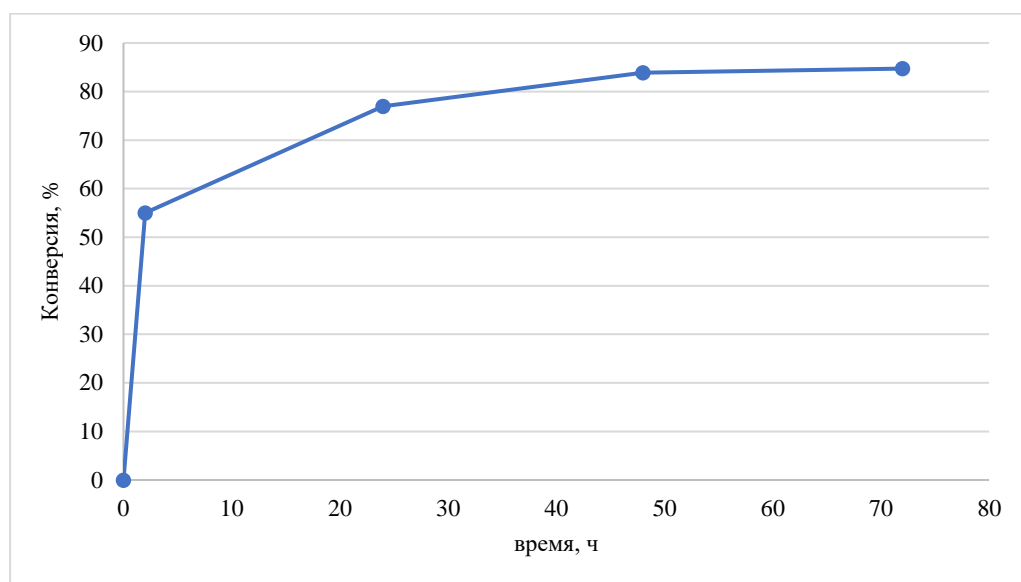


Рисунок 62 – Динамика накопления 2-F-3'-dAdo.

Условия: объем реакции 100 мл, 50 °С, 2-F-Ado:1-P-3-dRib - 1:3, 10 мМ калий-фосфатный буфер (рН 8.0), PNP – 10.5 е.а/мл.

2.1.5 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 [270] с некоторыми изменениями (Рисунок 63).

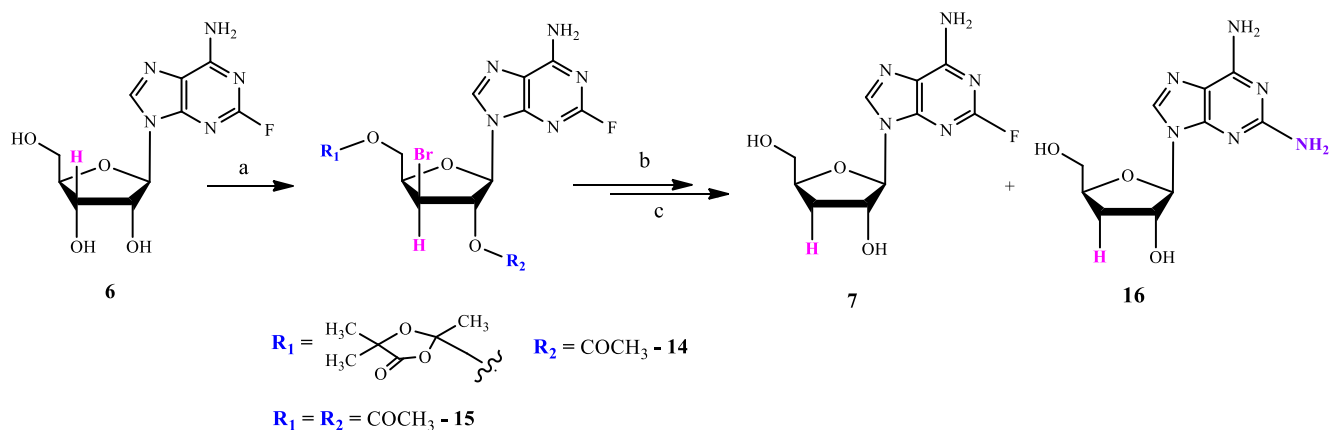


Рисунок 63 – Схема химического синтеза 2-FCord.

Условия и реагенты: (a) – α-ацетоксиизобутирилбромид/MeCN; (b) – H₂/Pd; (c) – NH₃, CH₃OH.

В качестве исходного соединения выбрали полученный нами ранее 2-FAdo (**6**) [271], 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 дегалоидирование интермедиатов **14** и **15** гидрированием на H_2/Pd и без промежуточного выделения полупродуктов реакцию смесь обрабатывали водно-метанольным раствором аммиака. В результате получили смесь двух нуклеозидов: целевого - 2-FCord и побочного - 2-амино-3'-дезоксиаденозина (**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'-дезоксиаденозина с выходом - 18% [138], синтез 2-FCord из кордицепина с выходом - 2% [128]. 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], [1H , ^{15}N]).

Результаты исследований, описанных в разделах 2.1.4 и 2.1.5, опубликованы в работе - **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. Eletskaya, 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.

2.1.6 Ферментативный синтез 2-хлоркордицепина

Еще один структурный аналог кордицепина, 2-хлоркордицепин (2-ClCord) (**17**), был получен реакцией трансгликозилирования в присутствии PNP *E. coli* (Рисунок 64), аналогично 2-FCord **7** (раздел 2.1.2). Структура 2-ClCord **17** похожа на структуру кладрибина (2-хлор-2'-дезоксиаденозина) препарата, используемого в терапии волосатоклеточного лейкоза и рассеянного склероза.

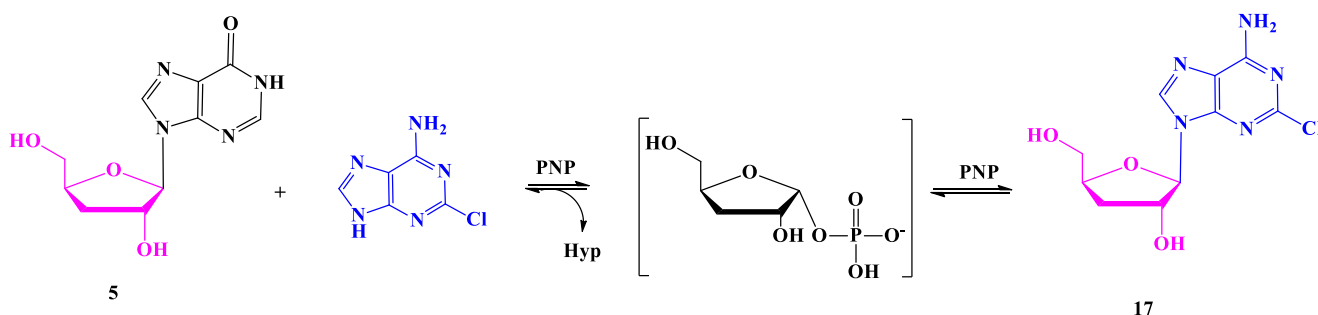


Рисунок 64 – Схема синтеза 2-ClCord.

В качестве донора 3'-дезоксирибозы в ферментативной реакции использовали 3'-dIno **5**, в качестве акцептора - 2-хлораденин (2-ClAde). В результате серии экспериментов были оптимизированы условия ферментативной реакции: соотношение 2-ClAde к 3'-dIno, pH реакционной смеси, температура, концентрация PNP (Рисунки 65 - 68).

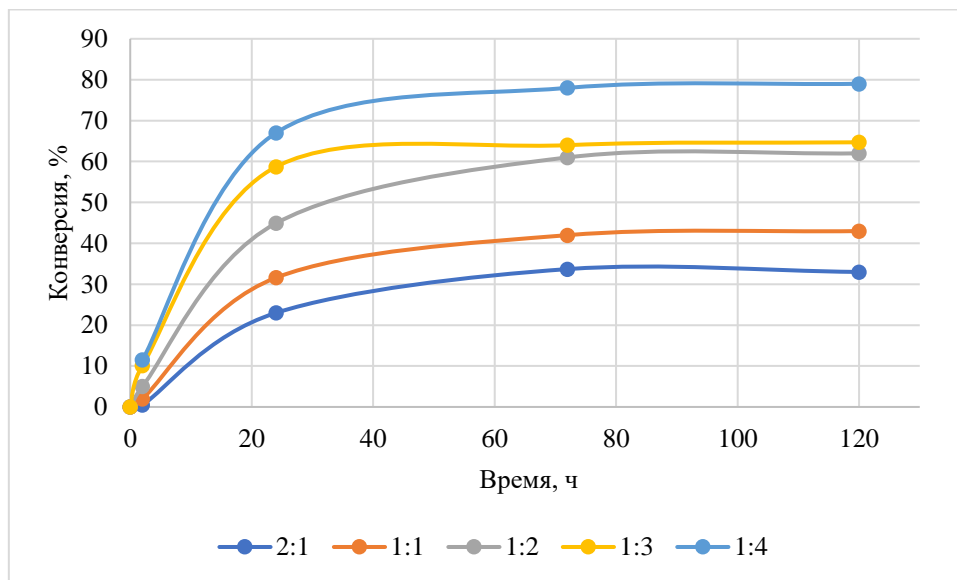


Рисунок 65 – Динамика накопления **17** в зависимости от соотношения 2-ClAde к 3'-dIno.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP 1.56 е.а./мл.

Наибольшее значение конверсии соответствующего субстрата в продукт **17** достигается при 4-кратном избытке 3'-dIno (79%), наименьшее значение – при 2-кратном избытке 2-ClAde (33%) (Рисунок 65). Для дальнейших исследований выбрали соотношение 2-ClAde к 3'-dIno - 1:3, для синтеза - 1:1.5 (с целью экономии исходного 3'-dIno).

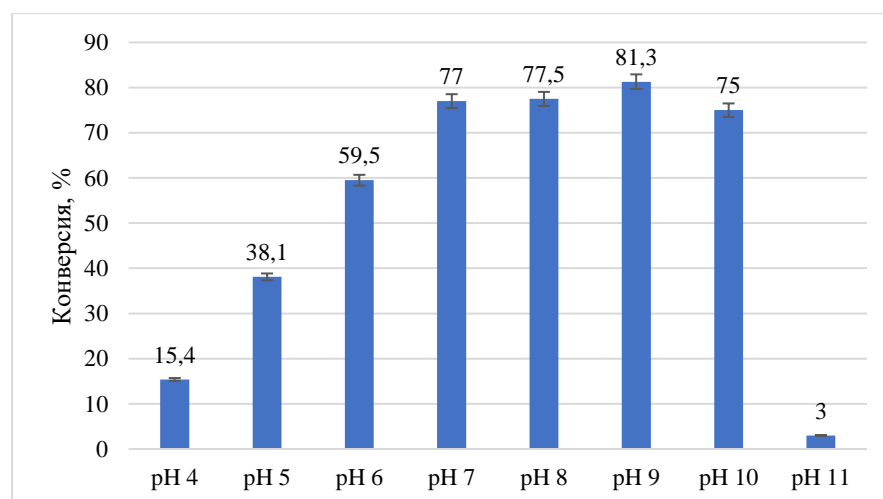


Рисунок 66 – Зависимость конверсии 2-ClAde в нуклеозид **7** (168 ч) от значения pH калий-фосфатного буфера.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °С, 2-ClAde:3'-dIno – 1:3, 2 мМ калий-фосфатный буфер, PNP 1.56 е.а./мл.

Эксперименты по определению оптимального pH калий-фосфатного буфера проводили в диапазоне значений pH 4 – 11 (Рисунок 66). Видно, при pH 7 - 10 конверсия одинаково высокая (77-81.3%). Для проведения дальнейших исследований выбрали pH 7.

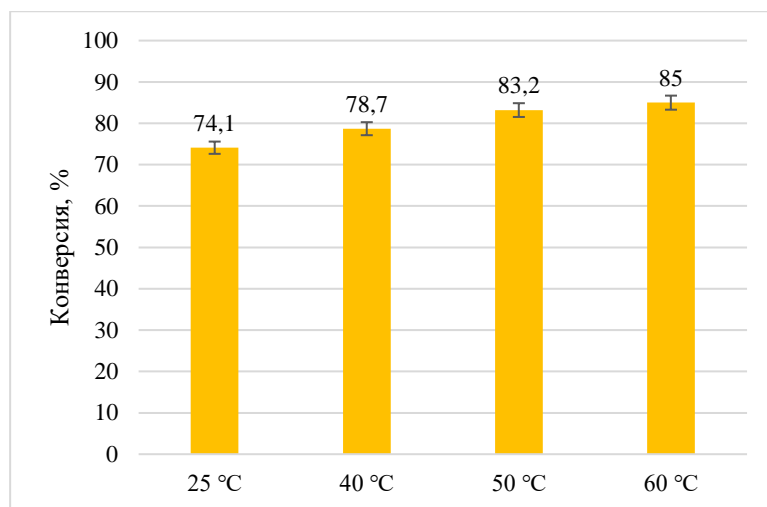


Рисунок 67 – Зависимость конверсии 2-ClAde в нуклеозид **7** (168 ч) от температуры реакционной смеси.

Условия: объем реакции 1 мл, 2-ClAde:3'-dIno – 1:3, 2 mM калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP 1.56 е.а./мл.

Как видно на диаграмме (Рисунок 67), конверсия 2-ClAde в 2-ClCord незначительно зависит от температуры в диапазоне 25÷60 °C. Известно, что 2-ClAde лучше растворяется при 50 - 60 °C, поэтому для тестовых реакций и синтеза выбрали температуру 50 °C.

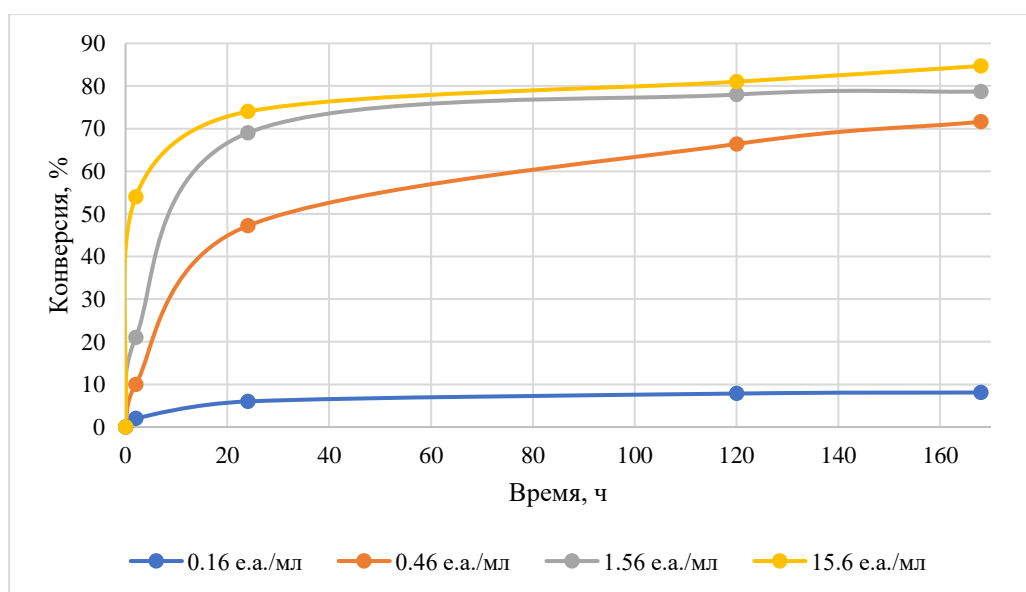


Рисунок 68 – Динамика накопления нуклеозида **17** в зависимости от концентрации PNP.

Условия: объем реакции 1 мл, 2-ClAde:3'-dIno – 1:3, 50 °C, 2 mM калий-фосфатный буфер (pH 7).

По кривым на Рисунке 68 видно, что разница между значениями конверсий 2-ClAde в 2-ClCord при PNP 15.6 е.а./мл (84.7%) и 1.56 е.а./мл (78.7%) небольшая, а скорость реакций сопоставима. Для синтеза 2-ClCord выбрали концентрацию PNP - 2 е.а./мл (Рисунок 69).

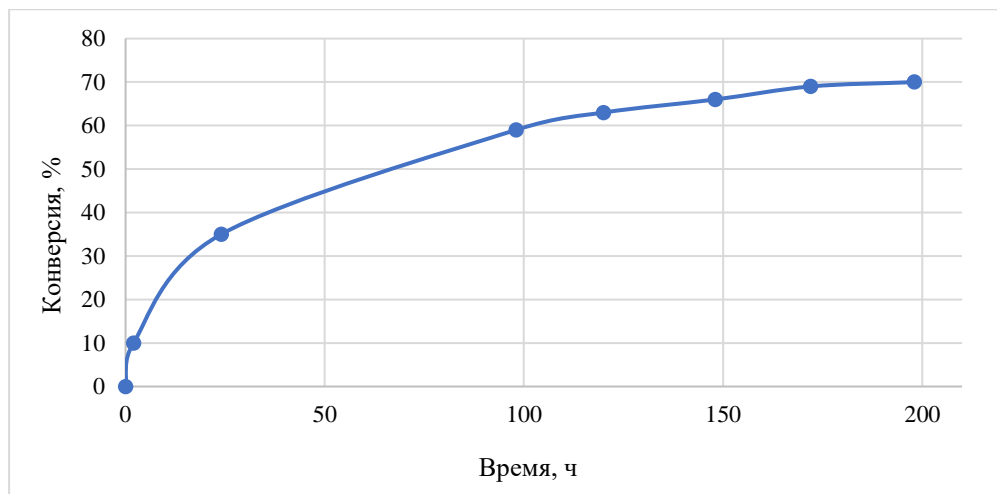


Рисунок 69 – Динамика накопления 2-хлоркордицепина.

Условия: объем реакции 660 мл, 2-ClAde:3'-dIno – 1:1.5, 50°C, 2 mM калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP - 2 ед/мл.

За 192 ч конверсия 2-ClAde в 2-ClCord составила 70%. Целевое соединение **17** выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 40% и охарактеризовали с помощью масс-спектрометрии и ЯМР-спектрометрии.

Результаты исследования, описанного в разделе **2.1.6**, опубликованы в работе – **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-Fluorocordycepins // Synthesis, 2017, V. 49. doi: 10.1055/s-0036-1590804.

2.1.7 Синтез 2-хлор-6-N-замещенных аналогов кордицепина

Известно, что нуклеозиды, в N6-положение которых введен остаток аминокислоты, могут оказывать влияние на внутриклеточный метаболизм модифицированного нуклеозида и его биологическую активность [272, 273]. Нами получены 2-хлор-6-N-замещенные аналоги кордицепина – 2-хлор-6-N-[L-сериламидо]-кордицепин (**18**) и 2-хлор-6-N-[D-сериламидо]-кордицепин (**19**) (Рисунок 70).

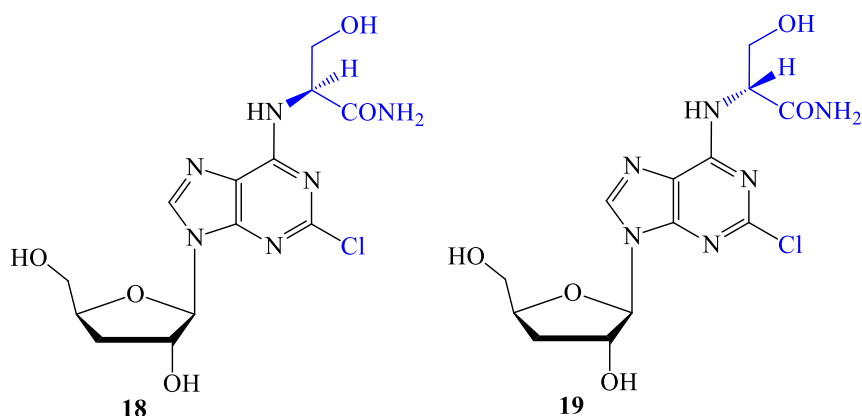


Рисунок 70 – 2-Хлор-6-N-замещенные аналоги кордицепина **18** и **19**.

Ферментативный синтез осуществляли аналогично синтезу 2-ClCord и 2-FCord. В реакции участвовали 3'-dIno, соответствующие основания - 2-хлор-6-N-[L-сериламидо]-9-β-D-рибофуранозиладенин (**18a**) и 2-хлор-6-N-[D-сериламидо]-9-β-D-рибофуранозил-аденин (**19a**), в присутствии PNP *E. coli*.

Результаты серии экспериментов по подбору оптимального соотношения исходных субстратов для синтеза L-серинового аналога **18** представлены на Рисунке 71. Видно, что в реакциях с 2- и 3-кратным избытком 3'-dIno достигаются одинаково высокие значения конверсии (78-79%). Для дальнейших исследований выбрали оптимальное соотношение **18a** к 3'-dIno – 2:1.

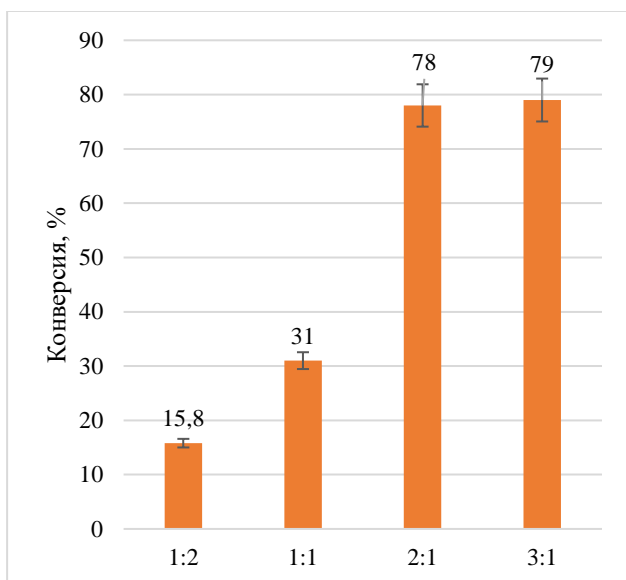


Рисунок 71 – Зависимость конверсии **18a** в **18** от соотношения основания **18a** к 3'-dIno.

Условия: объем реакции 1 мл, 50°C, 2 mM калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP 3 е.а./мл.

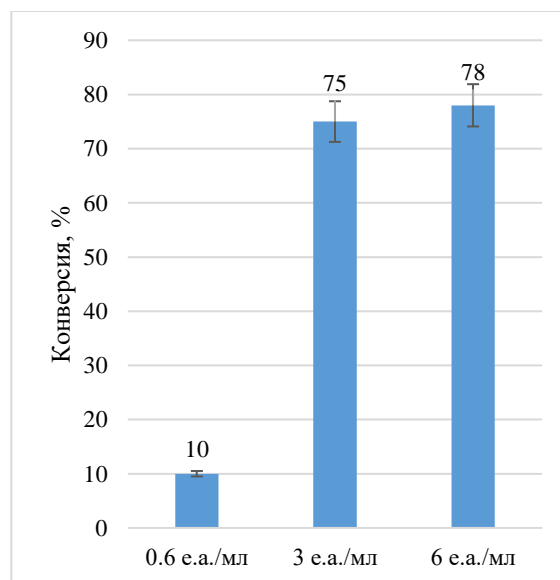


Рисунок 72 – Зависимость конверсии **18a** в **18** от концентрации PNP.

Условия: объем реакции 1 мл, **18a**:3'-dIno - 1:3, 50 °C, 2 mM калий-фосфатный буфер (pH 7).

По диаграмме на Рисунке 72 видно, что увеличение концентрации PNP с 3 до 6 е.а./мл не привело к существенному росту конверсии (с 75 до 78%), поэтому 3 е.а./мл. – оптимальная концентрация PNP.

Динамика накопления нуклеозида **18** представлена на Рисунке 73. За 17 дней (408 ч) конверсия достигала 69%. 2-Хлор-6-N-[L-сериламидо]-кордицепин выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 52%.

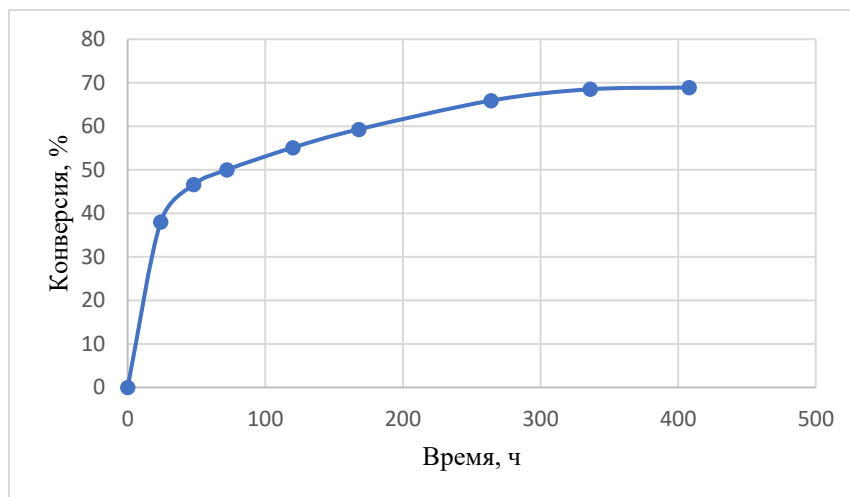


Рисунок 73 – Динамика накопления нуклеозида **18**.

Условия: объем реакции 277 мл, 50 °С, **18a**: 3'-dIno - 1:3, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.0), PNP – 6 е.а./мл.

Те же параметры оптимизировали для синтеза 2-хлор-6-N-[D-сериламидо]-кордицепина **19** (Рисунки 74, 75).

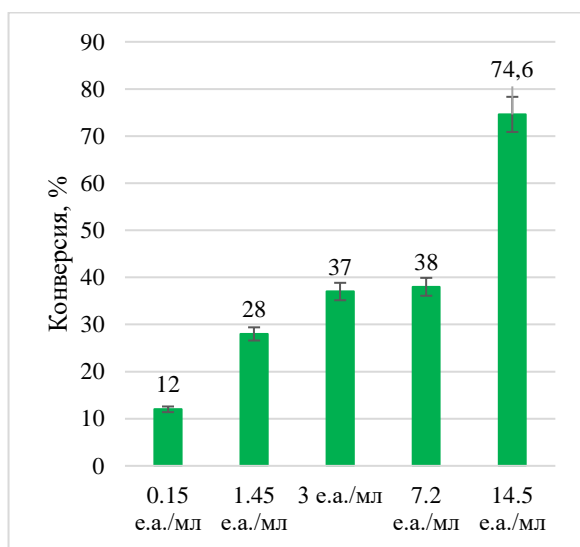


Рисунок 74 – Зависимость конверсии **19a** в **19** от концентрации PNP.

Условия: объем реакции 1 мл, **19a**:3'-dIno - 1:2, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7), 168 ч.

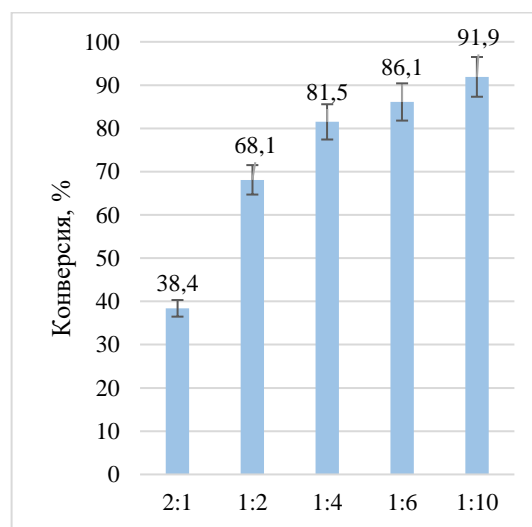


Рисунок 75 – Зависимость конверсии **19a** в **19** от соотношения основания **19a** к 3'-dIno.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7), PNP 14.5 е.а./мл, 168 ч.

Основываясь на полученных данных, для синтеза выбрали оптимальные значения: концентрация PNP - 14.5 ед., соотношение основания **19a** к 3'-dIno - 1:10. Как видно на Рисунке 76, к 120 ч кривая вышла на плато, конверсия составляла порядка 90%.

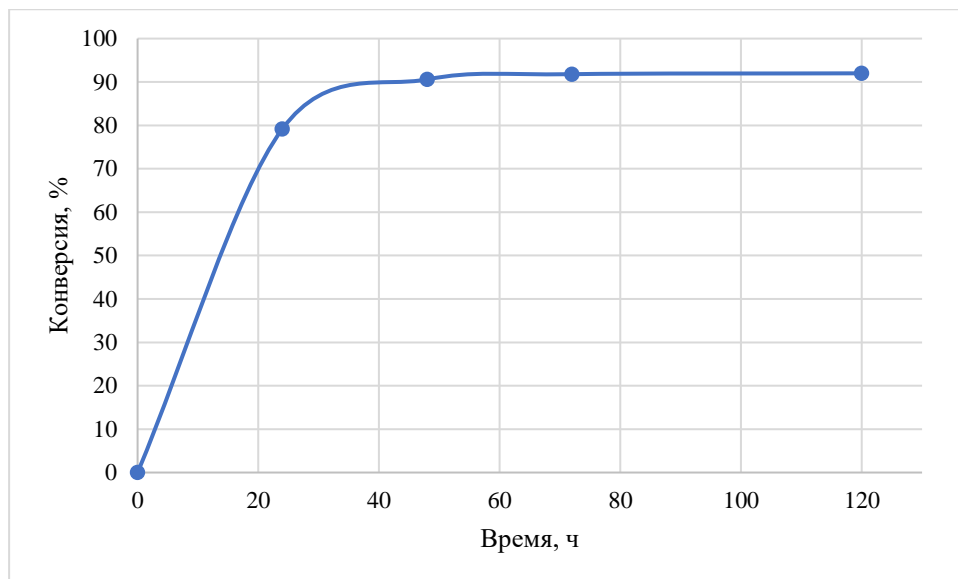


Рисунок 76 - Динамика накопления продукта нуклеозида **19**.

Условия: объем реакции 100 мл, 50 °С, **19a**: 3'-dIno - 1:10, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), PNP – 14.5 е.а/мл.

2-Хлор-6-N-[D-сериламидо]-кордицепин выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 64 %.

2.1.8 Синтез 6-О-метокси-3'-дезоксигуанозина

Неларабин (Рисунок 77) — это противоопухолевое средство, используемое в химиотерапии для лечения Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза и Т-клеточной лимфобластной лимфомы. Под действием аденозиндезаминазы он метаболизируется в арабинофуранозилгуанин, который ингибирует синтез ДНК, что приводит к гибели раковых клеток, особенно чувствительных Т-клеток.

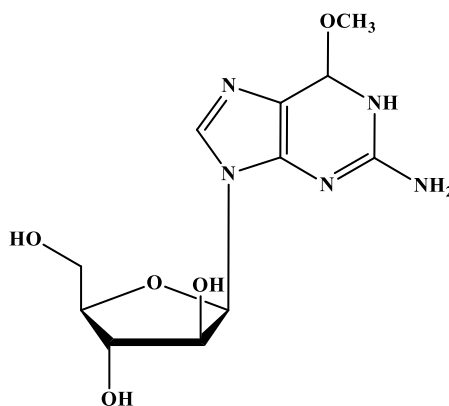


Рисунок 77 – Структура неларабина.

Мы получили новое соединение 6-О-метокси-3'-дезоксигуанозин (**20**), которое является аналогом неларабина, в результате реакции трансгликозилирования (Рисунок 78).

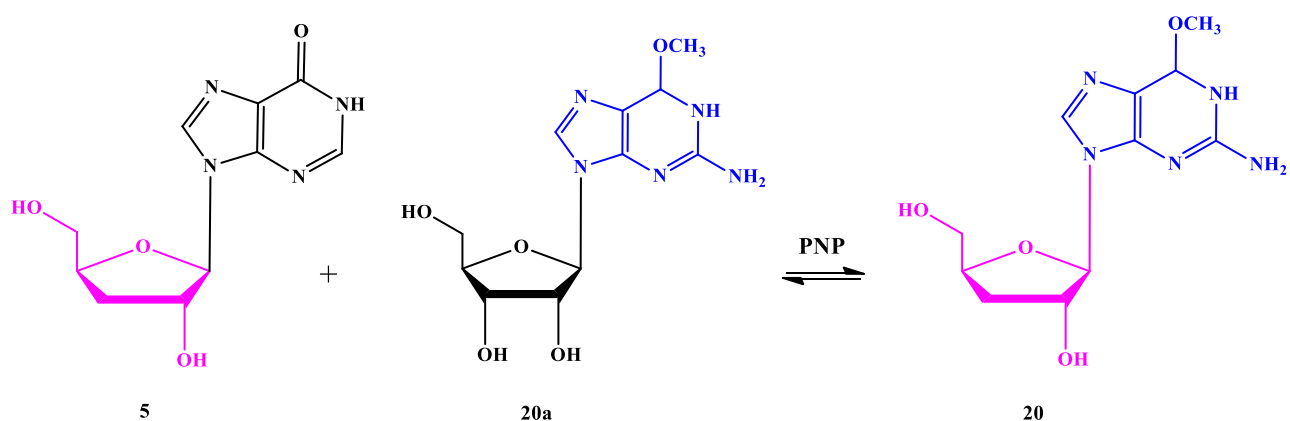


Рисунок 78 – Синтез 6-О-метокси-3'-дезоксигуанозина **20**.

В качестве исходных соединений выбрали нуклеозид **5** – источник углеводного остатка, и нуклеозид **20a** – источник 6-О-метокси-гуанина, в присутствии PNP *E. coli*. Результаты экспериментов по оптимизации условий синтеза представлены на Рисунках 79 и 80.

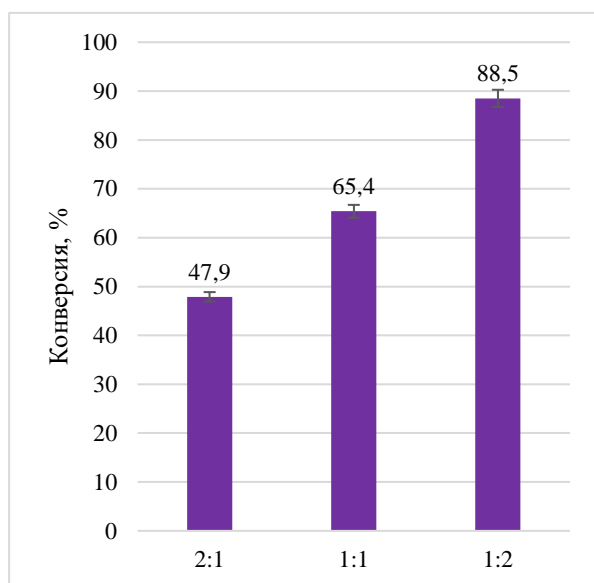


Рисунок 79 – Зависимость конверсии **20a** в **20** от соотношения **20a** к 3'-dIno.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7), PNP 7 е.а./мл, 168 ч.

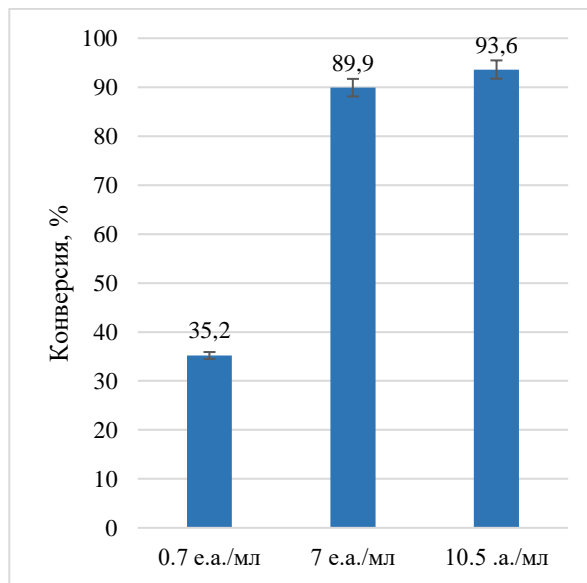
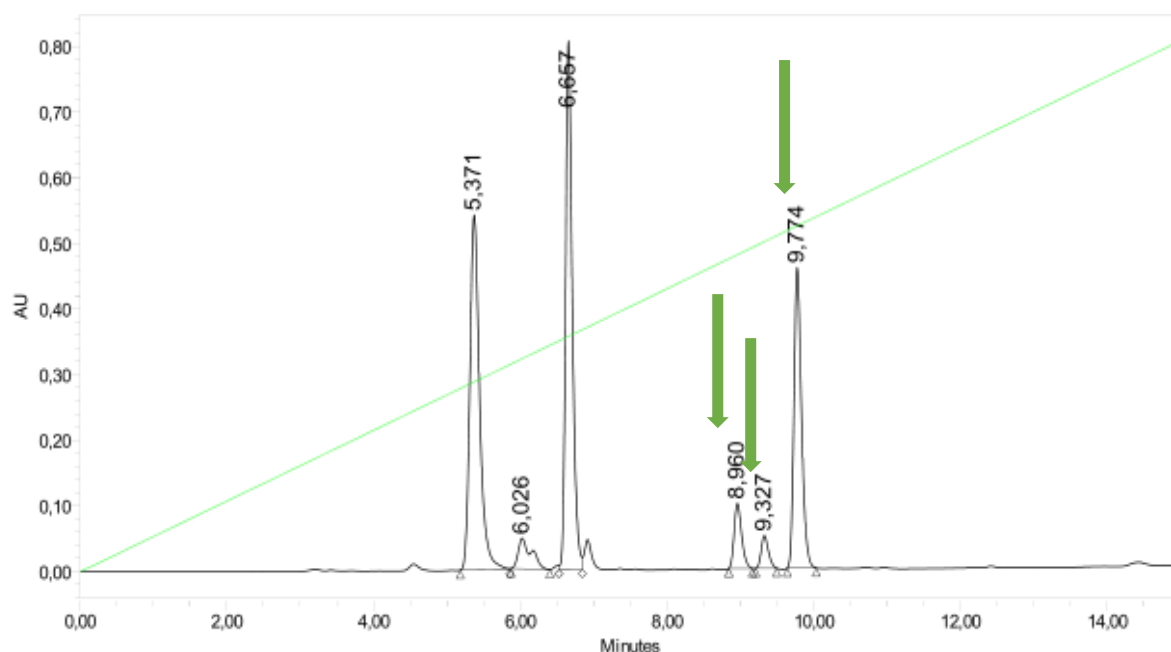


Рисунок 80 – Зависимость конверсии **20a** в **20** от концентрации PNP.

Условия: объем реакции 1 мл, **20a**:3'-dIno - 1:2, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7), 168 ч.

Затем в подобранных условиях синтезировали нуклеозид **20**. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. По профилю ВЭЖХ (Рисунок 81) видно, что рядом с пиком целевого соединения **20** ($R_t = 9.774$ мин) очень близко друг к другу расположены пики,

соответствующие 6-*O*-метокси-гуанину ($R_t = 8.960$ мин) и 6-*O*-метокси-гуанозину **14** ($R_t = 9.327$ мин).



Соединение	R_t (мин)	Площадь пика, %
Нур	5.371	33.30
Ino	6.026	3.83
3'-dIno	6.667	34.26
6- <i>O</i> -метокси-гуанин	8.960	4.70
6- <i>O</i> -метокси-гуанозин 20a	9.327	2.26
Соединение 20	9.774	21.65

Рисунок 81 – Данные ВЭЖХ реакционной смеси синтеза 6-*O*-метокси-3'-дезоксигуанозина до добавления арсената натрия (192 ч).

Такое близкое расположение пиков усложнило бы процесс выделения целевого соединения **20**. Чтобы обеспечить эффективное разделение и вывести из реакционной смеси исходный рибозид **20a**, в реакцию добавили 10 мл 1 мМ арсената натрия.

Процесс арсенолиза состоит в замене фосфатной группы в активном центре PNP на арсенат (Рисунок 82).

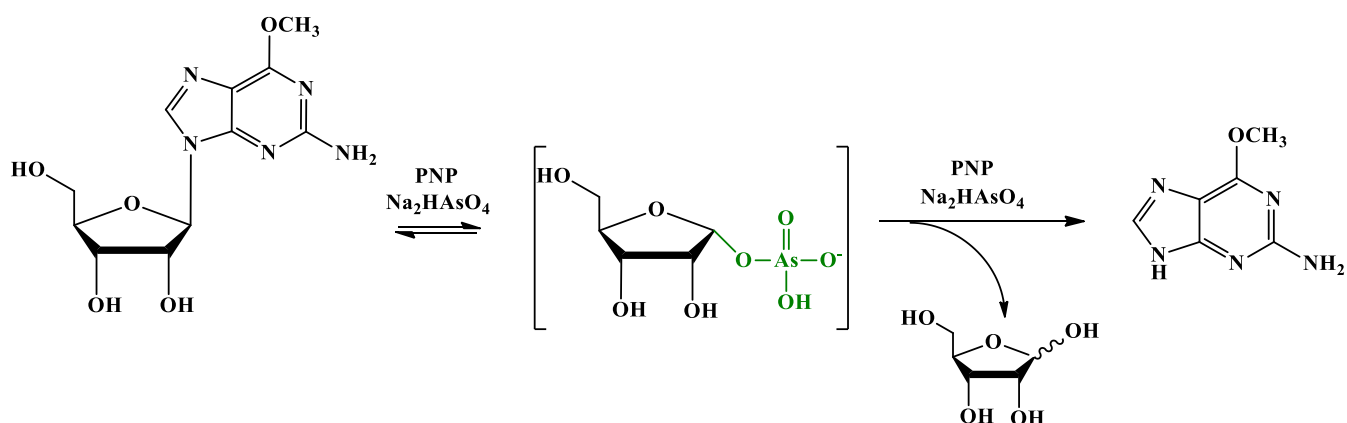


Рисунок 82 – Схема гидролиза 6-О-метокси-3'-дезоксигуанозина при использовании арсенолиза.

В присутствии арсената в активном центре PNP из исходного рибонуклеозида образуется α -D-рибозиларсенат. Это соединение крайне неустойчиво в водных растворах и быстро гидролизуются до рибозы и неорганического арсената.

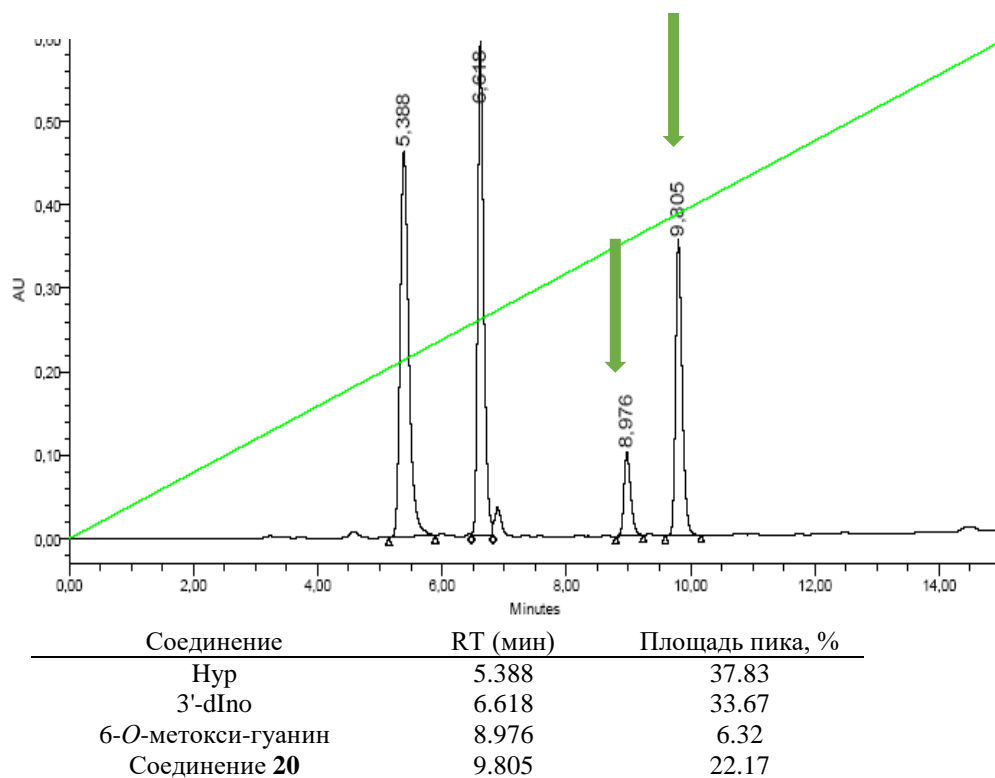


Рисунок 83 – Данные ВЭЖХ реакционной смеси синтеза 6-О-метокси-3'-дезоксигуанозина после добавления 10 мл 1 мМ арсената натрия (2 ч).

Таким образом, с помощью реакции арсенолиза удалось вывести из реакционной смеси исходный 6-*O*-метокси-гуанозин **20a** ($R_t = 9.327$ мин) без потери целевого продукта. На Рисунке 83 представлен профиль ВЭЖХ реакционной смеси после добавления 10 мл 1 мМ арсената натрия через 2 ч.

Как видно, из реакционной смеси исчезли все рибозиды ($R_t = 9.327$ мин и 6.028 мин), что значительно упростило хроматографическое выделение целевого нуклеозида **20** ($R_t = 9.805$ мин).

Целевой продукт **20** был выделен с помощью колоночной обращенно-фазовой хроматографии с выходом 71 %.

Результаты исследования, описанного в разделе **2.1.8**, опубликованы в работе –

I.D. Konstantinova, A.L. Kayushin, **A.O. Arnautova**, K.V. Antonov, B.Z. Yeletskaia, M.Ya. Berzina, E.V. Dorofeeva, O.I. Lutonina, I.V. Fateev, R.S. Esipov and A.I. Miroshnikov. Convenient Approach to the Biosynthesis of C2, C6-Disubstituted Purine Nucleosides Using *E. coli* Purine Nucleoside Phosphorylase and Arsenolysis // Applied Biocatalysis The Chemist's Enzyme Toolbox (book), Wiley-VCH, 2021, P. 211-215.

2.1.9 Синтез 2-амино-6-хлор-9-(3'-дезоксирибофуранозил)пурина

С помощью реакции трансгликозилирования было получено еще одно новое соединение – 2-амино-6-хлор-9-(3'-дезоксирибофуранозил)-пурин (**21**) (Рисунок 84).

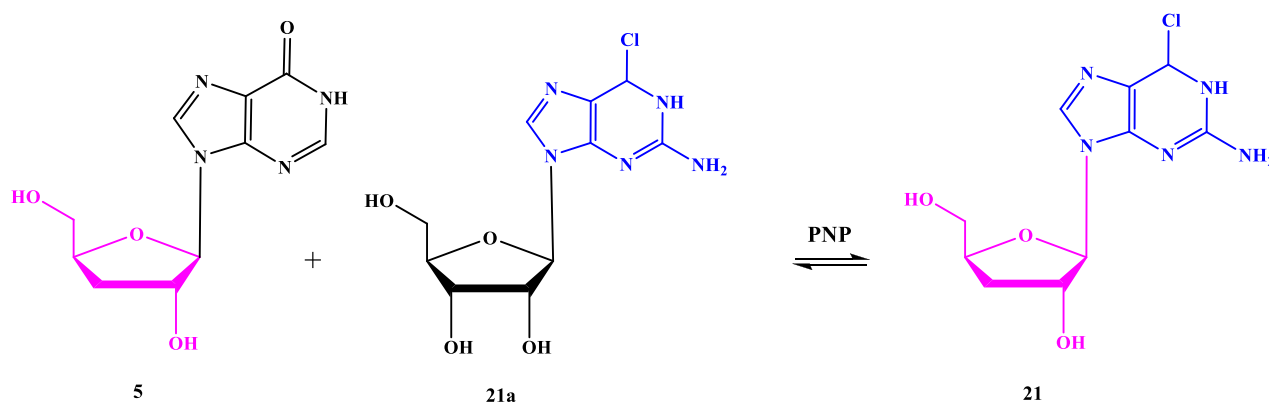


Рисунок 84 – Синтез нуклеозида **21**.

Реакцию проводили с 3'-dIno **5** и 2-амино-6-хлор-9-(рибофуранозил)пурином (**21a**) в присутствии PNP *E. coli*. Эксперименты по подбору оптимальных условий синтеза показали, что наибольшее значение конверсии (93-94%) достигается при соотношении **21a** к 3'-dIno – 1:3 и 1:4 (Рисунок 85) и при концентрации PNP – 7 и 10.5 е.а./мл (Рисунок 86).

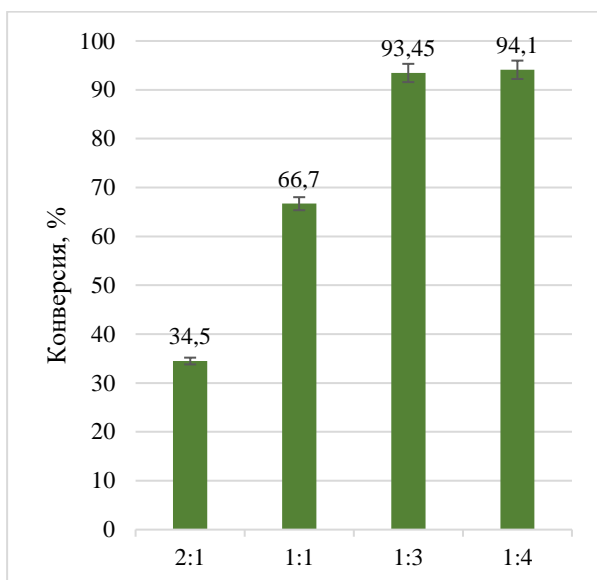


Рисунок 85 – Зависимость конверсии **21a** в **21** от соотношения **21a** к 3'-dIno.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7), PNP 7 е.а./мл, 168 ч.

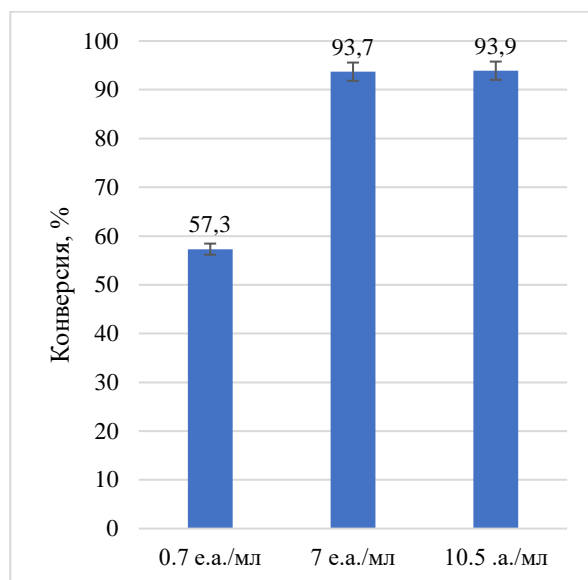


Рисунок 86 – Зависимость конверсии **21a** в **21** от концентрации PNP.

Условия: объем реакции 1 мл, **21a**:3'-dIno - 1:3, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7), 168 ч.

В оптимизированных условиях осуществили синтез соединения **21** (Рисунок 87). Реакция шла медленно: конверсия 92% была достигнута за 37 дней. 2-Амино-6-хлор-9-(3'-дезоксирибофуранозил)-пурин **21** выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией с выходом 42%.

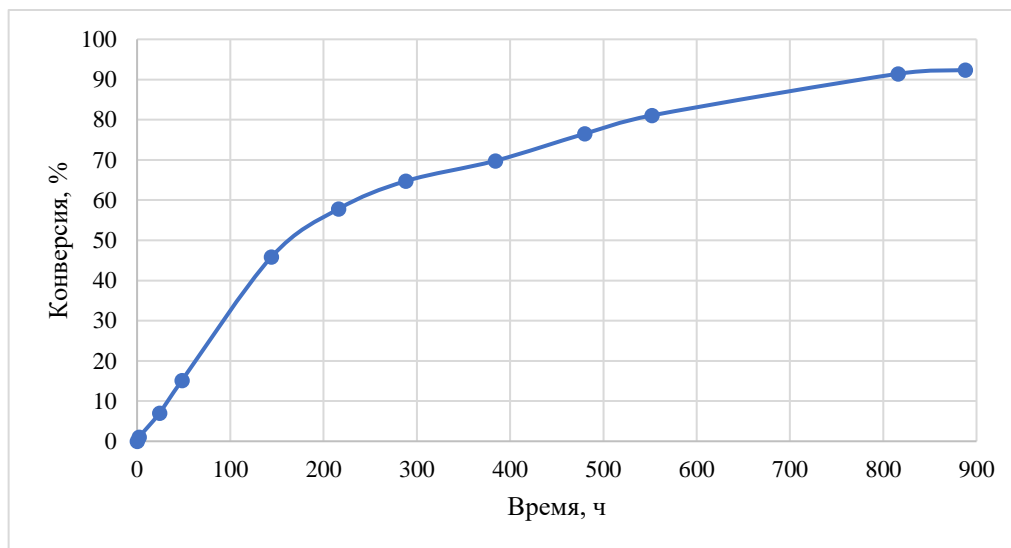


Рисунок 87 – Динамика накопления продукта нуклеозида **21**.

Условия: объем реакции 100 мл, 50 °С, **21a**: 3'-dIno - 1:4, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.0), PNP – 7 е.а./мл.

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

Краткие выводы по разделу 3.1

В результате проведенных исследований нам удалось усовершенствовать синтез 3'-дезоксидезоксиинозина – исходного нуклеотида для получения серии новых модифицированных пуриновых нуклеозидов с помощью реакции трансгликозилирования. Мы выяснили природу побочного продукта и механизм его образования в синтезе 3'-дезоксидезоксиинозина и 2-фторкордицепина.

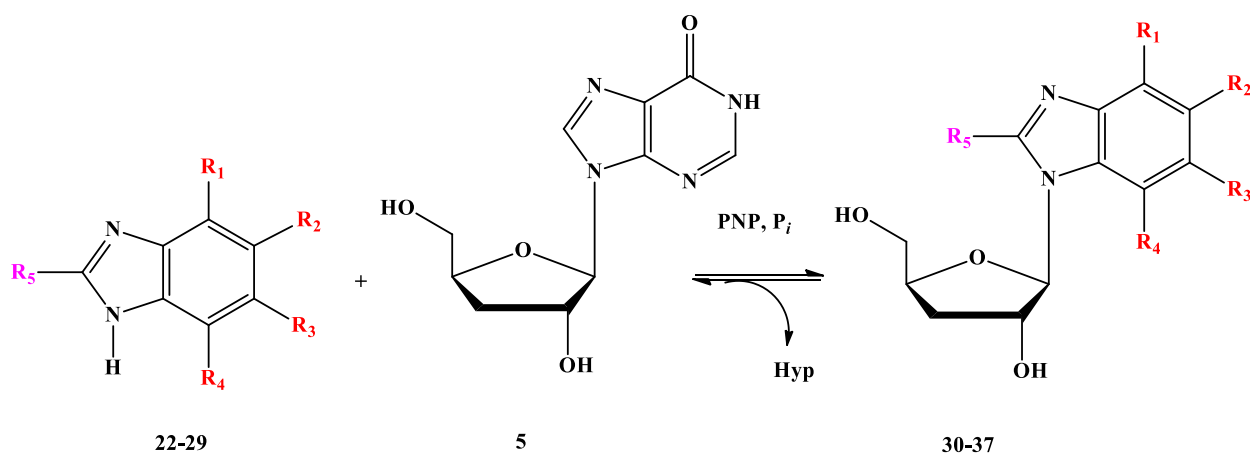
2-Фторкордицепин был впервые получен химическим способом из 2-фтораденозина с выходом 34%, а также ферментативным способом с использованием как 3'-дезоксидезоксиинозина, так и 1-фосфата 3-дезоксидезоксирибозы с выходами 78% и 66%, соответственно.

Получены новые 3'-дезоксидезоксирибозиды замещенного аденина и пурина с модификациями по C2- и C6-положениям.

Кроме того, адаптирован процесс арсенолитического удаления рибонуклеозидов при синтезе модифицированных 3'-дезоксидезоксирибонуклеозидов.

2.2 Синтез 3'-дезоксидезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола

С помощью реакции трансгликозилирования, катализируемой рекомбинантной PNP *E.coli*, синтезирован ряд 3'-дезоксидезоксирибозидов фторпроизводных бензимидазола (Рисунок 88).



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 88 – Общая схема синтеза 3'-дезоксидезоксирибозидов бензимидазола и его производных.

Выбор оснований **22** – **29** для синтеза обусловлен результатами скрининга противовирусной активности ранее синтезированных 2'-дезоксидефторарабинозидов замещенного бензимидазола [275], а также результатами работы [197]. В последнем исследовании 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-дезоксидефторарабинозиды замещенного бензимидазола и проверить, обладают ли такие соединения антивирусной активностью.

Оптимизацию условий синтеза каждого нуклеозида осуществляли по стандартной схеме: качественное определение субстратной специфичности фермента по отношению к основанию; определение оптимального соотношения субстратов для реакции трансгликозилирования; определение оптимальной концентрации фермента.

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.

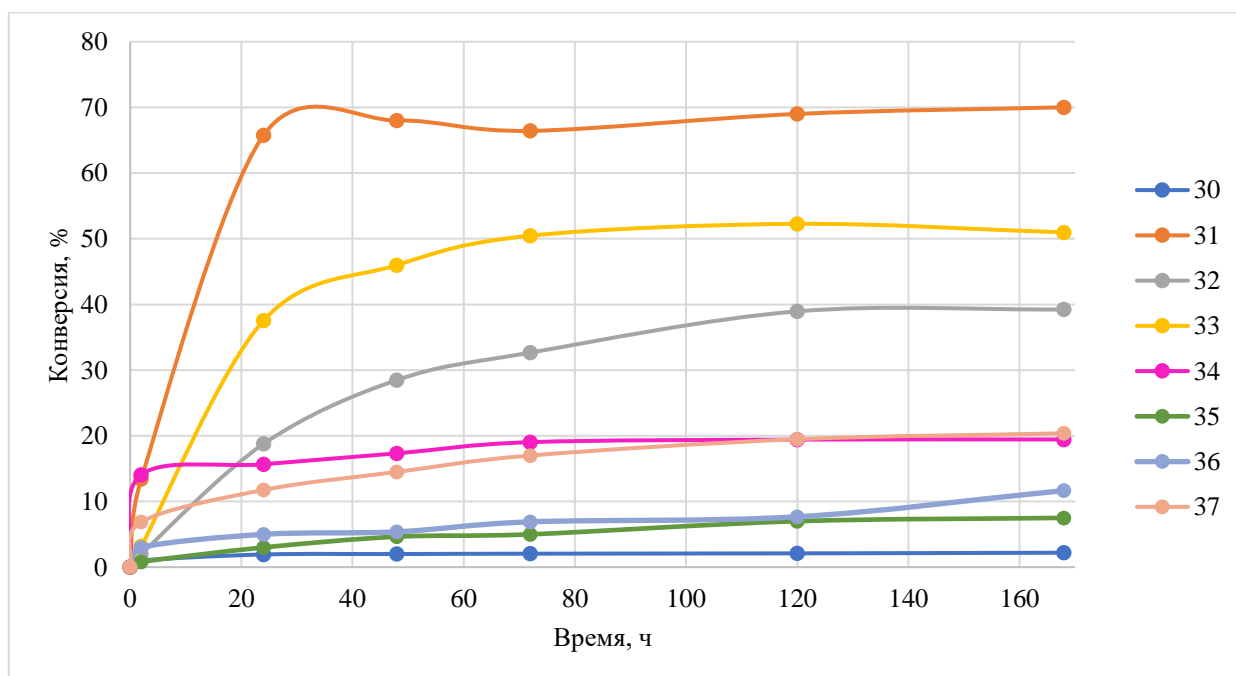


Рисунок 89 – Конверсия **5** в нуклеозиды **30** – **37**.

Условия: соотношение оснований **22** – **29** к **5** – 3:1 (по молям); 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.0), PNP - 7 е.а./мл.

По результатам, представленным на Рисунке 89, 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. Оптимизацию условий рассмотрим на примере синтеза соединения **32**.

Эксперименты по подбору соотношения **24** к 3'-dIno проводили в диапазоне от 3:1 до 1:9 (Рисунок 90). Наиболее высокие значения конверсии (около 84-85%) достигались при соотношениях 1:5 и 1:7, то есть в условиях избытка основания **24**.

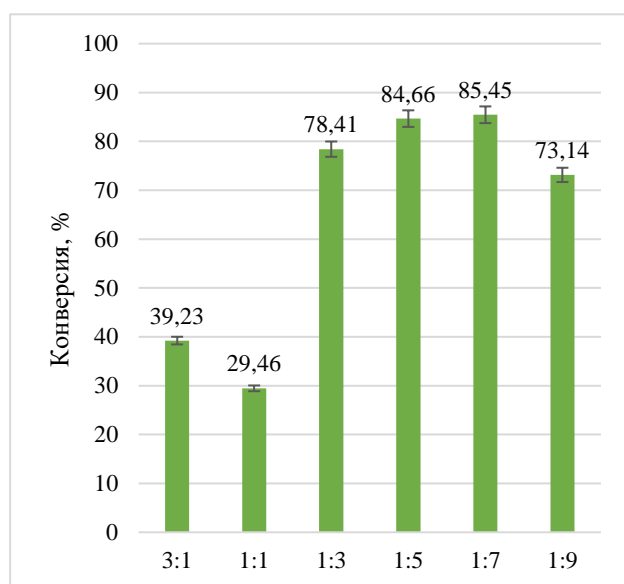


Рисунок 90 – Зависимость конверсии от соотношения **24** к 3'-dIno.

Условия: объем реакции 1 мл, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7), PNP 7 е.а./мл, 168 ч.

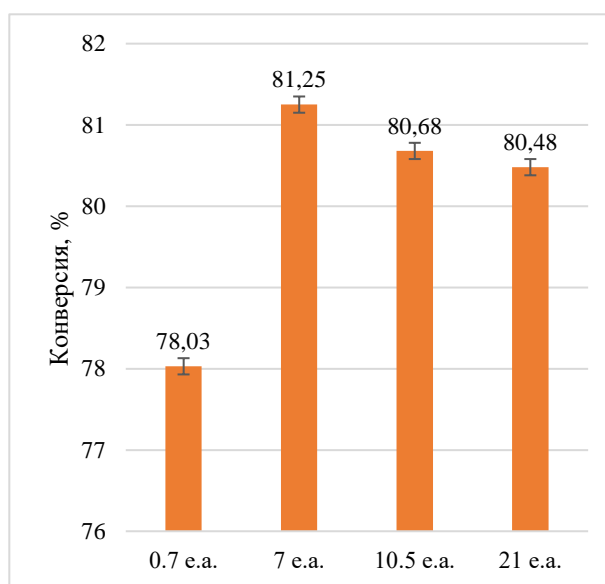


Рисунок 91 – Зависимость конверсии **5** в **32** от концентрации PNP.

Условия: объем реакции 1 мл, **24**:3'-dIno - 1:5, 50 °С, 2 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7), 168 ч.

Результаты тестовых реакций по определению оптимальной концентрации PNP представлены на Рисунке 91. Видно, что при концентрации фермента 7 е.а./мл и выше конверсия составляет около 80-81%.

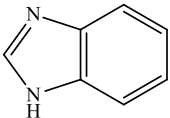
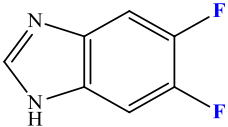
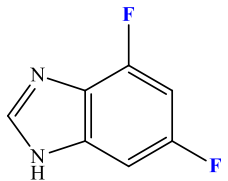
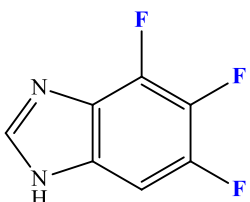
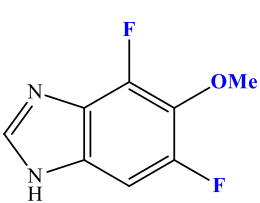
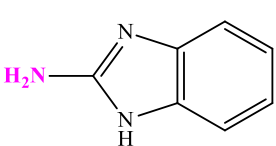
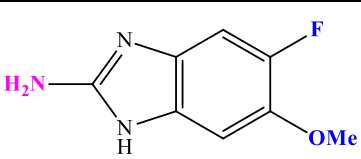
Результаты экспериментов по подбору соотношения субстратов и концентрации фермента представлены в Таблице 2.

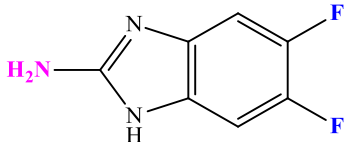
Данные экспериментов по подбору соотношения субстратов показали, что для реакций с основаниями **24** и **26** с образованием продуктов **32** и **34** соответственно, характерно увеличение конверсии при избытке донора 3-дезоксирибозы – 3'-dIno. В остальных реакциях значение конверсии возрастает с увеличением количества основания в реакционной смеси. Концентрация PNP в реакциях составляла 0.7 - 21 е.а./мл. В реакциях с соединениями **22** – **26** было достаточно концентрации PNP 7 е.а./мл для достижения высокой конверсии. Изменение условий реакции с

2-аминобензимидазолом **27** практически не повлияло на конверсию в продукт **35**, а с основанием **28** - увеличило значение конверсии в продукт **36** с 11 до 28%.

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 92).

Таблица 2 - 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
----------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----	----	----

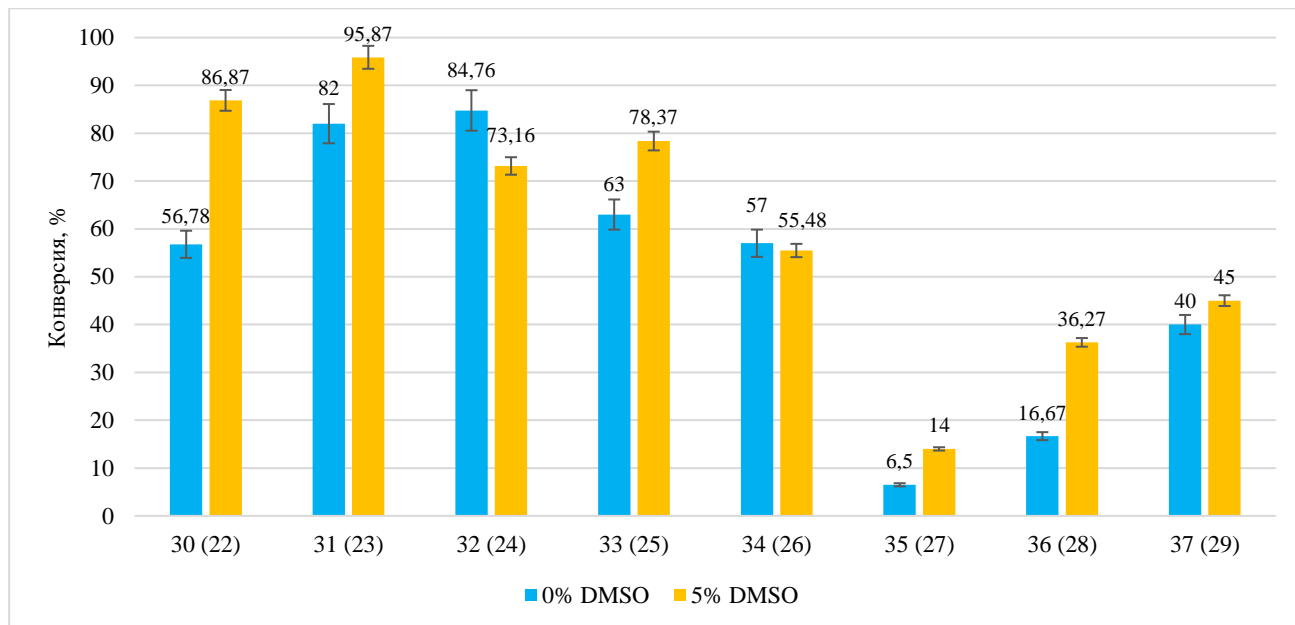


Рисунок 92 – Влияние 5% ДМСО на конверсию исходных субстратов в нуклеозиды **30** - **37**. Условия: объем реакции 1 мл, соотношения оснований **22** – **29** к 3'-dIno, концентрация PNP - указаны в Таблице 2, 50°C, 2 - 10 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), 168 ч.

Из данных, приведенных на диаграмме (Рисунок 92), 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 транскликозилирования были синтезированы нуклеозиды **30** – **34**, **37** (экспериментальные данные приведены в Таблице 3).

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. Ранее в работе [281] было впервые показано образование смеси региоизомеров в результате реакции трансгликозилирования с использованием PNP *E. coli*.

Таблица 3 - 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.	Буферный раствор (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 mM KH_2PO_4 , 200	20	-	-	54/27 (16)
31	23 – 182.58 (1.18)	100 (0.39)	3:1	1400	10 mM KH_2PO_4 , 100	40	-	-	93/32 (33,2)
32	24 – 25 (0.16)	205(0.81)	1:5	1400	6 mM KH_2PO_4 , 200	40	54	46	73/46 (7)
33	25 – 110 (0.64)	32.37 (0.13)	5:1	1400	10 mM KH_2PO_4 , 100	40	73	27	79/46 (17)
34	26 – 23 (0.12)	215 (0.85)	1:7	2100	6 mM KH_2PO_4 , 100	2	-	-	87/58 (20)
37	29 - 601 (3.5)	100 (0.4)	9:1	3500	9 mM KH_2PO_4 , 200	40	-	-	62/8 (8,5)

На рисунке 93 показан профиль ВЭЖХ реакционной смеси с замещенным бензимидазолом **24**. Пики с RT 7.204 и 8.425 мин соответствуют пикам соединений **32b** и **32a**.

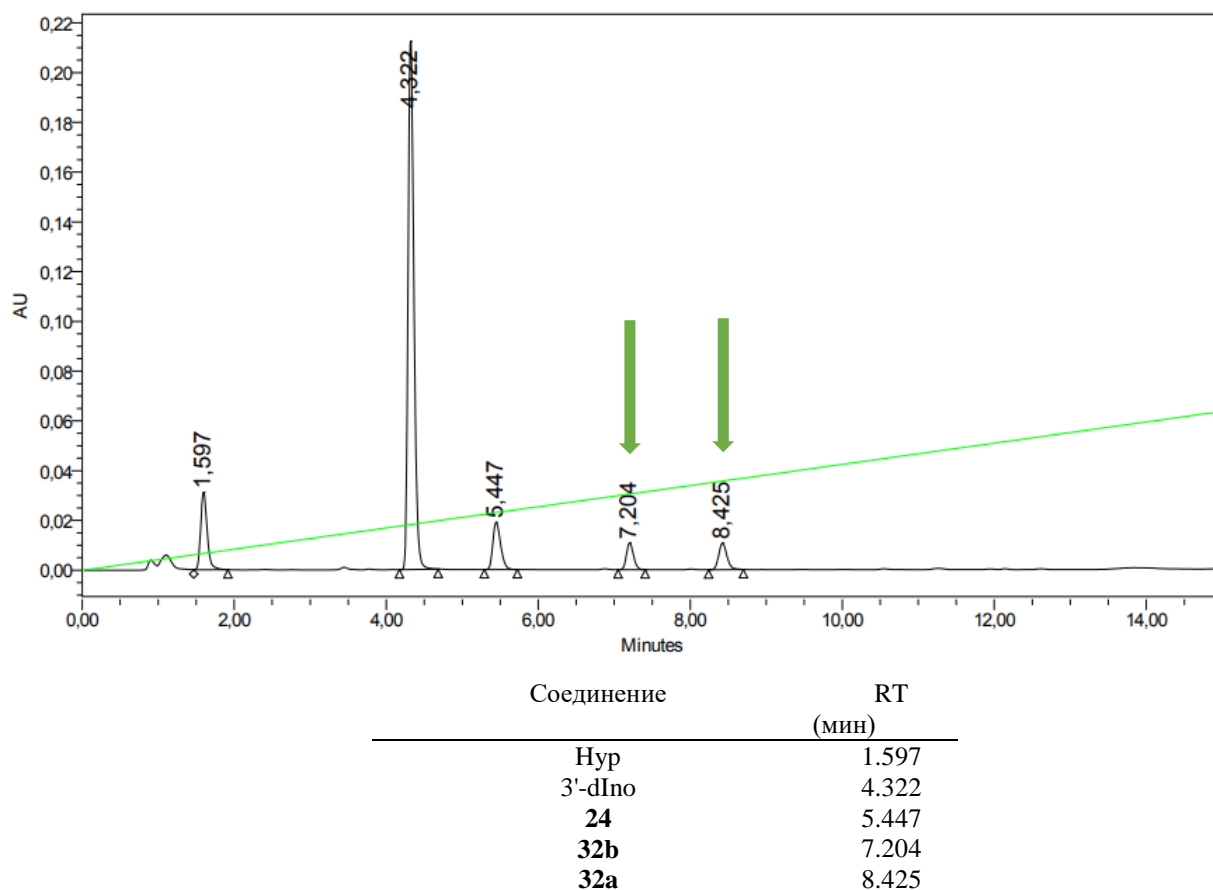


Рисунок 93 – Профиль ВЭЖХ реакционной смеси с замещенным бензимидазолом **24**.

Оба соединения **32** имеют одинаковые значения $[M+H]^+$ 271.0888, следовательно, это изомеры.

Сигнал атома C1' в соединении **32a** - это синглет (92.12 м.д.) (Рисунок 94а). Сигнал H1' представляет собой дублет (5.85 м.д., $J = 2.2$) (Рисунок 94б).

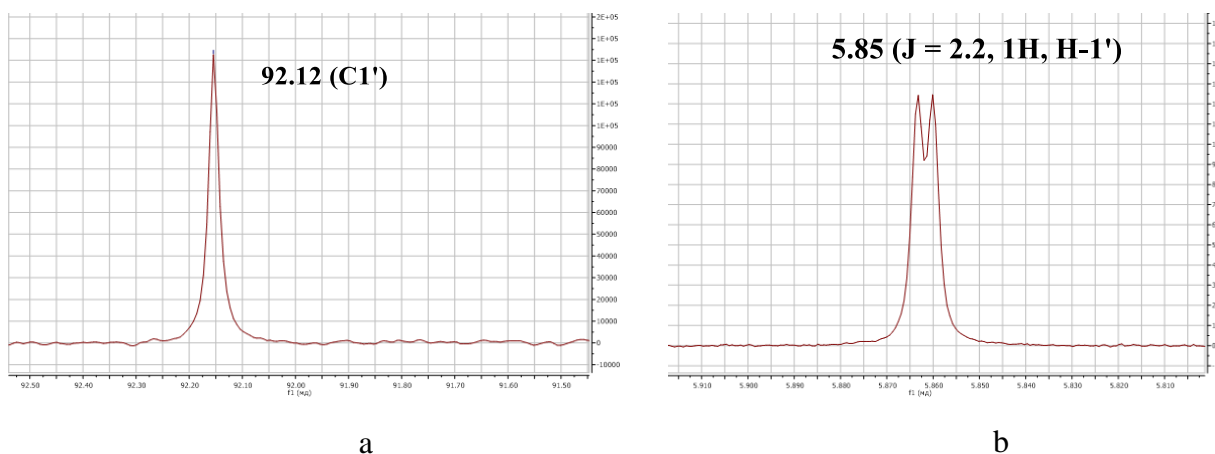


Рисунок 94 – а - фрагмент спектра ^{13}C – ЯМР; б - фрагмент спектра ^1H – ЯМР соединения **32a**.

В случае соединения **32b** сигнал C1' расщеплен в дублет (92.80 м.д., $J = 3.6$) из-за дальнего взаимодействия с ядром атома F при C4 (Рисунок 95а). Сигнал H1' - широкий сигнал (6.00 - 5.98 м.д.) из-за близости КССВ H1' - H2' и H1' - F4 (Рисунок 95б).

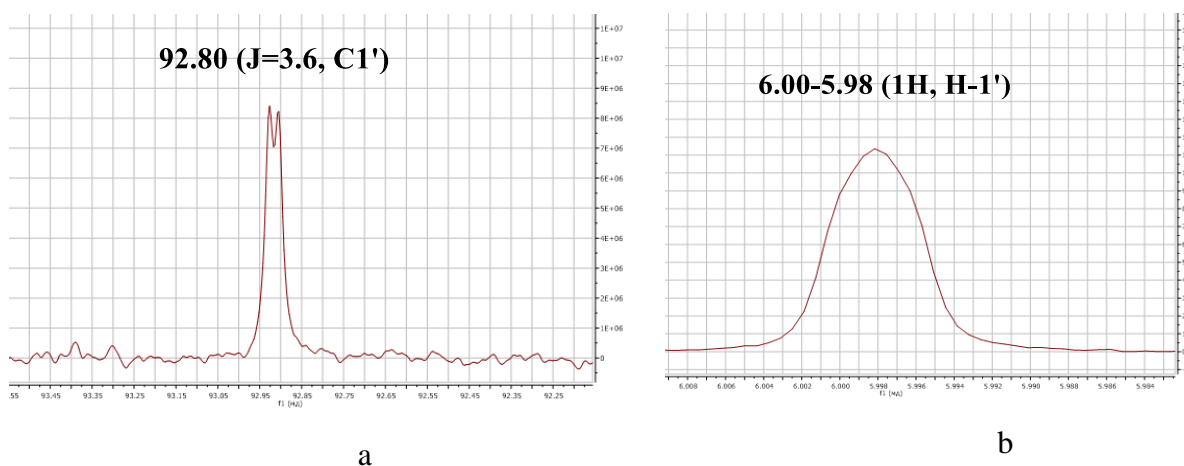


Рисунок 95 – а фрагмент спектра ^{13}C – ЯМР; б – фрагмент спектра ^1H – ЯМР соединения **32b**.

Структуры соединений **32a** и **32b** и схема взаимодействий некоторых ядер приведены на Рисунке 96.

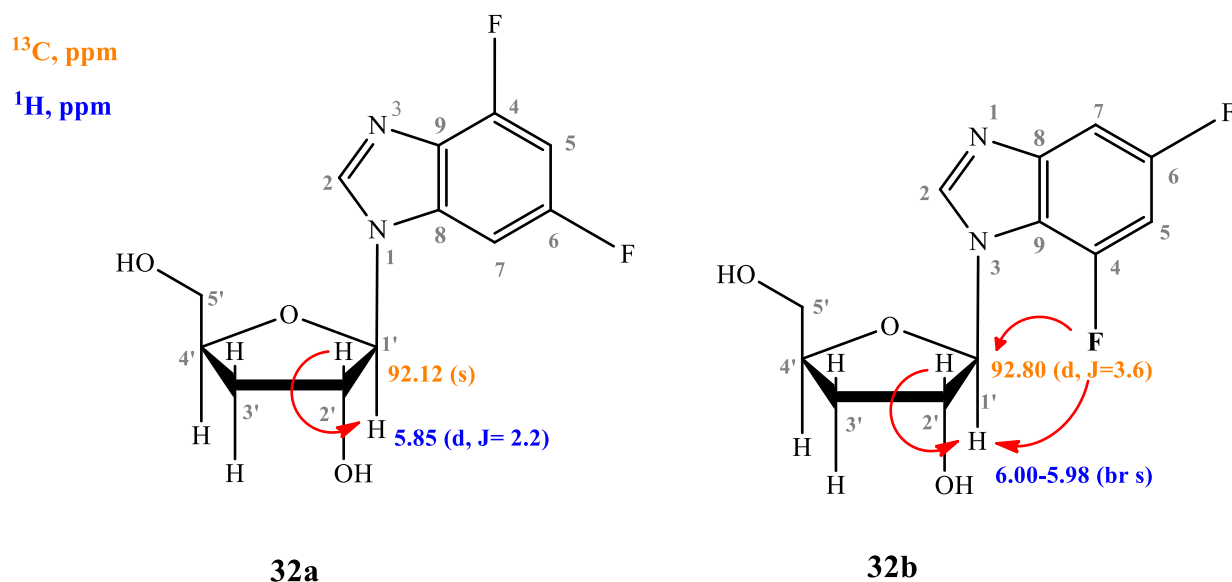


Рисунок 96 – Структуры соединений **32a** и **32b** и схема взаимодействия некоторых ядер.

Сходным образом были установлены структуры N1-и N3-региоизомеров нуклеозида **33** (Рисунок 97).

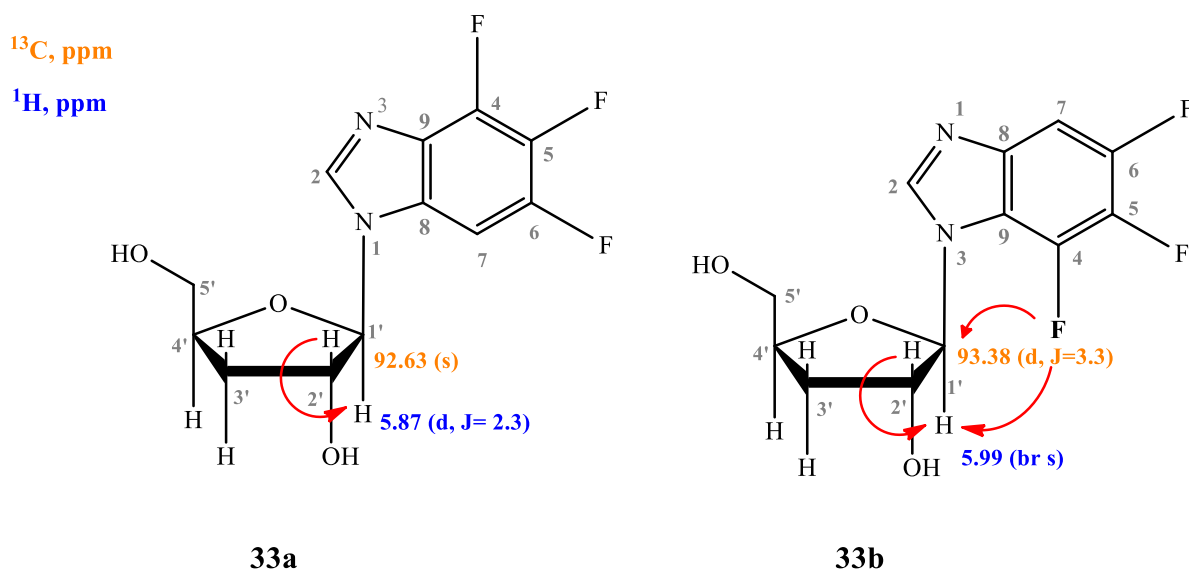


Рисунок 97 – Структуры соединений **33a** и **33b** и схема взаимодействия некоторых ядер.

Известно, что 2-аминобензимидазол хорошо работает как субстрат PNP в реакциях получения рибозидов и 2'-дезоксирибозидов[276]. 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.

Результаты исследования, описанного в разделе **2.2.**, опубликованы в работе -**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.

2.3 Исследование биологических свойств 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина и бензимидазола

Следующий важный этап работы заключался в изучении биологических свойств полученных соединений – противоопухолевых свойств 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов аденина и противовирусных свойств 3'-дезоксирибозидов замещенных аналогов бензимидазола.

2.3.1 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)

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

Таблица 4 – 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-F-3'-dAdo **7**, он проявил токсичность в отношении всех клеточных линий, кроме SKOV3. На Рисунке 98 представлены кривые зависимости выживаемости клеток различных линий от концентраций 2-фторкордицепина **7** и кордицепина.

2-F-3'-dAdo проявлял цитотоксическую активность по отношению к клеткам всех линий, кроме SKOV3 (Рисунок 62). Наибольшую активность 2-F-3'-dAdo 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 3'-dAdo менее токсичен по сравнению с 2-F-3'-dAdo и проявляет цитотоксическую активность только к клеткам MCF-7.

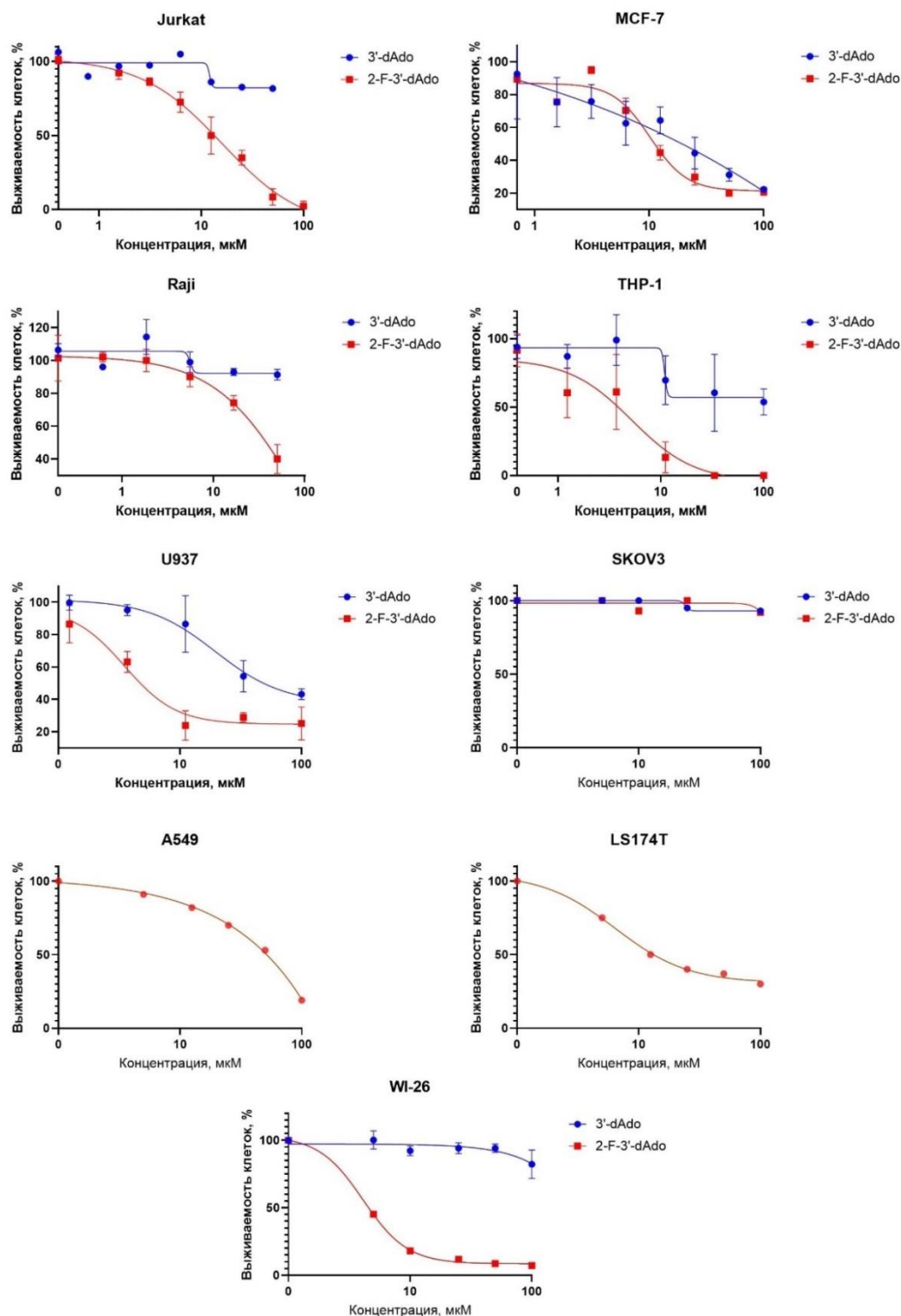


Рисунок 98 – Кривые зависимости выживаемости клеток различных линий от концентраций 2-F-3'-dAdo и 3'-dAdo.

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 (сравните синию

(3'-dAdo) и красную (2-F-3'-dAdo) линии трендов на Рисунке 98). Исключение - линия SKOV3, на которую не действовал ни кордицепин, ни его фторированный аналог.

Результаты исследований, описанных в разделе **2.3.1**, опубликованы в работе - **А. О. 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.

2.3.2 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 были протестированы *in vitro* с использованием эталонного штамма HSV-1/L₂, включая вариант вируса, резистентный к ацикловиру (IC₅₀ > 100 мкг/мл или >444,05 мкМ).

Из данных, приведенных на диаграммах (Рисунки 99-102) и Таблице 5, видно, что соединение **22** и его 3'-дезоксирибозид **30** мало токсичны для культуры клеток Vero Е6, 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 ^а , мкМ	CD ₅₀ ^б , мкМ	HSV-1/L ₂			HSV-1/ L ₂ /R ^{ACV}		
			IC ₅₀ ^с	IC ₉₅	ХТИ ^д	IC ₅₀ ^с	IC ₉₅	ХТИ ^д
			м.и. 0.01, БОЕ/кл ^е					
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 CD_{50} - концентрация соединения, вызывающая гибель 50 % клеток;

^c IC_{50} и IC_{95} - концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта на 50% и 95%;

^d ХТИ – химиотерапевтический индекс - отношение CD_{50} к IC_{50} ;

^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 (IC_{50}) были сопоставимы (пары **23/31**, **24/32a**).

Замена атома водорода на атом фтора в положениях C4 и C5 бензимидазольного цикла (соединения **24/32a**) или C5 и C6 (соединения **23/31**) приводила к увеличению цитотоксичности, тогда как параметры противовирусной активности (IC_{50}/IC_{95}) не изменялись существенно по сравнению с парой соединений **22/30**. Трифторзамещенный аналог бензимидазола **25** также характеризовался более высокой токсичностью для культуры клеток, но величины IC_{50}/IC_{95} 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 C5 гетероциклического основания соединений **26/34** привело к значительному снижению противовирусной активности соединений по сравнению с парой **25/33a**, что отразилось на величине показателя ХТИ.

Соединения, содержащие в положении C2 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**.

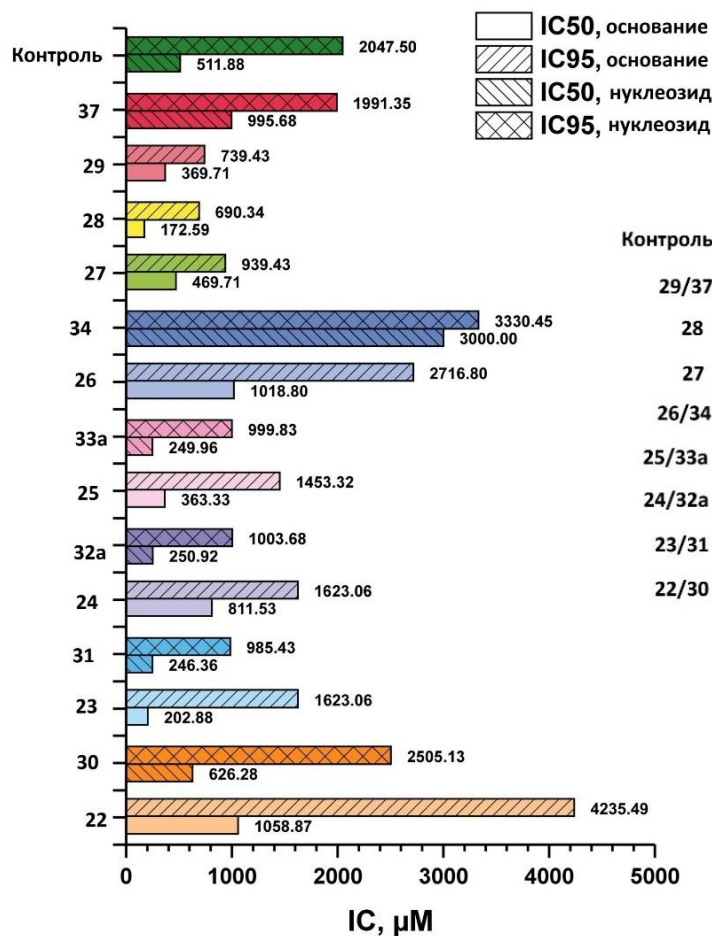


Рисунок 99 – Значения IC₅₀ и IC₉₅ для соединений **22-34**, **37**, полученные в результате оценки противовирусной активности *in vitro* с использованием штамма HSV-1/L₂.

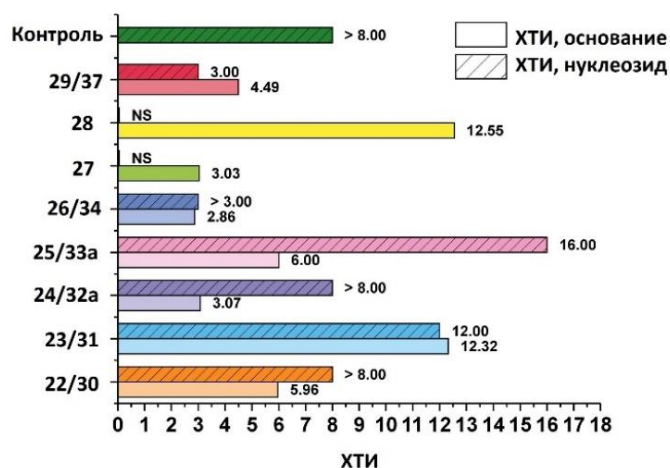


Рисунок 100 – Значения ХТИ для соединений **22-34**, **37**, полученные в результате оценки противовирусной активности *in vitro* с использованием штамма HSV-1/L₂.

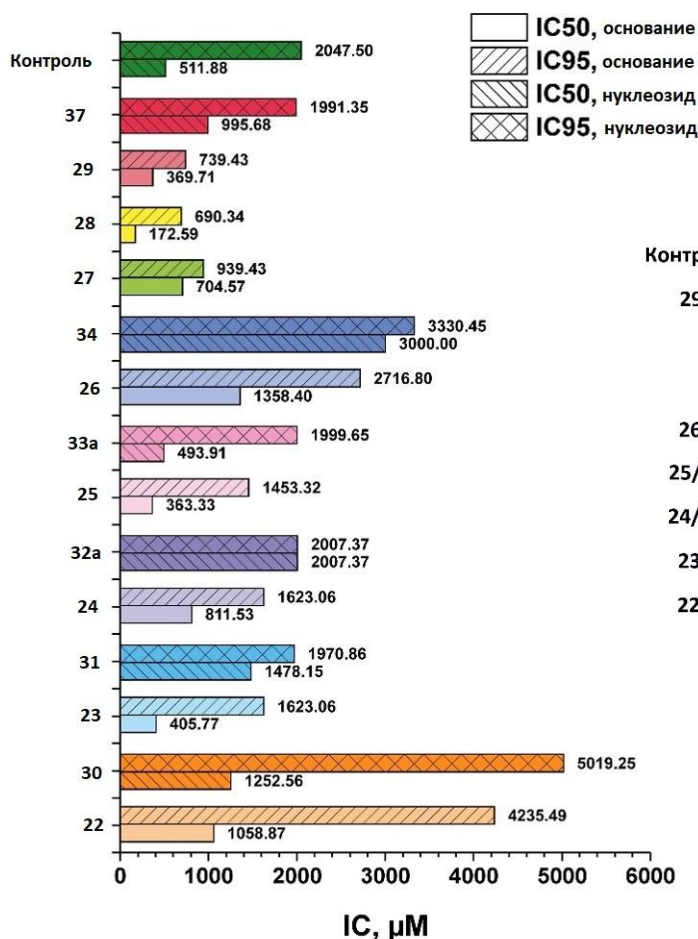


Рисунок 101 – Значения IC_{50} и IC_{95} для соединений **22-34, 37**, полученные в результате оценки противовирусной активности *in vitro* с использованием штамма, устойчивого к ацикловиру HSV-1/L₂/R^{ACV}.

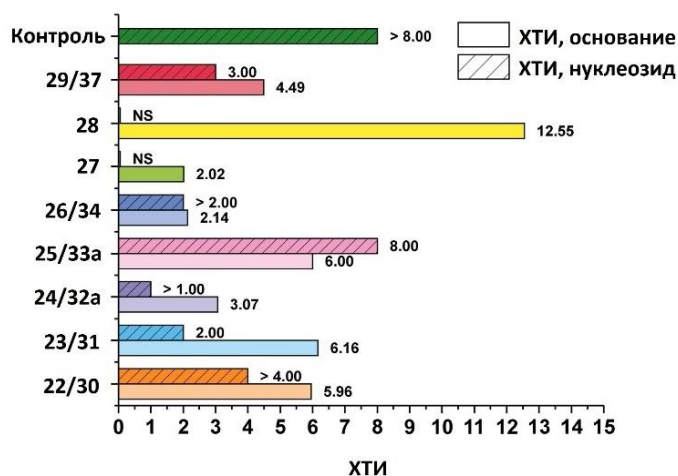


Рисунок 102 – Значения ХТИ для соединений **22-34, 37**, полученные в результате оценки противовирусной активности *in vitro* с использованием штамма, устойчивого к ацикловиру HSV-1/L₂/R^{ACV}.

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'-дезоксирибозидов 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.

Нельзя исключить, что производные бензимидазола и их 3'-дезоксирибозиды супрессируют репродукцию ВПГ ингибируя, например, терминальный комплекс вируса, подобно соединениям **TCRB** и **BDCRB**, проявляющими активность в отношении HCMV [188].

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).

2.3.3 Сравнение противовирусной активности нуклеозидов замещенных бензимидазолов

В работах [197, 275] проводили оценку противовирусной активности и цитотоксичности *in vitro* полученных рибозидов (Rib), 2'-дезоксирибозидов (2'-dRib), 2'-дезоксид-2'-фтор-арабинозидов (2'-F-Ara) замещенных аналогов бензимидазола **30 – 34, 37** с использованием эталонного штамма HSV-1/L₂.

Мы решили сопоставить противовирусную активность полученных нами 3'-дезоксирибозидов (3'-dRib) и полученных ранее Rib, 2'-dRib, 2'-F-Ara бензимидазола **22** и его замещенных аналогов **30 – 34, 37**, а также самих оснований бензимидазола **23 – 29** (Рисунки 103, 104). В качестве препарата сравнения (контроль) был выбран рибавирин.

Наличие углеводного остатка влияет на значения минимальной противовирусной активности. В большинстве случаев IC₅₀ выше у синтезированных нуклеозидов, чем у соответствующих оснований. Вероятно, это связано с улучшением биодоступности молекул и наличием систем транспорта нуклеозидов через цитоплазматическую мембрану.

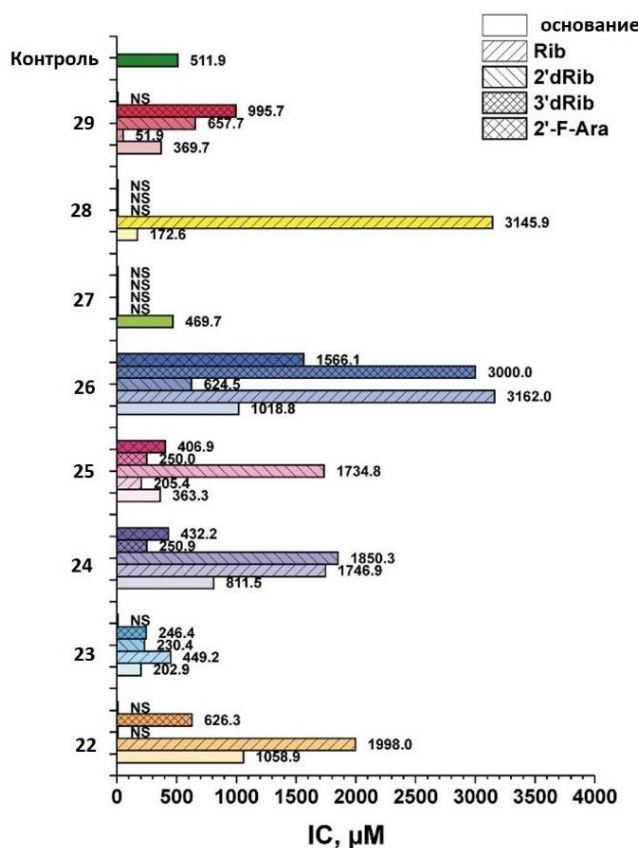


Рисунок 103 – Значения IC_{50} для нуклеозидов Rib, 2'-dRib, 3'-dRib, 2'-F-Ara бензимидазола **22** и его замещенных аналогов **23 - 29**.

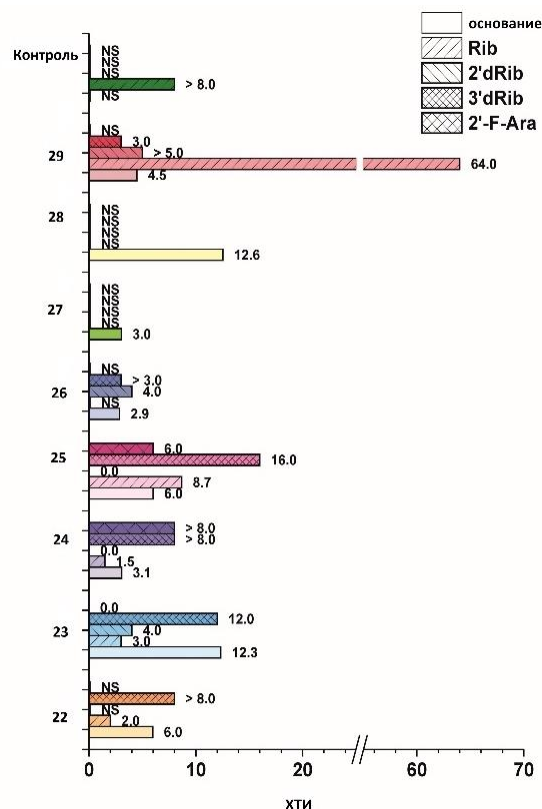


Рисунок 104 – Значения ХТИ для Rib, 2'-dRib, 3'-dRib, 2'-F-Ara бензимидазола **22** и его замещенных аналогов **23 - 29**.

В то же время значения ХТИ (Рисунок 103) оказались выше у оснований бензимидазола **24** и **29**, чем у соответствующих нуклеозидных форм и препарата сравнения.

Результаты исследований, описанных в разделах **2.3.1. - 2.3.3**, опубликованы в работах:

1. **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.
2. **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.

3 Материалы и методы

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

2-Фтораденозин синтезирован в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН [271]. Использовали генно-инженерную пуриннуклеозидфосфорилазу *E. coli* (концентрация белка по методу Бредфорд 29 мг/мл, активность 50 е.а./мг белка), которая была получена в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН [277].

Модифицированные основания **23 – 29** синтезированы в ИОС УрО РАН (г. Екатеринбург) и переданы для проведения экспериментальных работ. Все основания использовались без дополнительной очистки.

Для колоночной хроматографии использовали Silica gel 60 (Fluka). Для колоночной обращено-фазовой хроматографии использовали Silica gel C18-Reversed phase (Fluka), Separon SGX C18 (Ltd. Praha, Czechoslovakia). Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластинки с силикагелем (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany).

Аналитическую ВЭЖХ проводили на аппаратуре Waters (Waters 1525, Waters 2489, Breeze 2) в следующих системах:

Система 1: Колонка Ascentis Express C18, 3.0x75 мм, 2.7 мкм, скорость потока 0.5 мл/мин, детекция при 280 нм. Буфер А - 0.1% трифторуксусная кислота в воде, буфер В - 70% ацетонитрил в 0.1% водной трифторуксусной кислоте, градиент концентрации 0% - 30% В, 15 мин.

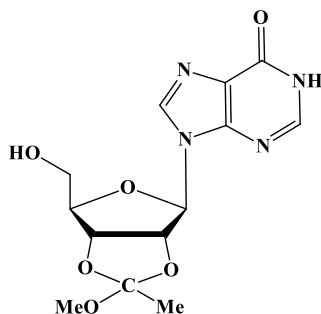
Система 2: Колонка Nova Pak C18, 4.6x150 мм, 4 мкм, скорость потока 0.5 мл/мин, детекция при 260 нм. Буфер А - 20% водный метанол, буфер В - метанол, градиент концентрации 0% - 100% В, 15 мин.

Препаративную ВЭЖХ проводили на колонке MZ-PREPARED, 20x250 мм, PerfectSil Target, ODS-3 5 мкм, скорость потока 4 мл/мин, детекция при 260 нм.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance DRX-700 в DMSO-d₆ или в D₂O (соединение **VI**) при 303 К. Рабочая частота для ¹H-ЯМР - 700 МГц, для ¹³C - 176 МГц, для ¹⁵N - 71 МГц. Химические сдвиги измерены в м.д. (δ) относительно остаточных сигналов протонов DMSO (2.50 м.д.) или D₂O (4.79 м.д.). Константы спин-спинового взаимодействия (*J*) измерены в Гц.

Хромато-масс-спектрометрию проводили в системе Agilent 6210 TOF LC/MS (Agilent Technologies, USA).

3.1 Синтез соединений

2',3'-О-(1-метоксиэтилиден)инозин (2)

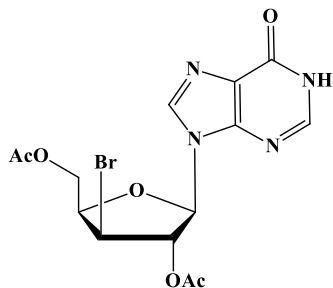
К суспензии 5 г (18.7 ммоль) инозина (1) в 25 мл ДМФА добавили триметилортоацетат (11.6 мл, 93.4 ммоль) и дихлоруксусную кислоту (0.09 мл, 1.2 ммоль). Реакционную смесь нагрели до 60 °С; за ходом реакции следили при помощи ТСХ в системе ацетонитрил-вода, 85:15, и хлороформ-метанол, 7:1. Через 1 час реакционную смесь охладили до комнатной температуры и добавили 0.5 мл диизопропилэтиламина. Полученную смесь сконцентрировали до 10 мл, затем разбавили до 20 мл 20% MeOH в CHCl₃ и высадили целевой продукт в 1 л гексана. Выход 5.872 г (18.1 ммоль, 97 %).

ESI/MS [M+H]⁺: вычислено для C₁₃H₁₇N₄O₆ 325.1148, найдено 325.1150.

¹H NMR: 12.40 (с, 1H, NH), 8.31 (с, 1H, H-8), 8.29 (с, 1H, H-8), 8.09 (с, 1H, H-2), 8.08 (с, 1H, H-2), 6.27 (д, *J* = 2.8, 1H, H-1'), 6.14 (д, *J* = 2.3, 1H, H-1'), 5.45 - 5.34 (м, 1H, H-2'), 5.08 - 4.94 (м, 1H, H-3'), 4.30 - 4.21 (м, 1H, H-4'), 3.56 - 3.53 (2 м, 2H, H-5'), 3.35 и 3.18 (с, 3H, C-O-CH₃), 1.64 и 1.53 (с, 3H, C-CH₃).

¹³C NMR: 156.96 (C6), 148.21 и 146.54 (C2), 139.37 и 139.19 (C8), 125.64 и 125.16 (CH₃-O-C-CH₃), 148.21 (C4), 124.97 (C5), 89.94 и 89.82 (C1'), 87.30 (C4'), 84.75 и 84.48 (C2'), 82.39 и 81.54 (C3'), 61.98 и 61.76 (C5'), 50.37 и 49.71 (C-O-CH₃), 23.80 и 21.76 (C-CH₃).

¹⁵N NMR: 250.0 (N7), 214.0 (N3), 175.3 (N9), 175.1 (N1).

2',5'-ди-О-ацетил-3'-дезоксигуанозин (3)

К суспензии 5 г (15.4 ммоль) 2',3'-О-(1-метоксиэтилиден)инозина **2** в 20 мл ацетонитрила добавляли раствор 5.5 мл (74.4 ммоль) ацетилбромида в 5 мл ацетонитрила в течение 2 часов,

поддерживая температуру реакционной смеси 0 °С. Реакционную смесь оставили при 10 °С на 8 часов. За ходом реакции следили при помощи ТСХ в указанных выше системах.

Реакционную смесь охладили до 0 °С, добавили 15 мл насыщенного раствора Na₂CO₃ (до слабощелочной реакции), через 15 минут упарили до начала выпадения осадка. Смесь экстрагировали хлороформом (3 x 25 мл), объединенные органические слои промыли 0.1 М раствором бикарбоната триэтиламония (2 x 25 мл), высушили Na₂SO₄ и сконцентрировали. Целевой продукт был выделен колоночной хроматографией на силикагеле (2.5 x 20 см, элюция градиентом концентрации метанола в хлороформе, 0% - 8%, 800 мл, скорость элюции 6 мл/мин). Выход 5.09 г (12.3 ммоль, 80%).

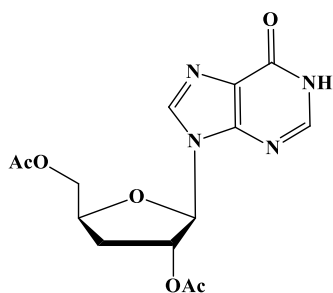
ESI/MS [M+H]⁺: вычислено для C₁₄H₁₆BrN₄O₆ 417.0233, 415.0253, найдено 417.0217, 415.0251.

¹H-NMR: 12.44 (с, 1H, NH), 8.10 (с, 1H, H-2), 8.26 (с, 1H, H-8), 6.16 (д, *J* = 2.9, 1H, H-1'), 5.84 - 5.82 (м, 1H, H-2'), 4.92 (дд, *J* = 2.4, 4.4, 1H, H-3'), 4.96 - 4.90 (м, 1H, H-4'), 4.59 - 4.55 (м, 1H, H-5'), 4.38 - 4.35 (м, 1H, H-5'), 2.12 (с, 3H, 3'-COCH₃), 2.07 (с, 3H, 5'-COCH₃).

¹³C NMR: 169.89 (5'-COCH₃), 169.14 (3'-COCH₃), 156.37 (C6), 147.80 (C4), 146.27 (C2), 137.76 (C8), 124.26 (C5), 86.77 (C1'), 81.57 (C2'), 77.88 (C4'), 64.76 (C5'), 49.05 (C3'), 20.45 (5'-COCH₃), 20.33 (3'-COCH₃).

¹⁵N NMR: 251.0 (N7), 213.5 (N3), 175.5 (N1), 170.5 (N9).

2',5'-ди-О-ацетил-3'-дезоксинозин (4)



Раствор 2',5'-ди-О-ацетил-3'-дезоксинозина **3** (900 мг, 2.17 ммоль) и бензоилпероксида (630 мг, 2.60 ммоль) в 40 мл толуола упарили до объема 18 мл; по окончании упаривания колбу заполнили аргоном. К полученному раствору добавили 1.71 мл (6.51 ммоль) гидрида трибутилолова и нагрели до кипения. За ходом реакции следили при помощи ВЭЖХ (элюция градиентом концентрации 75% водного ацетонитрила в воде, 20% - 60%, 15 мин). Через 3 часа реакционную смесь охладили до комнатной температуры и упарили. Целевой продукт был выделен колоночной хроматографией на силикагеле (2.5 x 30 см, элюция градиентом концентрации метанола в хлороформе, 0% - 8%, 2 л, скорость элюции 11 мл/мин). Выход 644 мг (1.92 ммоль, 88%).

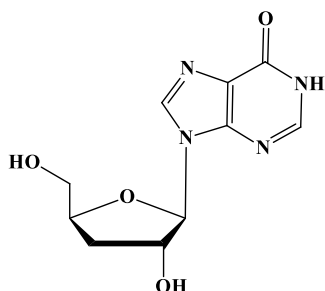
ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{14}H_{17}N_4O_6$ 337.1148, найдено 337.1160.

1H -NMR: 12.40 (с, 1H, NH), 8.17 (с, 1H, H-8), 8.04 (с, 1H, H-2), 6.11-6.07 (м, 1H, H-1'), 5.65-5.60 (м, 1H, H-2'), 4.53 – 4.47 (м, 1H, H-4'), 4.31 - 4.25 (м, 1H, H-5'), 4.13-4.10 (м, 1H, H-5'), 2.65-2.57 (м, 1H, H-3'), 2.25-2.18 (1H, H-3'), 2.09 (с, 3H, 3'-COCH₃), 1.98 (с, 3H, 5'-COCH₃).

^{13}C NMR: 170.00 (5'-COCH₃), 169.71 (3'-COCH₃), 158.14 (C6), 147.84 (C4), 147.16 (C2), 138.05 (C8), 124.30 (C5), 88.28 (C1'), 77.75 (C4'), 77.30 (C2'), 64.34 (C5'), 32.36 (C3'), 20.58 (3'-COCH₃), 20.36 (5'-COCH₃).

^{15}N NMR: 250.2 (N7), 213.2 (N3), 174.1 (N9)

3'-дезоксиинозин (5)



600 мг (1.8 ммоль) диацетата **4** растворили в 6 мл метанола и добавили 12 мл 25% водного аммиака. За ходом реакции следили при помощи ТСХ в системе хлороформ-метанол, 9:1. Через 1 час реакционную смесь упарили досуха и остаток растворили в воде. Целевой продукт был выделен обращенно-фазовой колоночной хроматографией (1.8 x 25 см, элюция градиентом концентрации метанола в воде, 0 % - 30 %, 800 мл, скорость элюции 6 мл/мин). Выход 288 мг (1.14 ммоль, 63 %).

УФ: λ_{max} 260 нм, 216 нм.

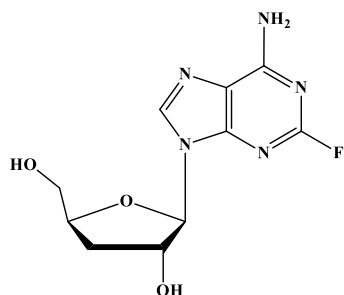
ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{10}H_{13}N_4O_4$ 253.0937, найдено 253.0949.

1H -NMR: 12.29 (с, 1H, NH), 8.33 (с, 1H, H-8), 8.06 (с, 1H, H-2), 5.87 (д, $J = 1.6$, 1H, H-1'), 5.68 (ушир. с, 1H, OH-2'), 5.02 (ушир. с., 1H, OH-5'), 4.54 – 4.49 (м, 1H, H-2'), 4.40 - 4.34 (м, 1H, H-4'), 3.74-3.57 (м, 1H, H-5'), 3.56-3.50 (м, 1H, H-5'), 2.4 - 2.21 (м, 1H, H-3'), 1.91 (ддд, $J = 2.5, 6.0, 13.1$, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 156.50 (C6), 147.59 (C4), 145.62 (C2), 138.05 (C8), 124.19 (C5), 90.65 (C1'), 80.94 (C4'), 75.07 (C2'), 62.18 (C5'), 33.78 (C3').

^{15}N NMR: 249.0 (N7), 214.5 (N3), 177.9 (N9), 175.0 (N1).

9-(3'-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-2-фтораденин (7)



2-Фтораденозин **6** (90 мг, 0.32 ммоль) растворили в 315 мл воды при нагревании и перемешивании. Раствор охладили до 50 °С и добавили 120 мг (0.48 ммоль) соединения **5** и 85 мг (0.625 ммоль) KH_2PO_4 . pH довели до 7.0, добавили 1720 е.а. PNP и выдерживали реакционную смесь при 52 °С в течение 12 дней при периодическом перемешивании. Раствор сконцентрировали и выделили целевой продукт обращенно-фазовой колоночной хроматографией (2.5×19 см, элюция 10% водным этанолом, скорость потока 5 мл/мин). Выход 49 мг (0.182 ммоль, 58%). Чистота 97.83 %.

УФ: λ_{max} 262 нм, 205 нм.

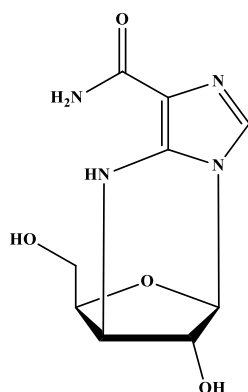
ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_5\text{O}_3$ 270.1002, найдено 270.1014.

^1H -NMR: 8.34 (с, 1H, H-8), 7.79 (с, 2H, 6-NH₂), 5.77 (д, $J = 1.9$, 1H, H-1'), 5.67 (д, $J = 3.5$, 1H, OH-2'), 5.00-4.96 (м, 1H, 5'-OH), 4.55 – 4.51 (м, 1H, H-2'), 4.38 – 4.33 (м, 1H, H-4'), 3.72 – 3.67 (м, 1H, H-5'), 3.58 – 3.50 (м, 1H, H-5'), 2.25 – 2.19 (м, 1H, H-3'), 1.93 – 1.87 (м, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 158.99 (C2), 158.01 (C6), 150.58 (C4), 139.72 (C8), 117.84 (C5), 91.16 (C1'), 81.38 (C4'), 75.21 (C2'), 62.83 (C5'), 34.37 (C3').

^{15}N NMR: 241.9 (N7), 174.5 (N9), 87.6 (NH₂).

Циклонуклеозид (8)



Выделен из реакционной смеси синтеза 9-(3-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-2-фтораденина **7** колоночной на Separon SGX C18 (3×16 см, элюция градиентом концентрации этанола в воде, 0% - 80%, 400 мл, скорость потока 4 мл/мин). Выход 10.6 мг (0.04 ммоль, 24%) как лиофилизированный порошок; чистота 99%.

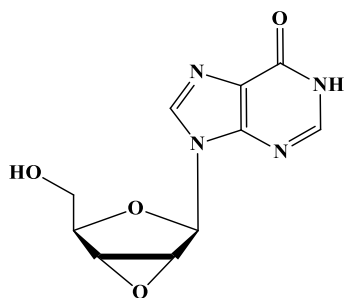
ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4$ 241.0937, найдено 241.0928.

$^1\text{H-NMR}$: 7.11 (с, 1 H, H-2), 6.38 (д, $J = 4.4$, 1 H, NH), 5.94 (уш. с, 1 H, OH-2'), 5.57 (д, $J < 0.5$, 1 H, H-1'), 5.38 (уш. с, 2 H, NH_2), 4.75-4.67 (м, 1 H, OH-5'), 4.49-4.46 (м, 1 H, H-2'), 4.26-4.22 (м, 1 H, H-4'), 3.71-3.67 (м, 1 H, H-3'), 3.56-3.50 (м, 1 H, H-5a'), 3.48-3.43 (м, 1 H, H-5b').

$^{13}\text{C NMR}$: 165.51 (C=O), 139.27 (C5), 127.08 (C2), 111.01 (C4), 85.20 (C4'), 84.03 (C1'), 73.15 (C2'), 60.12 (C5'), 56.22 (C3').

$^{15}\text{N NMR}$: 307.8 (NH), 253.5 (N3), 178.1 (N1), 76.0 (NH_2).

2', 3'-Ангидроинозин (9)



Соединение **3** (865 мг, 2.08 ммоль) растворили в 6 мл метанола и добавили 4 мл 25% водного раствора NH_4OH . Через 48 ч при комнатной температуре раствор сконцентрировали и осадок высушили над P_2O_5 . Выход составил 325 мг. Целевое соединение выделяли перекристаллизацией из воды, выход 250 мг (1 ммоль, 48%) с чистотой 96.5%.

ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4$ 251.0780, найдено 251.0765.

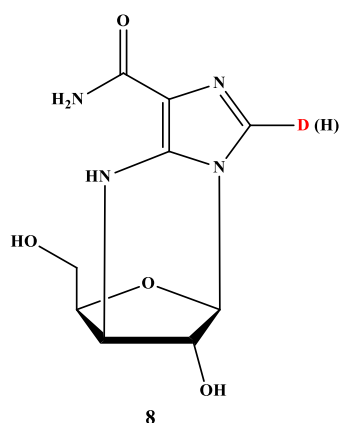
$^1\text{H-NMR}$: 12.39 (с, 1H, NH), 8.29 (с, 1H, H-8), 8.09 (с, 1H, H-2), 6.18 (д, $J < 0.5$, 1H, H-1'), 5.07 – 5.02 (м, 1 H, OH-5'), 4.46 (д, $J = 2.3$, 1H, H-2'), 4.20 (д, $J = 2.0$, 1H, H-3'), 4.19 (д, $J = 2.0$, 1H, H-4'), 3.58 – 3.51 (м, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$: 156.48 (C=O), 147.97 (C4), 145.64 (C2), 138.75 (C8), 124.07 (C5), 81.73 (C1'), 60.45 (C5'), 58.16 (C3'), 57.39 (C2').

$^{15}\text{N NMR}$: 249.8 (N7), 214.6 (N3), 176.4 (N9), 175.1 (N1).

Соединения 8, 10, 12.

Соединение **9** (58 мг, 0.23 ммоль) и KH_2PO_4 (20 мг, 0.15 ммоль) растворили в D_2O (30 мл) (pH 4.1) и инкубировали при 50 °C. Через 96 ч раствор сконцентрировали до 3 мл, центрифугировали и выделяли целевые соединения на колонке HPLC PerfectSil Target (MZ-Analysentechnik, Germany), 20×250 мм, скорость потока 4 мл/мин, элюция водным метанолом в градиенте 7-15%. Выход соединения **8** – 10 мг (0.04 ммоль), **10** – 5 мг (0.002 ммоль, 9%), соединения **12** – 8 мг (0.03 ммоль, 13%).



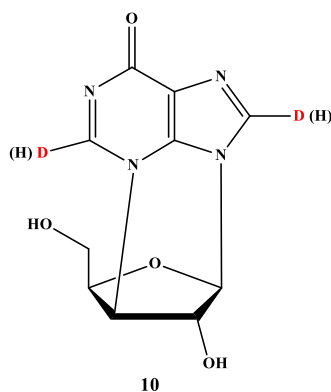
ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_9H_{13}N_4O_4$ 241.0937, найдено 241.0955; вычислено для $C_9H_{12}DN_4O_4$ 242.0994, найдено 242.1026.

1H -NMR: 7.12 (с, 0.18 H, H-8), 6.69 и 6.61 (2с, 2 $CONH_2$), 6.39 (д, $J = 4.4$, 1H, NH), 5.57 (д, $J < 0.5$, 1 H, H-1'), 4.71 (уш. с, 0.36H, OH-5), 4.48 (уш. с, 1H, H-2'), 4.25 (дт, $J = 3.2$, 6.6, 6.6, 1H, H-4'), 3.70 (м, 1H, H-3'), 3.54 (дд, $J = 7.0$, 11.3, 1H, CH-5'a), 3.46 (дд, $J = 6.5$, 11.3, 1H, CH-5'b).

2H -NMR: 7.12 (с, D-8).

^{13}C NMR: 165.46 (C=O), 139.19 (C5), 127.03 (C2), 126.79 (т, $J = 18.5$, C2-D), 110.91 (C4), 120.27 (C5), 85.14 (C4'), 83.96 (C1'), 73.09 (C2'), 60.07 (C5'), 56.16 (C3').

^{15}N NMR: 253.3 (N3), 177.9 (N1), 95.3 (NH_2), 56.9 (NH).



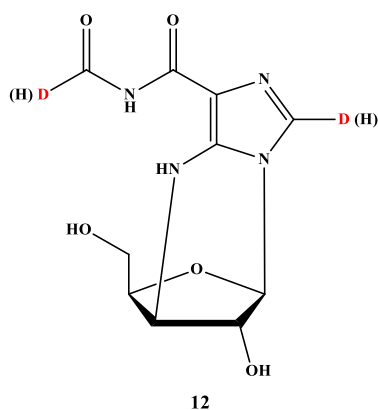
ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{10}H_{11}N_4O_4$ 251.0775, найдено 251.0797; вычислено для $C_{10}H_{10}DN_4O_4$ 252.0838, найдено 252.0868, вычислено для $C_{10}H_9D_2N_4O_4$ 253.0900, найдено 253.0914.

1H -NMR: 8.16 (с, 0.66 H, H-8), 7.97 (с, 0.18 H, H-2), 6.08 (д, $J < 1$, 1H, H-1'), 5.07 (д, $J = 3.1$, 1 H, H-3'), 4.86-4.84 (м, 1H, H-2'), 4.64-4.60 (м, 1H, H-4'), 3.41 (дд, $J = 6.1, 11.1$, 1H, CH-5'a), 2.98 (дд, $J = 7.6, 11.1$, 1H, CH-5'b).

2H -NMR: 8.16 (с, 0.34H, D-8), 7.97 (с, 0.82H, D-2).

^{13}C NMR: 163.36 (C=O), 143.94 (C2), 136.99 (C4), 134.39 (C8), 134.16 (т, $J = 38$, C8-D), 120.27 (C5), 85.36 (C1'), 84.29 (C4'), 73.49 (C2'), 61.07 (C3'), 59.09 (C5').

^{15}N NMR: 266.0 (N1), 252.3 (N7), 174.9 (N9), 135.4 (N3).



ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{10}H_{13}N_4O_5$ 269.0880, найдено 269.0896; вычислено для $C_{10}H_{12}DN_4O_5$ 270.0943, найдено 270.0972, вычислено для $C_{10}H_{11}D_2N_4O_5$ 271.1006, найдено 271.1035.

1H -NMR: 10.11 (с, 1H, CO-NH), 9.11 (с, 0.1H, C(O)H), 7.28 (с, 0.19H, H-2), 7.11 (д, $J = 4.7$, 1H, C5-NH), 6.03 (уш.с, 1H, OH-2'), 5.64-5.62 (м, 1H, H-1'), 4.78-4.79 (м, 1H, OH-5'), 4.34-4.30 (м, 1H, H-4'), 3.78-3.75 (м, 1H, H-3'), 3.56 (дд, $J = 6.7, 11.3$, 1H, H-5'a), 3.49 (дд, $J = 6.9, 10.8$, 1H, H-5'b).

2H -NMR: 9.11 (с, 0.9H, C(O)H), 7.28 (с, 0.91H, D-2).

^{13}C NMR: 162.29 (с, 0.1C, (C=O)H), 162.09 (т, $J = 30.1$, 0.1C, (C=O)H), 161.74 (с, 1C, C=O), 143.29 (C5), 128.87 (с, 0.19C, C2-H), 128.66 (т, $J = 33.2$, 0.81C, C2-D), 108.65 (C4), 85.87 (C4'), 84.02 (C1'), 72.57 (C2'), 60.10 (C5'), 55.97 (C3').

^{15}N NMR: 250.3 (N3), 179.3 (N1), 158.8 (CO-NH), 64.3 (C5-NH).

9-(3'-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-2-фтораденин (7)

2-Фтораденозин **6** (152 мг, 0.53 ммоль) растворили в 100 мл воды при нагревании и перемешивании. Раствор охладили до 50 °C и добавили 200 мг (0.79 ммоль) соединения **5** и 27.2 мг (0.2 ммоль) KH_2PO_4 . pH довели до 7.0, добавили 1900 е.а. PNP и выдерживали реакционную смесь при 52 °C в течение 76 дней при периодическом перемешивании. Раствор сконцентрировали и выделили целевой продукт обращенно-фазовой колоночной хроматографией (2.5×19 см, элюция 10% водным этанолом, скорость потока 5 мл/мин). Выход 111 мг (0.41 ммоль, 78%). Чистота 97.83 %.

ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{10}H_{13}FN_5O_3$ 270.1002, найдено 270.1016.

Данные спектров ЯМР совпадают с данными, представленными выше для соединения **7**.

9-(3'-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-2-фтораденин (7)

2-Фтораденозин (18.4 мг, 0.06 ммоль) растворили в 100 мл воды при нагревании и перемешивании. Добавили 40.7 мг (0.18 ммоль) 1-альфа фосфата 3-дезоксирибозы **13** и 136 мг

(1 ммоль) KH_2PO_4 , pH довели до 8.0, добавили 1050 е.а. PNP, реакционную смесь инкубировали при 50 °C в течение 3 дней при периодическом перемешивании. Реакцию остановили добавлением 20 мл метанола. Раствор сконцентрировали и целевой продукт **7** выделили обращенно-фазовой хроматографией на Separon SGX C18 (3×16 см, элюция градиентом концентрации метанола в воде, 0% - 30%, 300 мл, скорость потока 4 мл/мин). Фракции, содержащие соединение **7**, объединили, упарили и лиофилизовали. Выход целевого соединения **7** - 10.7 мг (66%), чистота по данным ВЭЖХ – 99.0%.

ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_5\text{O}_3$ 270.1002, найдено 270.1011.

Данные спектров ЯМР совпадают с данными, представленными выше для соединения **7**.

9-(3'-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-2-фтораденин (**7**)

2-Фторадеозин **6** (100 мг, 0.35 ммоль) растворили в 8 мл ацетонитрила. К полученному раствору добавили 0.26 мл (1.77 ммоль) α-ацетоксиизобутирилбромида в 0.7 мл 90% водного ацетонитрила. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе хлороформ-метанол, 9:1. Через сутки добавили 8 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 (до слабощелочной реакции).

Раствор сконцентрировали до 5 мл. К остатку добавили 10 мл хлороформа, водный слой промыли хлороформом (3×10 мл), объединенные органические слои промыли 0.1 М раствором бикарбоната триэтиламмония (2 × 10 мл), высушили Na_2SO_4 и сконцентрировали.

Промежуточные соединения **14** и **15** выделили колоночной хроматографией (колонка 15×170 мм) в градиенте концентрации метанола в хлороформе (0 - 4%, по 150 мл каждого). Суммарный выход защищенных продуктов - 105.9 мг (60%). Содержание соединений **14** и **15** в смеси составляло 80% и 20 %, соответственно, по данным ВЭЖХ.

ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{BrFN}_5\text{O}_7$ (**14**) 518.0608, 520.0588, найдено 518.0708, 520.0701, вычислено для $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BrFN}_5\text{O}_7$ (**15**) 432.0241, 434.0220, найдено 432.0341, 434.01250.

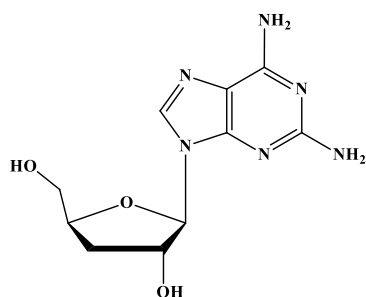
Суспензию 134 мг 10% палладия на угле поместили в 11 мл метанола и пропускали ток водорода (до прекращения насыщения катализатора водородом) в течение 1 часа при перемешивании. Добавили 160 мг карбоната кальция, через 1 час добавили раствор 106 мг (0.21 ммоль) смеси соединений **14** и **15** в 20 мл метанола и продолжали пропускать водород при перемешивании. За ходом реакции следили при помощи ТСХ в системе этилацетат-этанол, 3:2 и ВЭЖХ в Системе 1. По окончании реакции (10 часов) реакционную смесь перенесли на фильтр с цеолитом, отфильтровали и осадок промыли метанолом (50 мл). Фильтрат упарили, добавили 10 мл хлороформа, водный слой промыли хлороформом (3 × 10 мл), объединенные органические слои промыли 0.1 М раствором бикарбоната триэтиламмония (2 × 10 мл), высушивали Na_2SO_4 и упарили досуха.

Остаток (84 мг) растворили в 1 мл метанола и добавили 2 мл 25% водного раствора аммиака. За ходом реакции следили при помощи ТСХ в системе хлороформ-метанол, 9:1. Через 1 час реакционную смесь упарили досуха и остаток растворили в воде. Целевой продукт выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией на Separon SGX C18 (1.8 x 25 см, элюция градиентом концентрации метанола в воде, 0 % - 30 %, 200 мл, скорость элюции 6 мл/мин). Фракции, содержащие продукт **7**, объединили, упарили и лиофилизовали. Выход целевого соединения **7** - 31.5 мг (34%), чистота по данным ВЭЖХ – 97.8%.

ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{10}H_{13}FN_5O_3$ 270.1002, найдено 270.1017.

Данные спектров ЯМР совпадают с данными, представленными выше для соединения **7**.

9-(3'-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-2,6-диаминопурин (**16**)



Фракции, содержащие соединение **16**, объединили, упарили и лиофилизовали. Выход соединения **16** - 1.5 мг (2%), чистота по данным ВЭЖХ – 99.9%.

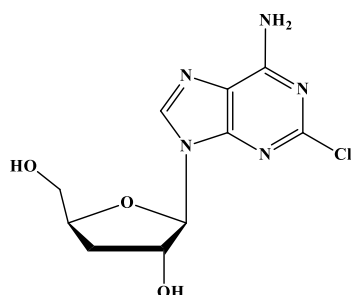
ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{10}H_{14}N_6O_3$ 267.1127, найдено 267.1213.

1H -NMR: 8.50 (с, 1H, H-2), 7.69 (д, $J = 8.0$, 1H, H-7), 7.67 (д, $J = 7.8$, 1H, H-4), 7.30 - 7.26 (м, 1H, H-5), 7.26 - 7.22 (м, 1H, H-6), 5.88 (д, $J = 2.4$, 1H, H-1'), 5.71 (д, $J = 3.5$, 1H, 2'-OH), 5.03 (т, $J = 5.4$, 1H, 5'-OH), 4.47 - 4.43 (м, 1H, H2'), 4.41 - 4.36 (м, 1H, H4'), 3.74 - 3.69 (м, 1H, H-5'), 3.58 - 3.54 (м, 1H, H-5'), 2.23 - 2.17 (м, 1H, H-3'), 1.92 (ддд, $J = 3.0, 6.4, 9.2$, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 144.24 (C9), 142.15 (C2), 133.21 (C8), 122.97 (C5), 122.38 (C6), 119.98 (C7), 111.52 (C4), 92.36 (C1'), 80.77 (C4'), 75.06 (C2'), 62.75 (C5'), 34.23 (C3').

^{15}N NMR: 245.8 (N3), 166.6 (N1).

9-(3-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-2-хлораденин (**17**)



2-Хлораденин (50 мг, 0.295 ммоль) растворили в 660 мл воды при нагревании и перемешивании. Раствор охладили до 50 °С, добавили соединение **5** и 180 мг (1.323 ммоль) KH_2PO_4 . pH довели до 7.0, добавили 1320 е.а. PNP и выдерживали реакционную смесь при 50 °С в течение 6 дней при периодическом перемешивании. Раствор сконцентрировали; целевой продукт выделили колоночной обращенно-фазовой хроматографией на Silica gel 100 C18 (2.5×19 см, элюция 10% водным этанолом, скорость элюции 5 мл/мин). Выход 34 мг (0.119 ммоль, 40%). Чистота 97.23 %.

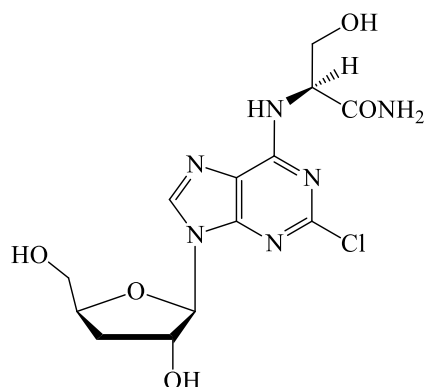
УФ: λ_{max} 264 нм, 214 нм.

ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_5\text{O}_3$ 288.0677, 286.0707, найдено 288.0691, 286.0721.

^1H -NMR: 8.38 (с, 1H, H-8), 7.77 (с, 2H, 6-NH₂), 5.80 (д, $J = 1.9$, 1H, H-1'), 5.66 (д, $J = 3.5$, 1H, OH-2'), 4.99 (м, 1H, OH-5'), 4.55 – 4.50 (м, 1H, H-2'), 4.38 – 4.33 (м, 1H, H-4'), 3.69 – 3.53 (м, 2H, H-5'), 2.25 – 2.19 (м, 1H, H-3'), 1.93 – 1.88 (м, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 157.18 (C6), 150.36 (C4), 139.83 (C8), 118.55 (C5), 91.15 (C1'), 81.36 (C4'), 75.17 (C2'), 62.77 (C5'), 34.21 (C3').

9-(3-дезокси-β-D-рибофуранозил)-2-хлор-6-N-[L-сериламидо]-кордицепин (**18**)



2-хлор-6-N-[L-сериламидо]-9-β-D-рибофуранозиладенин (107.2 мг, 1 ммоль) растворили в 277 мл воды. Добавили 210 мг (3 ммоль) соединения **5** и 75.9 мг (0.554 ммоль) KH_2PO_4 . pH довели до 7.0, добавили 1562 е.а. PNP и инкубировали смесь при 52 °С в течение 18 дней при периодическом перемешивании. Раствор сконцентрировали и выделили целевой продукт **18** обращенно-фазовой хроматографией на Silica gel 100 C18 (3.5×4.5 см, элюция градиентом концентрации метанола в воде, 0 – 20 %, 600 мл, скорость элюции 9 мл/мин). Выход 53.7 мг (0.144 ммоль, 52 %). Чистота 85.35%.

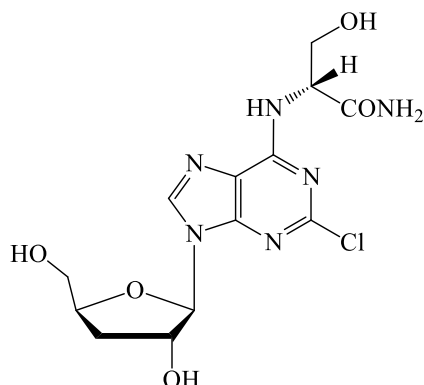
УФ: λ_{max} 262 нм, 205 нм.

ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_5\text{Cl}$ 373.1001, 371.1037, найдено 373.1006, 371.1036.

$^1\text{H-NMR}$: 8.45 (с, 1H, H-8), 7.57 (д, $J = 6.3$, 1H, NH), 7.47 (с, 1H, NH_2), 7.16 (с, 1H, NH_2), 5.87 – 5.80 (м, 1H, H-1'), 5.73 – 5.63 (м, 1H, OH-2'), 5.09 – 4.95 (м, 1H, OH-5'), 4.61 (с, 1H, NH-CH), 4.55 – 4.50 (м, 1H, H-1'), 4.40 – 4.32 (м, 1H, H-4'), 3.80 (с, 2H, CH_2 (Ser)), 3.73 – 3.67 (м, 1H, H-5'), 3.57 – 3.50 (м, 1H, H-5'), 2.26 – 2.16 (м, 1H, H-3'), 1.90 (м, 1H, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$: 140.25 (C8), 91.28 (C1'), 81.55 (C4'), 75.35 (C2'), 62.76 (C5'), 62.10 (CH_2 Ser), 56.81 (CH Ser), 34.23 (C3').

9-(3-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-2-хлор-6-N-[D-сериламидо]-кордицепин (19)



2-хлор-6-N-[D-сериламидо]-9-β-D-рибофуранозиладенин (38.8 мг, 0.1 ммоль) растворили в 100 мл воды. Добавили 236 мг (0.93 ммоль) нуклеозида **5** и 27.2 мг (0.2 ммоль) KH_2PO_4 . pH довели до 7.0, добавили 1450 е.а. PNP, раствор инкубировали при 52 °C в течение 14 дней. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ в системе 2. Процесс проводили до конверсии 90%. Смесь упарили до 5 мл, полученный раствор отфильтровали и выделили целевой продукт с помощью препаративной ВЭЖХ. Элюент А - H_2O , элюент В - 50% MeOH в H_2O , скорость потока – 4 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт **19**, объединили и лиофилизовали. Выход 24 мг (0.06 ммоль, 64%). Чистота 90%

УФ: λ_{max} 213 нм, 270 нм, λ_{min} 202 нм, 234 нм.

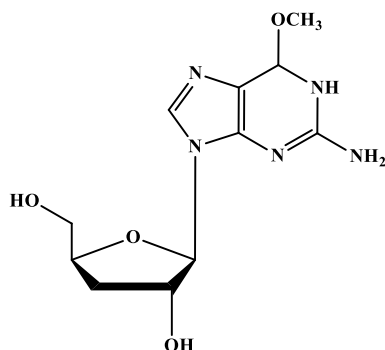
ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{ClN}_6\text{O}_5$ 373.0983, 375.0998, найдено 373.1030, 375.1000

$^1\text{H-NMR}$: 8.46 (с, 1 H, H-8), 7.65 и 7.57 (2 с, 0.2 H и 0.8 H, NH-CH), 7.49 и 7.44 (2 с, 1 H, CO-NH), 7.18 и 7.13 (2 с, 1 H, CO-NH), 5.84 (д, $J = 2.0$, 1 H, H-1'), 5.77-5.61 (уш. с., 1 H, OH-2'), 5.42-5.35 (м, 0.2 H, CH-NH), 5.14-4.89 (уш. с, 2 H, OH-Ser, OH-5'), 4.67-4.58 (м, 0.8 H, CH-NH), 4.56-4.51 (м, 1 H, H-2'), 4.40-4.36 (м, 1 H, H-4'), 3.85-3.74 (м, 2 H, CH_2 -Ser), 3.71 (дд, $J = 3.2, 11.7$, 1 H, H-5a'), 3.54 (дд, $J = 3.8, 12.0$, 1 H, H-5b'), 2.23 (ддд, $J = 5.6, 9.3, 14.5$, 1 H, H-3a'), 1.91 (ддд, $J = 2.4, 6.0, 13.1$, 1 H, H-3b').

$^{13}\text{C NMR}$: 171.26 (C=O), 154.48 (C6), 152.69 (C2), 149.17 (C4), 139.59 (C8), 118.61 (C5), 90.60 (C1'), 80.96 (C4'), 74.73 (C2'), 62.19 (C5'), 61.53 (CH_2 Ser), 56.0 (CH Ser), 33.73 (C3').

^{15}N NMR: 239.30 (N7), 174.7 (N9), 105.5 (NH_2), 91.2 (NH).

6-О-метокси-3'-дезоксигуанозин (20)



97 мг (0.38 ммоль) соединения **5**, 50 мг (0.17 ммоль) 6-О-метокси-гуанозина и 27.4 мг (2 ммоль) KH_2PO_4 растворили в 170 мл воды. Довели pH до 7.0, добавили 1232 е.а. PNP и выдерживали реакционную смесь при 52 °С в течение 12 дней. Добавили 10 мл 1 мМ раствора арсената натрия. Время реакции арсенолиза 1.5 часа. Раствор сконцентрировали и выделили целевой продукт при помощи колоночной хроматографии на Separon SGX C18 (3×16 см, элюция градиентом концентрации этанола в воде, 0% - 70%, 500 мл, скорость потока 6.8 мл/мин). Выход 35 мг (0.12 ммоль, 71%) как лиофилизированный порошок; чистота 99%.

УФ: λ_{max} 279 нм, λ_{min} 226 нм.

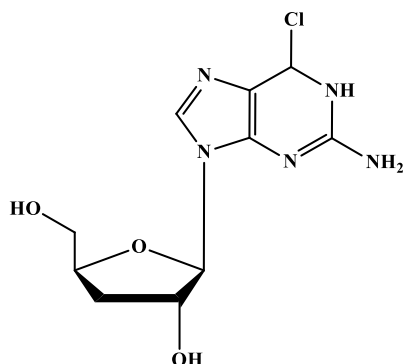
ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$ 282.11856, найдено 282.11876.

^1H -NMR: 8.10 (с, 1 H, H-2), 6.44 – 6.40 (уш. с., 2 H, NH), 5.77 (д, $J = 2.23$, 1 H, H-1'), 5.57 (д, $J = 2.59$, 1 H, OH-2'), 5.01 - 4.96 (м, 1 H, OH-5'), 4.52 - 4.46 (м, 1 H, H-2'), 4.34 – 4.29 (м, 1 H, H-4'), 3.97 (с, 3 H, OCH_3), 3.66 (ддд, $J = 11.8, 3.8, 3.9$, 1 H, H-5a'), 3.51 (ддд, $J = 11.9, 4.2, 4.3$, 1 H, H-5b'), 2.24 (ддд, $J = 14.6, 9.0, 5.8$, 1 H, H-3a'), 1.90 (ддд, $J = 13.2, 6.2, 2.9$, 1 H, H-3b').

^{13}C NMR: 160.58 (C6), 159.71 (C2), 153.60 (C4), 137.52 (C8), 113.84 (C5), 89.97 (C1'), 80.42 (C4'), 74.62 (C2'), 62.52 (C5'), 53.09 (OCH_3), 34.33 (C3').

^{15}N NMR: 240.9 (N7), 205.6 (N1), 188.4 (N3) 170.3 (N9), 81.3 (NH_2).

2-Амино-6-хлор-9-(3'-дезоксирибофуранозил)пурин (21)



2-Амино-6-хлор-9-(рибофуранозил)пурин **21a** (37.7 мг, 0.12 ммоль) растворили в 100 мл воды при нагревании и перемешивании. Раствор охладили до 50 °С и добавили 100 мг (0.4 ммоль) соединения **5** и 27.4 мг (2 ммоль) KH_2PO_4 . pH довели до 7.0, добавили 700 е.а. РНР и выдерживали реакционную смесь при 52 °С в течение 37 дней при периодическом перемешивании. Раствор сконцентрировали и выделили целевой продукт обращенно-фазовой колоночной хроматографией (2.5×19 см, элюция 10% водным этанолом, скорость потока 5 мл/мин). Выход 14.9 мг (0.052 ммоль, 42%).

УФ: λ_{max} 262 нм, 205 нм. Чистота 97.83 %.

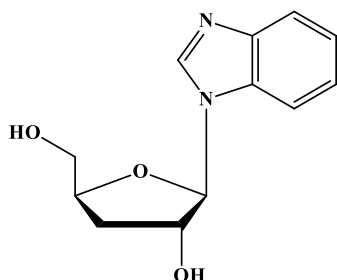
ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{O}_3$ 285.0629, найдено 285.1030.

^1H -NMR: 8.37 (с, 1H, H-8), 6.97 – 6.90 (уш. с, 2H, NH_2), 5.79 (д, $J = 2.0$, 1H, H-1'), 5.62 (д, $J = 4.0$, 1H, 2'-OH), 5.00 (м, 1H, 5'-OH), 4.55 - 4.51 (м, 1H, H-2'), 4.36 - 4.33 (м, 1H, H-4'), 3.70 - 3.66 (м, 1H, H-5'), 3.55 - 3.51 (м, 1H, H-5'), 2.27 - 2.22 (м, 1H, H-3'), 1.92 – 1.88 (м, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 160.23 (C6), 154.00 (C4), 149.87 (C2), 141.35 (C8), 123.92 (C5), 90.76 (C1'), 81.35 (C4'), 75.19 (C2'), 62.76 (C5'), 34.55 (C3').

^{15}N NMR: 241.8 (N7), 236.1 (N1), 199.3 (N3), 172.3 (N9), 83.8 (NH_2).

1-(β-D-3'-Дезокси-рибофуранозил)бензимидазол (30)



Бензимидазол **22** (271 мг, 2.29 ммоль) и 3'-дезоксиинозин **5** (64 мг, 0.25 ммоль) растворили в 200 мл 10 mM калий-фосфатного буфера, pH 7.0, добавили 4200 е.а. РНР и инкубировали при 50°С в течение 20 суток. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ в системе 1. Реакцию остановили при достижении конверсии 54% добавлением 20 мл этанола.

Раствор сконцентрировали до 5 мл, продукт **7** выделяли обращенно-фазовой хроматографией (колонка 15x170 мм) в градиенте концентрации метанола в воде (0 - 30%, по 300 мл каждого буфера). Для окончательной очистки использовали препаративную ВЭЖХ (элюент А - 0.1% водная ТФУ, элюент В - 70% ацетонитрил в 0.1% водной ТФУ, градиент концентрации 0 - 30% В, 4 часа). Фракции, содержащие соединение **30**, объединили, нейтрализовали водным раствором аммиака, сконцентрировали и обессолили с помощью обращенно-фазовой хроматографии (10x100 мм) в градиенте метанола в воде (0 - 50%, по 140 мл

каждого буфера). Фракции, содержащие целевой продукт **30**, объединили, упарили и лиофилизировали.

Выход составил 16 мг (0.07 ммоль, 27%), чистота по данным ВЭЖХ - 99%.

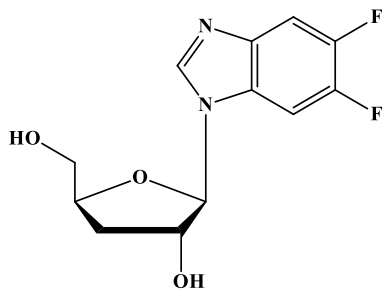
ESI/MS $[M-H]^-$: вычислено для $C_{12}H_{13}N_2O_3$ 233.0932, найдено 233.1180.

1H -NMR: 8.50 (с, 1H, H-2), 7.69 (д, $J = 8.0$, 1H, H-7), 7.67 (д, $J = 7.8$, 1H, H-4), 7.30 - 7.26 (м, 1H, H-5), 7.26 - 7.22 (м, 1H, H-6), 5.88 (д, $J = 2.4$, 1H, H-1'), 5.71 (д, $J = 3.5$, 1H, 2'-OH), 5.03 (т, $J = 5.4$, 1H, 5'-OH), 4.47-4.43 (м, 1H, H2'), 4.41-4.36 (м, 1H, H4'), 3.74 - 3.69 (м, 1H, H-5'), 3.58 - 3.54 (м, 1H, H-5'), 2.23 - 2.17 (м, 1H, H-3'), 1.92 (ддд, $J = 9.2$; 6.4; 3.0, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 144.24 (C9), 142.15 (C2), 133.21 (C8), 122.97 (C5), 122.38 (C6), 119.98 (C7), 111.52 (C4), 92.36 (C1'), 80.77 (C4'), 75.06 (C2'), 62.75 (C5'), 34.23 (C3').

^{15}N NMR: 245.8 (N3), 166.6 (N1).

5,6-Дифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)бензимидазол (**31**)



5,6-Дифтор-бензимидазол **23** (183 мг, 1.18 ммоль) и 3'-дезоксиинозин **5** (100 мг, 0.39 ммоль) растворили в 100 мл 10 mM калий-фосфатного буфера, pH 7.0, добавили 1400 е.а. PNP и инкубировали при 50 °C в течение 40 суток. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ в системе 1. Реакцию остановили при достижении конверсии 93% добавлением 20 мл этанола.

Реакционную смесь сконцентрировали до 5 мл и выделили целевое соединение **31** обращенно-фазовой хроматографией (колонка 15x170 мм) в градиенте концентрации метанола в воде (0 - 30%, по 150 мл каждого буфера). Фракции содержали соединение **31** в смеси с 5,6-дифторбензимидазолом **2**. Смесь сконцентрировали до минимального объема и выделили соединение **31** при помощи препаративной ВЭЖХ (элюент А - 0.1% водная ТФУ, элюент В - 40% ацетонитрил в 0.1% водной ТФУ, градиент концентрации 10 - 100% В, 3 часа). Фракции, содержащие соединение **31**, объединили, нейтрализовали водным раствором аммиака, сконцентрировали и обессолили с помощью обращенно-фазовой хроматографии (15x170 мм) в градиенте метанола в воде (0 - 60%, по 100 мл каждого буфера). Фракции, содержащие целевой продукт **31**, объединили, упарили и лиофилизировали.

Выход составил 33 мг (0.07 ммоль, 32%), чистота по данным ВЭЖХ - 99%.

ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{12}H_{13}F_2N_2O_3$ 271.0816, найдено 271.0888.

$^1\text{H-NMR}$: 8.57 (с, 1H, H-2), 7.91 (дд, $J = 11.0$; 10.8, 1H, H-7), 7.74 (дд, $J = 10.8$, 11.0, 1H, H-4), 5.85 (д, $J = 2.7$, 1H, H-1'), 5.70 (д, $J = 3.9$, 1H, 2'-OH), 5.10 (т, $J = 5.4$, 1H, 5'-OH), 4.45-4.41 (м, 1H, H2'), 4.40-4.36 (м, 1H, H4'), 3.75 - 3.70 (м, 1H, H-5'). 3.59 - 3.53 (м, 1H, H-5'), 2.23-2.16 (м, 1H, H-3'), 1.94-1.88 (м, 1H, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$: 147.35 (дд, $J = 44.8$, 239.7, C5), 146.28 (дд, $J = 44.8$, 232.4, C6), 144.06 (C2), 139.49 (д, $J = 10.8$, C9), 128.57 (д, $J = 11.2$, C8), 107.32 (C4), 100.19 (д, $J = 23.5$, C7), 92.55 (C1'), 80.87 (C4'), 74.90 (C2'), 62.53 (C5'), 33.79 (C3').

$^{15}\text{N NMR}$: 245.0 (N3), 168.4 (N1).

4,6-Дифтор-1-(β -D-3'-дезоксирибофуранозил)бензимидазол (**32**)

4,6-Дифтор-бензимидазол **24** (0.025 г, 0.16 ммоль) и 3'-дезоксинозин **5** (0.205 г, 0.81 ммоль) растворили в 190 мл 6 mM калий-фосфатного буфера, pH 7.0, добавили 1400 е.а. PNP и инкубировали при 50 °C в течение 40 суток.

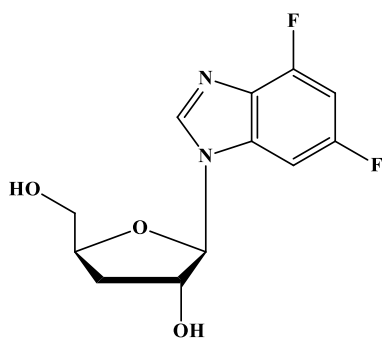
Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ в системах 1 и 2. Реакцию остановили при достижении конверсии 73% добавлением 20 мл этанола.

Раствор сконцентрировали до 5 мл и выделили соединения **32** обращенно-фазовой хроматографией (20x190 мм) в градиенте концентрации метанола в воде (0 - 40%, по 300 мл каждого). Фракции, содержащие соединения **32**, объединили, сконцентрировали и разделили препаративной ВЭЖХ. Условия: элюент А - 0.1% водная ТФУ, элюент В - 70% ацетонитрил в 0.1% водной ТФУ, градиент концентрации 40 - 100% В, 4 часа. Фракции, содержащие соединения **32a** и **32b**, нейтрализовали водным раствором аммиака, сконцентрировали и обессолили обращенно-фазовой хроматографией (15x140 мм) в градиенте метанола в воде (0 - 40%, по 150 мл каждого буфера). Фракции, содержащие продукты **32a** и **32b**, упарили и лиофилизировали.

Выход нуклеозида **32a** 4 мг (0.014 ммоль, 14%), **32b** - 3 мг (0.011 ммоль, 11%) с чистотой по данным ВЭЖХ 95% и 90%, соответственно.

ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3$ 271.0816, найдено 271.0848.

Описание спектров ЯМР для 4,6-дифтор-1-(β -D-3'-дезоксирибофуранозил)бензимидазола **32a** (N1-изомер):

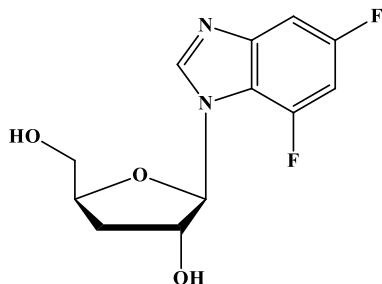


^1H NMR: 8.57 (с, 1H, H-2), 7.54 (дд, $J = 2.1$, 9.1, 1H, H-7), 7.11 (дт, $J = 2.1$; 10.8, 1H, H-5), 5.85 (д, $J = 2.2$, 1H, H-1'), 5.73 (br. с, 1H, 2'-OH), 5.09 (т, $J = 5.3$, 1H, 5'-OH), 4.44 – 4.41 (м, 1H, H-2'), 4.41 - 4.37 (м, 1H, H-4'), 3.76 – 3.71 (м, 1H, H-5'), 3.58 – 3.53 (м, 1H, H-5'), 2.21 - 2.16 (м, 1H, H-3'), 1.92 - 1.87 (м, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 158.14 (дд, $J = 11.2$, 238.5, C6), 152.46 (дд, $J = 15.3$, 253.1, C4), 142.79 (C2), 134.81 (дд, $J = 11.1$, 16.0, C8), 128.84 (д, $J = 16.4$, C9), 97.55 (дд, $J = 22.0$, 29.5, C5), 94.78 (дд, $J = 4.0$, 28.0, C7), 92.12 (C1'), 80.62 (C4'), 74.53 (C2'), 61.90 (C5'), 33.13 (C3').

^{15}N NMR: 235.5 (N3), 171.8 (N1).

Описание спектров ЯМР для 4,6-дифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)бензимидазола **32b** (N3-изомер):



^1H NMR: 8.68 (с, 1H, H-2), 7.38 (дд, $J = 2.3$, 9.2, 1H, H-7), 7.20 (дт, $J = 2.2$, 11.7, 1H, H-5), 6.00-5.98 (уш. с, 1H, H-1'), 5.68 (д, $J = 3.8$, 1H, 2'-OH), 5.04 (т, $J = 5.0$, 1H, 5'-OH), 4.50 – 4.47 (м, 1H, H-2'), 4.41 - 4.37 (м, 1H, H-4'), 3.74 – 3.70 (м, 1H, H-5'), 3.57 – 3.53 (м, 1H, H-5'), 2.18 - 2.12 (м, 1H, H-3'), 1.91 - 1.84 (м, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 157.54 (дд, $J = 11.0$, 237.0, C6), 147.73 (дд, $J = 15.5$, 248.7, C4), 146.34 (дд, $J = 5.5$, 14.4, C8), 143.79 (с, C2), 117.61 (д, $J = 10.3$, C9), 101.57 (дд, $J = 4.1$, 23.9, C7), 98.72 (дд, $J = 22.6$, 30.5, C5), 92.80 (д, $J = 3.6$, C1'), 80.93 (C4'), 75.43 (C2'), 61.85 (C5'), 33.34 (C3').

^{15}N NMR: 245.9 (N3), 167.3 (N1).

4,5,6-Трифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)бензимидазол (33)

4,5,6-Трифтор-бензимидазол **25** (110 мг, 0.64 ммоль) и 3'-дезоксиинозин **5** (32.37 мг, 0.13 ммоль) растворили в 100 мл 2 mM калий-фосфатного буфера, pH 7.0, добавили 2800 е.а. PNP и

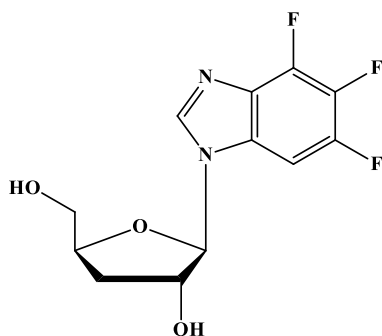
инкубировали при 50°C в течение 40 суток. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ в системе 1. Реакцию остановили при достижении конверсии 58% добавлением 20 мл этанола.

Реакционную смесь сконцентрировали до 5 мл и выделили соединения **33** обращенно-фазовой хроматографией (колонка 15x170 мм) в градиенте концентрации метанола в воде (0 - 30%, по 150 мл каждого буфера). Фракции содержали смесь продуктов и 4,5,6-трифторбензимидазола. Смесь сконцентрировали до минимального объема и выделили соединения **33** препаративной ВЭЖХ (элюент А - 0.1% водная ТФУ, элюент В - 40% ацетонитрил в 0.1% водной ТФУ, градиент концентрации 10 - 100% В, 3 часа). Фракции, содержащие целевой нуклеозид **33a** и минорный нуклеозид **33b**, нейтрализовали водным раствором аммиака, сконцентрировали и обессолили с помощью обращенно-фазовой хроматографии (15x170 мм) в градиенте метанола в воде (0 - 60%, по 100 мл каждого буфера). Фракции, содержащие соединения **33a** и **33b**, упарили и лиофилизировали.

Выход нуклеозида **33a** составил 11 мг (0.038 ммоль, 30%), **33b** – 6 мг (0.021 ммоль, 16%) с чистотой по данным ВЭЖХ – 98% и 99%, соответственно.

ESI/MS $[M+H]^+$: вычислено для $C_{12}H_{12}F_3N_2O_3$ 289.0722, найдено 289.0796.

Описание спектров ЯМР для 4,5,6-трифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)бензимидазола **33a** (N1-изомер):

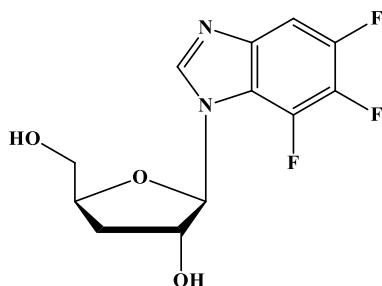


1H -NMR: 8.65 (с, 1H, H-2), 7.85 - 7.82 (м, 1H, H-7), 5.87 (д, $J = 2.3$, 1H, H-1'), 5.72 (д, $J = 3.4$, 1H, 2'-OH), 5.13 (т, $J = 5.1$, 1H, 5'-OH), 4.44-4.42 (м, 1H, H2'), 4.41-4.39 (м, 1H, H4'), 3.77 - 3.72 (м, 1H, H-5'). 3.58 - 3.53 (м, 1H, H-5'), 2.22-2.17 (м, 1H, H-3'), 1.93-1.88 (м, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 147.23 (C6), 144.37 (C2), 140.96 (C4), 137.10 (C9), 136.92 (C5), 129.21 (C8), 95.96 (C7), 92.63 (C1'), 81.20 (C4'), 75.02 (C2'), 62.35 (C5'), 33.54 (C3').

^{15}N NMR: 236.0 (N3), 171.2 (N1).

Описание спектров ЯМР для 5,6,7-трифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил)бензимидазола **33b** (N3-изомер):

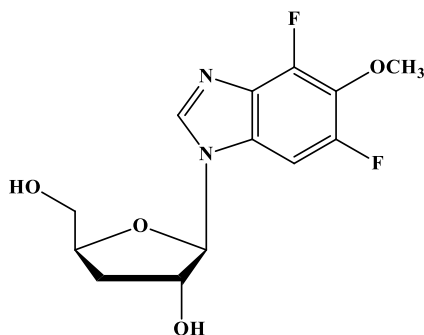


$^1\text{H-NMR}$: 8.71 (с, 1H, H-2), 7.68 - 7.65 (м, 1H, H-7), 5.99 (уш. с, 1H, H-1'), 5.71 (д, $J = 4.4$, 1H, 2'-OH), 5.05 (т, $J = 5.4$, 1H, 5'-OH), 4.52 (уш. с, 1H, H-2'), 4.44-4.39 (м, 1H, H-4'), 3.75-3.70 (м, 1H, H-5'), 3.57-3.52 (м, 1H, H-5'), 2.18-2.12 (м, 1H, H-3'), 1.91-1.86 (м, 1H, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$: 147.46 (C6), 144.49 (C2), 139.97 (C8), 137.84 (C4), 136.65 (C5), 118.13 (C9), 103.06 (C7), 93.38 (д, $J = 3.3$, C1'), 81.65 (C4'), 75.95 (C2'), 62.38 (C5'), 33.84, C3').

$^{15}\text{N NMR}$: 245.8 (N1), 169.8 (N3).

4,6-Дифтор-5-метокси-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил) бензимидазол (34)



4,6-Дифтор-5-метокси-бензимидазол **26** (230 мг, 0.12 ммоль) и 3'-дезоксиинозин **5** (215 мг, 0.85 ммоль) растворили в 100 мл 6 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7.0, добавили 2100 е.а. PNP и инкубировали при 50°C в течение 48 часов. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ в системе 1. Реакцию остановили при достижении конверсии 86% добавлением 50 мл этанола.

Раствор сконцентрировали до минимального объема и выделили соединение **34** обращенно-фазовой хроматографией (20x200 мм) в градиенте концентрации метанола в воде (0 - 40%, по 250 мл каждого). Фракции, содержащие целевой продукт **34**, объединили, упарили и лиофилизировали.

Выход нуклеозида **34** составил 20 мг (0.067 ммоль, 58%) с чистотой 95% по данным ВЭЖХ.

ESI/MS $[\text{M-H}]^-$: вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4$ 299.0922, найдено 299.0954.

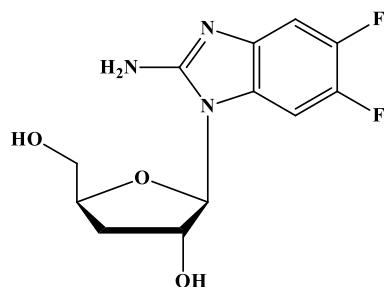
$^1\text{H NMR}$: 8.55, (с, 1H, H-2), 7.63 (д, $J = 10.4$, 1H, H-7), 5.83 (д, $J = 2.4$, 1H, H-1'), 5.70 (д, $J = 3.6$, 1H, 2'-OH), 5.09 (т, $J = 5.3$, 1H, 5'-OH), 4.43 - 4.40 (м, 1H, 2'-OH), 4.40 - 4.37 (м, 1H, H-4'),

3.91 (с, 3H, H-10), 3.75 - 3.72 (м, 1H, H-5'), 3.58 – 3.54 (м, 1H, H-5'), 2.22 - 2.15 (м, 1H, H-3'), 1.90 (ддд, $J = 2.9, 6.3, 9.5$, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 152.99 (C6), 146.52 (C4), 143.46 (C2), 132.13 (C5), 129.68 (C9), 129.26 (C8), 95.39 (C7), 92.58 (C1'), 81.06 (C4'), 74.97 (C2'), 62.91 (C10), 62.43 (C5'), 33.65 (C3').

^{15}N NMR: 236.0 (N3), 169.9 (N1).

2-Амино-5,6-дифтор-1-(β-D-3'-дезоксирибофуранозил) бензимидазол (37)



2-Амино-5,6-дифтор-бензимидазол **29** (601 мг, 3.5 ммоль) и 3'-дезоксинозин **5** (100 мг, 0.4 ммоль) растворили в 200 мл 9 mM калий-фосфатного буфера, pH 7.0, добавили 3500 е.а. PNP. Реакционную смесь инкубировали при 50°C в течение 30 суток. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ в системе 1. Реакцию остановили при достижении значения конверсии 62% добавлением 50 мл этанола.

Раствор сконцентрировали до минимального объема и выделили соединение **37** обращенно-фазовой хроматографией (20 x 190 мм) в градиенте концентрации метанола в воде (0 - 40%, по 400 мл каждого). Фракции, содержащие смесь нуклеозида **37** и исходного 2-амино-5,6-дифтор-бензимидазола, сконцентрировали и выделили соединение **37** препаративной ВЭЖХ. Условия хроматографии: элюент А - вода, элюент В - 50% водный метанол, градиент концентрации 40 - 100% В, 4 часа. Фракции, содержащие целевой продукт, объединили, упарили и лиофилизировали.

Выход нуклеозида составил 8.5 мг (0.03 ммоль, 8%) с чистотой 97% по данным ВЭЖХ.

ESI/MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3$ 286.0925, найдено 286.0951.

^1H NMR: 7.45 (дд, $J = 7.5, 11.2$, 1H, H-4), 7.09 (дд, $J = 7.4, 11.3$, 1H, H-7), 6.65 (с, 2H, H-10), 5.63 (д, $J = 5.5$, 1H, H-1'), 5.51 (д, $J = 4.8$, 1H, 2'-ОН), 5.36 (т, $J = 4.6$, 1H, 5'-ОН), 4.50 – 4.45 (м, 1H, H-2'), 4.28 – 4.24 (м, 1H, H-4'), 3.69 - 3.65 (м, 1H, H-5'), 3.55 – 3.50 (м, 1H, H-5'), 2.33 (ддд, $J = 6.3, 8.0, 13.1$, 1H, H-3'), 1.95 (ддд, $J = 6.3, 8.0, 13.1$, 1H, H-3').

^{13}C NMR: 156.27 (с, C2), 146.01 (дд, $J = 14.5, 234.4$, C5), 144.05 (дд, $J = 14.5, 232.1$, C6), 139.14 (д, $J = 10.6$, C9), 128.99 (д, $J = 12.0$, C8), 102.76 (д, $J = 20.1$, C7), 98.62 (д, $J = 23.5$, C4), 91.12 (с, C1'), 77.88 (с, C4'), 71.64 (с, C2'), 62.69 (с, C5'), 34.83 (с, C3').

^{15}N NMR: 194.6 (N3), 133.1 (N1), 60.6 (N10).

3.2 Биологические эксперименты

3.2.1 Оценка противоопухолевой активности

Цитотоксическую активность синтезированных соединений тестировали на опухолевых клеточных линиях: Jurkat, Raji, MCF-7, THP-1, U937, SKOV3, A549, LS174T, а также на линии клеток фибробластов человека WI-26. Линии клеток Jurkat, Raji, MCF-7 и THP-1 получены из клеточного банка ГНЦ ИБХ РАН. Линии клеток U937, SKOV3, A549, LS174T любезно предоставлены Банком опухолевых штаммов РОНЦ им. Н. Н. Блохина. Линии клеток фибробластов человека WI-26 предоставлены Молодежной лабораторией биофотоники и наноинженерии МПГУ.

Для определения цитотоксичности нуклеозиды растворяли в DMSO, а затем доводили до нужной концентрации соответствующей питательной средой без сыворотки. Для учета влияния DMSO на выживаемость клеток сходным образом готовили растворы DMSO в бессывороточных средах в соответствующих концентрациях.

Клетки линий Jurkat, Raji, и THP-1, U937, SKOV3, A549 и LS174T культивировали в среде RPMI1640 (Gibco, США), содержащей 2 мМ глутамина (Gibco, США), 10 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) и 10% фетальной коровьей сыворотки (Gibco, США). Клетки линии MCF-7 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, США), содержащей 2 мМ глутамина, 100 мкг/мл инсулина (ГНЦ ИБХ РАН, Россия), 10 мкг/мл гентамицина и 10% фетальной коровьей сыворотки. Все клеточные линии культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Клетки линии фибробластов человека WI-26 культивировали в среде DMEM, содержащей 2 мМ L-глутамина, 1% раствора PenStrep (100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и 10% фетальной коровьей сыворотки. Отсутствие контаминации культур микоплазмой контролировали методом ПЦР с помощью набора Myno Real-Time (Евроген, Россия).

Оценивали выживаемость клеток в присутствии нуклеозидов в исследуемых концентрациях. Клетки высевали в 96-луночные плоскодонные микропланшеты (Sarstedt, Германия) при плотности посева 5000 клеток/лунку для клеток линии MCF-7, 8000 клеток/лунку для клеток линий U937, SKOV3, A549 и LS174T и 10 000 клеток/лунку для клеток линий Jurkat, Raji, THP-1 и WI-26, и инкубировали ночь в CO₂-инкубаторе. Растворы исследуемых соединений добавляли в лунки в объеме 20 мкл. Общий инкубационный объем - 200 мкл. Время инкубации с нуклеозидами составило 48 ч для клеток линий Jurkat, Raji, THP-1, SKOV3, A549, LS174T и WI-26, 72 часа для клеток линии MCF-7 и 96 ч для клеток линии U937.

По окончании инкубации в каждую лунку планшетов добавляли по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, США) в физиологическом растворе в концентрации 2.5 мг/мл. Клетки инкубировали с

МТТ в CO₂-инкубаторе в течение 2 часов. По окончании инкубации в лунки планшетов с суспензионными культурами (линии Jurkat, Raji, ТНР-1 и U937) добавляли по 20 мкл 30% водного раствора SDS и 30 мкл DMSO. Содержимое лунок тщательно перемешивали пипетированием до полного растворения кристаллов формазана и с помощью планшетного спектрофотометра Packard SpectraCount (Perkin Elmer, США) измеряли оптическую плотность в лунках планшетов при 540 нм. Выживаемость клеток в лунках вычисляли по формуле: $(A_T - A_{\phi}) / (A_{DMSO} - A_{\phi}) \times 100\%$, где A_T – поглощение при 540 нм в лунке с анализируемым веществом в определенной концентрации, A_{ϕ} – средняя величина поглощения при 540 нм в лунках без клеток (фон), A_{DMSO} – поглощение при 540 нм в лунках с соответствующей концентрацией DMSO.

В случае адгезивных клеток (линии MCF-7, SKOV3, A549, LS174T и WI-26) по окончании инкубации с МТТ из лунок удаляли жидкость и добавляли в лунки по 100 мкл DMSO. Содержимое лунок тщательно перемешивали пипетированием до полного растворения кристаллов формазана и с помощью планшетного спектрофотометра измеряли оптическую плотность в лунках планшетов при 540 нм. Выживаемость клеток в лунках вычисляли по формуле: $A_T / A_{DMSO} \times 100\%$, где A_T – поглощение при 540 нм в лунке с анализируемым веществом в определенной концентрации, A_{DMSO} – поглощение при 540 нм в лунках с соответствующей концентрацией DMSO.

Результаты выражали в виде средних значений по 2-4 параллельным измерениям в 2–3 опытах в виде выживаемости клеток в %. Коэффициент корреляции при параллельных измерениях не превышал 30%.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Prism 9. Строили кривые зависимости выживаемости клеток от концентраций нуклеозидов, проводили регрессионный анализ и вычисляли значение GI₅₀ – концентрацию анализируемых веществ, снижающую выживаемость клеток до 50% – и 95% доверительный интервал для этого значения.

3.2.2 Оценка противовирусной активности

Исследования проводились на базе Ивановского института вирусологии (ФГБУ «Национальный научный центр эпидемиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Для оценки противовирусной активности и цитотоксичности соединений **30 – 34, 37** использовали линию клеток Vero E6 (почки африканской зеленой мартышки). Монослойные культуры клеток выращивали в 96-луночных пластиковых планшетах (Linbro, Flow Laboratories, Великобритания) на среде Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Россия), дополненной фетальной телячьей сывороткой (7%) (ПанЭко, Россия). Использовали двадцатичетырехчасовой монослой клеточной культуры. Условия культивирования - 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Максимальная исследуемая концентрация синтезированных соединений составляла 1000 мкг/мл. Штамм L₂ вируса простого герпеса 1 типа (HSV-1) получен из Государственной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздрава России. Штамм, устойчивый к ацикловиру (HSV-1/L₂/R^{ACV}), получен посредством серийного пассажа HSV-1/L₂ в присутствии ацикловира с последующим клонированием. В тимидинкиназе (TK) HSV-1/L₂/R^{ACV} обнаружены аминокислотные замены (W88R, R220H). Возможно, этими заменами обусловлено изменение чувствительности к ацикловиру. Замены локализованы в консервативных областях белка [278]. Фенотипически вирус охарактеризован как ТК-отрицательный [279].

В качестве препарата сравнения был выбран рибавирин, аналог нуклеозида, известный коммерческий противовирусный препарат широкого спектра действия. В 96-луночных пластиковых планшетах с созданным клеточным монослоем готовили серийные разведения соединений при кратности заражения (MOI) 1:2 с поддерживающей средой (среда Игла и среда 199, смешанные в соотношении 1:1). Затем клетки Vero E6 заражали инфекционным материалом при MOI 0.01 PFU/клетку; инкубацию проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Цитотоксичность (CD₅₀ - концентрация препарата, при которой 50% клеток погибает через 72 ч) определяли методом исключения трипанового синего. Определение антигерпесной активности *in vitro* соединений **30 – 34, 37** проводили методом анализа ингибирования цитопатического эффекта (ЦПЭ). Использовали три метода контроля.

1. Контроль токсичности: Неинфицированные клетки инкубировали в присутствии препарата в том же диапазоне концентраций, что и в эксперименте.

2. Вирусный контроль: Клетки инфицировали в условиях, описанных выше, но поддерживающая среда не содержала исследуемый препарат.

3. Клеточный контроль: Неинфицированные культуры клеток инкубировали в поддерживающей среде, которая не содержала исследуемый препарат. Продолжительность

инкубации составляла 48 ч и 72 ч для MOI 0.01 PFU/мл, соответственно. В контроле вирусный цитопатический эффект развивался до 95-100%. Противовирусную активность оценивали по определению ID₅₀ и ID₉₅ (концентраций соединений, которые подавляют развитие вирус-индуцированного цитопатического эффекта по сравнению с контролем на 50% и 95% соответственно).

4 Заключение

В результате выполнения экспериментов получены следующие результаты:

- оптимизирован и выполнен 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 SKOV3;
- 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'-дезоксидифторарабинозидов с использованием эталонного штамма HSV-1/L₂: в большинстве случаев IC₅₀ выше у синтезированных нуклеозидов, чем у соответствующих оснований.

Список сокращений

НИОТ - нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
Ade – аденин
Ado - аденозин
Cord - кордицепин
Нур – гипоксантин
Ino – инозин
HBV – гепатит В
HSV – вирус простого герпеса
VV – вирус коровьей оспы
VSV – вирус везикулярного стоматита
PTN - пентастатин
TST (tail suspension test) - тест на подвеску хвоста
FST (forced swim test) - тест на принудительное плавание
BLV - вирус лейкоза крупнорогатого скота
EBV - вирус Эпштейна-Барр
ADORAs (adenosine receptors) - аденозиновые рецепторы
РАР - полиаденилат-полимераза
РК-А – протеинкиназа
DRs (death receptors) - рецепторы смерти
EGFR (epidermal Growth Factor) - рецептор эпидермального фактора роста
АТФ – аденозинтрифосфат
DD (death domain) - белки домена смерти
PLC - фосфолипаза С
РКС - протеинкиназа С
МАРК - митоген-активируемая протеинкиназа
АДА (АДА) – аденозиндезаминаза
ТВАН – нитрат тетрабутиламмония
ТФАА – ангидрид трифторуксусной кислоты
ТВАФ – фторид тетрабутиламмония
BSA - N,O-бис(триметилсилил)ацетамид

TMSOTf – триметилсилилтрифторметансульфонат

ГЦО – гетероциклическое основание

NP – нуклеозидфосфорилаза

PNP – пуридиннуклеозидфосфорилаза

PuNP – пиримидиннуклеозидфосфорилаза

UP - уридинфосфорилаза

ТФУ – трифторуксусная кислота

DCF – дезоксиформин

AMP-активированная протеинкиназа

TdT⁺ - терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза-положительная лейкозных клеток

DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндолин

ММП - матричная металлопротеиназа

NDT - N-дезоксирибозилтрансфераза

CMV – цитомегаловирус

DRB - 5,6-дихлор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол

TCRB - 2,5,6-трихлор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол

BDCRB - 2-бром-5,6-дихлор-1-(β-D-рибофуранозил)бензимидазол

FDA - управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

ER - эндоплазматический ретикулум

TSA - p-толуолсульфокислота

TAR - 1,2,3,5-тетра-О-ацетил-β-D-рибофураноза

DMAP - 4-диметиламинопиридин

2-FCord – 2-фторкордицепин

1-P-3-dRib - 1-альфа фосфат 3-дезоксирибозы

2-ClCord - 2-хлоркордицепин

2-ClAde - 2-хлораденин

MTT - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиума бромид

ТК – тимидинкиназа

ЦПЭ - цитопатический эффект

Список использованной литературы

1. Mitsuya H. et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – Т. 82. – №. 20. – С. 7096-7100. doi: 10.1073/pnas.82.20.7096
2. De Clercq E., Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years //Clinical microbiology reviews. – 2016. – Т. 29. – №. 3. – С. 695-747. doi: 10.1128/cmr.00102-15
3. Baba M. et al. Both 2', 3'-dideoxythymidine and its 2', 3'-unsaturated derivative (2', 3'-dideoxythymidinene) are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication in vitro //Biochemical and biophysical research communications. – 1987. – Т. 142. – №. 1. – С. 128-134. Doi: 10.1016/0006-291X(87)90460-8
4. Tai-Shun L., Schinazi R. F., Prusoff W. H. Potent and selective in vitro activity of 3'-deoxythymidin-2'-ene (3'-deoxy-2', 3'-didehydrothymidine) against human immunodeficiency virus //Biochemical pharmacology. – 1987. – Т. 36. – №. 17. – С. 2713-2718. doi: 10.1016/0006-2952(87)90253-X
5. Hamamoto Y. et al. Inhibitory effect of 2', 3'-didehydro-2', 3'-dideoxynucleosides on infectivity, cytopathic effects, and replication of human immunodeficiency virus //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1987. – Т. 31. – №. 6. – С. 907-910. doi: 10.1128/aac.31.6.907
6. Mitsuya H., Broder S. Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2', 3'-dideoxynucleosides //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1986. – Т. 83. – №. 6. – С. 1911-1915. doi: 10.1073/pnas.83.6.1911
7. Furman P. A. et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1986. – Т. 83. – №. 21. – С. 8333-8337. doi: 10.1073/pnas.83.21.8333
8. De Clercq E. et al. Nucleic acid related compounds. 51. Synthesis and biological properties of sugar-modified analogs of the nucleoside antibiotics tubercidin, toyocamycin, sangivamycin, and formycin //Journal of medicinal chemistry. – 1987. – Т. 30. – №. 3. – С. 481-486.
9. Bergstrom D. E. et al. Antiviral activity of C-5 substituted tubercidin analogs //Journal of medicinal chemistry. – 1984. – Т. 27. – №. 3. – С. 285-292.
10. Giziewicz J. et al. Antiviral and antimetabolic activities of formycin and its N1-, N2-, 2'-O- and 3'-O-methylated derivatives //Biochemical Pharmacology. – 1975. – Т. 24. – №. 19. – С. 1813-1817.

11. Van Aerschot A. et al. 3'-Fluoro-2', 3'-dideoxy-5-chlorouridine: most selective anti-HIV-1 agent among a series of new 2'-and 3'-fluorinated 2', 3'-dideoxynucleoside analogs //Journal of medicinal chemistry. – 1989. – T. 32. – №. 8. – C. 1743-1749.
12. <https://www.eisai.com/news/news200907.html>
13. Hui C. K., Lau G. K. K. Clevudine for the treatment of chronic hepatitis B virus infection //Expert opinion on investigational drugs. – 2005. – T. 14. – №. 10. – C. 1277-1284. doi: 10.1517/13543784.14.10.1277
14. Liu P., Sharon A., Chu C. K. Fluorinated nucleosides: Synthesis and biological implication //Journal of fluorine chemistry. – 2008. – T. 129. – №. 9. – C. 743-766. doi: 10.1016/j.jfluchem.2008.06.007
15. Mikhailopulo I. A. et al. Synthesis and antiviral and cytostatic properties of 3'-deoxy-3'-fluoro- and 2'-azido-3'-fluoro-2', 3'-dideoxy-D-ribofuranosides of natural heterocyclic bases //Journal of medicinal chemistry. – 1991. – T. 34. – №. 7. – C. 2195-2202.
16. Eyer L. et al. Broad-spectrum antiviral activity of 3'-Deoxy-3'-fluoroadenosine against emerging flaviviruses //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2021. – T. 65. – №. 2. – C. 10.1128/aac.01522-20. doi: 10.1128/aac.01522-20
17. Marquez V. E. et al. 2', 3'-Dideoxy-2'-fluoro-ara-A. An acid-stable purine nucleoside active against human immunodeficiency virus (HIV) //Biochemical pharmacology. – 1987. – T. 36. – №. 17. – C. 2719-2722. doi: 10.1016/0006-2952(87)90254-1
18. Buckheit Jr R. W. et al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of 2'-fluoro-2', 3'-dideoxyarabinosyladenine (F-ddA) used in combination with other mechanistically diverse inhibitors of HIV-1 replication //Antiviral Chemistry and Chemotherapy. – 1999. – T. 10. – №. 3. – C. 115-119. doi: 10.1177/095632029901000302
19. Huang P. et al. High molecular weight DNA fragmentation: a critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells //Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. – 1995. – T. 1. – №. 9. – C. 1005-1013.
20. Faderl S., Gandhi V., Kantarjian H. M. Potential role of novel nucleoside analogs in the treatment of acute myeloid leukemia //Current opinion in hematology. – 2008. – T. 15. – №. 2. – C. 101-107. doi: 10.1097/MOH.0b013e3282f46e94
21. Ren H. et al. Versatile synthesis and biological evaluation of novel 3'-fluorinated purine nucleosides //Beilstein Journal of Organic Chemistry. – 2015. – T. 11. – №. 1. – C. 2509-2520. doi: 10.3762/bjoc.11.272
22. Cunningham K. G. et al. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link //Nature. – 1950. – T. 166. – №. 4231. – C. 949-949.

23. Chen Y. J. et al. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells //Life Sciences. – 1997. – T. 60. – №. 25. – C. 2349-2359. doi: 10.1016/S0024-3205(97)00291-9
24. Ng T. B., Wang H. X. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine //Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2005. – T. 57. – №. 12. – C. 1509-1519. doi: 10.1211/jpp.57.12.0001
25. Aravindan T., Nair V. R. Differential effect of cordycepin on S and G2 phases of cell cycle in plasmodia of *Physarum polycephalum* Schw //Indian journal of experimental biology. – 1991. – T. 29. – №. 9. – C. 801-804.
26. Arslan T., Abraham A. T., Hecht S. M. Structurally Altered Substrates for DNA Topoisomerase. I. Effects of Inclusion of a Single 3'-Deoxynucleotide Within the Scissile Strand //Nucleosides & nucleotides. – 1998. – T. 17. – №. 1-3. – C. 515-530.
27. Aström J., Aström A., Virtanen A. In vitro deadenylation of mammalian mRNA by a HeLa cell 3' exonuclease //The EMBO Journal. – 1991. – T. 10. – №. 10. – C. 3067-3071.
28. Brattin W. J., Portanova R. Effect of cordycepin on CRF stimulation and steroid inhibition of ACTH secretion by rat pituitary cells //Molecular and Cellular Endocrinology. – 1978. – T. 9. – №. 3. – C. 279-289. doi: 10.1016/0303-7207(78)90070-9
29. Duncan R. F. Cordycepin Blocks Recovery of Non-Heat-Shock mRNA Translation following Heat Shock in *Drosophila* //European journal of biochemistry. – 1995. – T. 233. – №. 3. – C. 784-792. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.784_3.x
30. Kuznetsov D. A., Musajev N. I. O. The molecular mode of brain mRNA processing damage followed by the suppression of post-transcriptional poly (A) synthesis with cordycepin //International journal of neuroscience. – 1990. – T. 51. – №. 1-2. – C. 53-67. doi: 10.3109/00207459009000508
31. Mathew P. A., Ellis L. K., Studzinski G. P. Enhanced messenger RNA stability and differentiation of HL 60 cells treated with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and cordycepin //Journal of cellular physiology. – 1989. – T. 140. – №. 2. – C. 212-218. doi: 10.1002/jcp.1041400204
32. Hecker M., Bernhardt D., Huth A. Effect of cordycepin on the activation of RNA and protein synthesis at the early inhibition stages of *Agrostemma githago* embryos //Acta Biologica et Medica Germanica. – 1977. – T. 36. – №. 10. – C. 1393-1402.
33. Zheng Z. J. Primary researching report of *Cordyceps* //Acta Veer Zotchnsin. – 1952. – T. 8. – C. 1-3.
34. Ahn Y. J. et al. Cordycepin: Selective Growth Inhibitor Derived from Liquid Culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp //Journal of agricultural and food chemistry. – 2000. – T. 48. – №. 7. – C. 2744-2748.

35. Kim J. R. et al. Larvicidal activity against *Plutella xylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris* //Pest Management Science: formerly Pesticide Science. – 2002. – T. 58. – №. 7. – C. 713-717. doi: 10.1002/ps.508
36. Vodnala S. K. et al. Preclinical assessment of the treatment of second-stage African trypanosomiasis with cordycepin and deoxycoformycin //PLoS neglected tropical diseases. – 2009. – T. 3. – №. 8. – C. e495. doi: 10.1371/journal.pntd.0000495
37. Dalla Rosa L. et al. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) pentostatin (deoxycoformycin) combination treatment of mice experimentally infected with *Trypanosoma evansi* //Parasitology. – 2013. – T. 140. – №. 5. – C. 663-671. doi: 10.1017/S0031182012001990
38. Ahn Y. J. et al. Cordycepin: Selective Growth Inhibitor Derived from Liquid Culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium spp* //Journal of agricultural and food chemistry. – 2000. – T. 48. – №. 7. – C. 2744-2748.
39. Niida A. et al. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the β -catenin/TCF pathway //Oncogene. – 2004. – T. 23. – №. 52. – C. 8520-8526. doi: 10.1038/sj.onc.1207892
40. Ramesh T. et al. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) attenuates age-related oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in rats //Experimental gerontology. – 2012. – T. 47. – №. 12. – C. 979-987. doi: 10.1016/j.exger.2012.09.003
41. Nishizawa K. et al. Antidepressant-like effect of *Cordyceps sinensis* in the mouse tail suspension test //Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2007. – T. 30. – №. 9. – C. 1758-1762. doi: 10.1248/bpb.30.1758
42. Tuli H. S. et al. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential //Life sciences. – 2013. – T. 93. – №. 23. – C. 863-869. doi: 10.1016/j.lfs.2013.09.030
43. Tianzhu Z., Shihai Y., Juan D. Antidepressant like effects of cordycepin in a mice model of chronic unpredictable mild stress //Evidence Based Complementary and Alternative Medicine. – 2014. – T. 2014. – №. 1. – C. 438506. doi: 10.1155/2014/438506
44. Li B. et al. 3'-deoxyadenosine (cordycepin) produces a rapid and robust antidepressant effect via enhancing prefrontal AMPA receptor signaling pathway //International Journal of Neuropsychopharmacology. – 2016. – T. 19. – №. 4. – C. pyv112. doi: 10.1093/ijnp/pyv112
45. Dong Y. et al. Studies on the antidiabetic activities of *Cordyceps militaris* extract in diet-streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats //BioMed research international. – 2014. – T. 2014. – №. 1. – C. 160980. doi: 10.1155/2014/160980
46. Ma L., Zhang S., Du M. Cordycepin from *Cordyceps militaris* prevents hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice //Nutrition Research. – 2015. – T. 35. – №. 5. – C. 431-439. doi: 10.1016/j.nutres.2015.04.01

47. Cao T. et al. The protective effect of Cordycepin on diabetic nephropathy through autophagy induction in vivo and in vitro //International urology and nephrology. – 2019. – T. 51. – C. 1883-1892. doi: 10.1007/s11255-019-02241-y
48. Shin S. et al. Cordycepin suppresses expression of diabetes regulating genes by inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages //Immune Network: Official Journal of the Korean Society for Immunology and Biological Response Modifiers. – 2009. – T. 9. – №. 3. – C. 98. doi: 10.4110/in.2009.9.3.98
49. Yun Y. H. et al. Anti-diabetic effects of CCCA, CMES, and cordycepin from Cordyceps militaris and the immune responses in streptozotocin-induced diabetic mice //Natural Product Sciences. – 2003. – T. 9. – №. 4. – C. 291-298.
50. Nair C. N., Panicali D. L. Polyadenylate sequences of human rhinovirus and poliovirus RNA and cordycepin sensitivity of virus replication //Journal of Virology. – 1976. – T. 20. – №. 1. – C. 170-176. doi: 10.1128/jvi.20.1.170-176.1976
51. Richardson L. S. et al. Effect of cordycepin on the replication of type-c rna tumor viruses //International Journal of Cancer. – 1975. – T. 15. – №. 3. – C. 451-456. doi: 10.1002/ijc.2910150311
52. Hashimoto K., Simizu B. Effect of cordycepin on the replication of western equine encephalitis virus //Archives of virology. – 1976. – T. 52. – C. 341-345. doi: 10.1007/BF01315623
53. Leinwand L., Ruddle F. H. Stimulation of *in vitro* translation of messenger RNA by actinomycin D and cordycepin //Science. – 1977. – T. 197. – №. 4301. – C. 381-383. doi: 10.1126/science.17919
54. Person A., Ben-Hamida F., Beaud G. Inhibition of 40S–Met–tRNA^{fMet} ribosomal initiation complex formation by vaccinia virus //Nature. – 1980. – T. 287. – №. 5780. – C. 355-357. doi: 10.1038/287355a0
55. Mueller W. E. G. et al. Cordycepin analogs of 2', 5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase //Biochemistry. – 1991. – T. 30. – №. 8. – C. 2027-2033.
56. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease //New England journal of medicine. – 1999. – T. 340. – №. 2. – C. 115-126. doi: 10.1056/NEJM199901143400207
57. Kim H. G. et al. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells //European journal of pharmacology. – 2006. – T. 545. – №. 2-3. – C. 192-199. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.06.047
58. Wellen K. E. et al. Inflammation, stress, and diabetes //The Journal of clinical investigation. – 2005. – T. 115. – №. 5. – C. 1111-1119. doi: 10.1172/JCI25102.

59. Rabie A. M. Potent inhibitory activities of the adenosine analogue cordycepin on SARS-CoV-2 replication //Acs Omega. – 2022. – T. 7. – №. 3. – C. 2960-2969. doi: 10.1021/acsomega.1c05998
60. Evan G., Littlewood T. A matter of life and cell death //Science. – 1998. – T. 281. – №. 5381. – C. 1317-1322. doi: 10.1126/science.281.5381.1317
61. Thomadaki H. et al. The role of cordycepin in cancer treatment via induction or inhibition of apoptosis: implication of polyadenylation in a cell type specific manner //Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 2008. – T. 61. – C. 251-265. doi: 10.1007/s00280-007-0467-y
62. Kazemi M. H. et al. Adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis and treatment of cancer //Journal of Cellular Physiology. – 2018. – T. 233. – №. 3. – C. 2032-2057. doi: 10.1002/jcp.25873
63. Lawrence S. et al. Cordycepin generally inhibits growth factor signal transduction in a systems pharmacology study //FEBS letters. – 2025. – T. 599. – №. 3. – C. 415-435. doi: 10.1002/1873-3468.15046
64. Klenow H. Formation of the mono-, di-and triphosphate of cordycepin in Ehrlich ascites-tumor cells *in vitro* //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects. – 1963. – T. 76. – C. 347-353. doi: 10.1016/0926-6550(63)90054-9
65. Rottman F., Guarino A. J. The inhibition of phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransferase activity by cordycepin monophosphate. – 1964. doi: 10.1016/0926-6569(64)90072-0
66. Holbein S. et al. Cordycepin interferes with 3' end formation in yeast independently of its potential to terminate RNA chain elongation //Rna. – 2009. – T. 15. – №. 5. – C. 837-849. doi: 10.1261/rna.1458909
67. Horowitz B., Goldfinger B. A., Marmur J. Effect of cordycepin triphosphate on the nuclear DNA-dependent RNA polymerases and poly (A) polymerase from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1976. – T. 172. – №. 1. – C. 143-148. doi: 10.1016/0003-9861(76)90059-X
68. Müller W. E. G. et al. Effect of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178Y cells and on nucleic acid-synthesizing enzyme systems //Cancer Research. – 1977. – T. 37. – №. 10. – C. 3824-3833.
69. Shao L. W. et al. Cordycepin induces apoptosis in human liver cancer HepG2 cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways //Oncology letters. – 2016. – T. 12. – №. 2. – C. 995-1000. doi: 10.3892/ol.2016.4706
70. Zhou Y. et al. Cordycepin affects multiple apoptotic pathways to mediate hepatocellular carcinoma cell death //Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). – 2017. – T. 17. – №. 1. – C. 143-149.

71. Lee H. H. et al. Cordycepin increases sensitivity of Hep3B human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by inactivating the JNK signaling pathway //Oncology reports. – 2013. – T. 30. – №. 3. – C. 1257-1264. doi: 10.3892/or.2013.2589
72. Yamamoto K. et al. Apoptotic effects of the extracts of cordyceps militaris via Erk phosphorylation in a renal cell carcinoma cell line //Phytotherapy Research. – 2015. – T. 29. – №. 5. – C. 707-713 doi: 10.1002/ptr.5305
73. Hwang J. H. et al. Cordycepin promotes apoptosis by modulating the ERK-JNK signaling pathway via DUSP5 in renal cancer cells //American journal of cancer research. – 2016. – T. 6. – №. 8. – C. 1758. ISSN:2156-6976/ajcr0035711
74. Joo J. C. et al. Cordycepin induces apoptosis by caveolin-1-mediated JNK regulation of Foxo3a in human lung adenocarcinoma //Oncotarget. – 2017. – T. 8. – №. 7. – C. 12211. doi: 10.18632/oncotarget.14661
75. Hwang J. H. et al. Cordycepin induces human lung cancer cell apoptosis by inhibiting nitric oxide mediated ERK/Slug signaling pathway //American Journal of Cancer Research. – 2017. – T. 7. – №. 3. – C. 417. ISSN:2156-6976/ajcr0050713
76. Tao X. et al. The effects of cordycepin on the cell proliferation, migration and apoptosis in human lung cancer cell lines A549 and NCI-H460 //Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2016. – T. 68. – №. 7. – C. 901-911. <https://doi.org/10.1111/jphp.12544>
77. Zhang C. et al. Effects of cordycepin on proliferation, apoptosis and NF- κ B signaling pathway in A549 cells //Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese Medicinal Materials. – 2015. – T. 38. – №. 4. – C. 786-789.
78. Tian T. et al. Induction of apoptosis by *Cordyceps militaris* fraction in human chronic myeloid leukemia K562 cells involved with mitochondrial dysfunction //Pharmacognosy Magazine. – 2014. – T. 10. – №. 39. – C. 325. doi: 10.4103/0973-1296.137374
79. Ko B. S. et al. Cordycepin regulates GSK-3 β / β -catenin signaling in human leukemia cells //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 9. – C. e76320. doi: 10.1371/journal.pone.0076320
80. Liao Y. et al. Cordycepin induces cell cycle arrest and apoptosis by inducing DNA damage and up-regulation of p53 in Leukemia cells //Cell cycle. – 2015. – T. 14. – №. 5. – C. 761-771. doi: 10.1080/15384101.2014.1000097
81. Jeong J. W. et al. Induction of apoptosis by cordycepin via reactive oxygen species generation in human leukemia cells //Toxicology in Vitro. – 2011. – T. 25. – №. 4. – C. 817-824. doi: 10.1016/j.tiv.2011.02.001
82. Baik J. S. et al. Apoptotic effects of cordycepin through the extrinsic pathway and p38 MAPK activation in human glioblastoma U87MG cells //Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – T. 26. – №. 2. – C. 309-314. doi: 10.4014/jmb.1507.07090

83. Li Y. et al. Cordycepin induces apoptosis and autophagy in human neuroblastoma SK-N-SH and BE (2)-M17 cells //Oncology letters. – 2015. – T. 9. – №. 6. – C. 2541-2547. doi: 10.3892/ol.2015.3066
84. Lee S. J. et al. c-Jun N-terminal kinase 1 is required for cordycepin-mediated induction of G2/M cell-cycle arrest via p21WAF1 expression in human colon cancer cells //Food and Chemical Toxicology. – 2010. – T. 48. – №. 1. – C. 277-283. doi: 10.1016/j.fct.2009.09.042
85. Lee S. J. et al. Cordycepin causes p21WAF1-mediated G2/M cell-cycle arrest by regulating c-Jun N-terminal kinase activation in human bladder cancer cells //Archives of biochemistry and biophysics. – 2009. – T. 490. – №. 2. – C. 103-109. doi: 10.1016/j.abb.2009.09.001
86. Wahle E., Rügsegger U. 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes //FEMS microbiology reviews. – 1999. – T. 23. – №. 3. – C. 277-295. doi: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00400.x
87. Imesch P. et al. MLH1-deficient HCT116 colon tumor cells exhibit resistance to the cytostatic and cytotoxic effect of the poly (A) polymerase inhibitor cordycepin (3'-deoxyadenosine) in vitro //Oncology letters. – 2012. – T. 3. – №. 2. – C. 441-444. doi: 10.3892/ol.2011.504
88. Wong Y. Y. et al. Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction //Journal of Biological Chemistry. – 2010. – T. 285. – №. 4. – C. 2610-2621. doi: 10.1074/jbc.M109.071159
89. Wehbe-Janek H., Shi Q., Kearney C. M. Cordycepin/Hydroxyurea synergy allows low dosage efficacy of cordycepin in MOLT-4 leukemia cells //Anticancer research. – 2007. – T. 27. – №. 5A. – C. 3143-3146.
90. Thomadaki H., Tsiapalis C. M., Scorilas A. Polyadenylate polymerase modulations in human epithelioid cervix and breast cancer cell lines, treated with etoposide or cordycepin, follow cell cycle rather than apoptosis induction. – 2005. doi: 10.1515/BC.2005.056
91. Lee J. B. et al. Development of cordycepin formulations for preclinical and clinical studies //Aaps Pharmscitech. – 2017. – T. 18. – C. 3219-3226. doi: 10.1208/s12249-017-0795-0
92. Chen Y. et al. Cordycepin induces apoptosis of C6 glioma cells through the adenosine 2A receptor-p53-caspase-7-PARP pathway //Chemico-Biological Interactions. – 2014. – T. 216. – C. 17-25. doi: 10.1016/j.cbi.2014.03.010
93. Cao H. L., Liu Z. J., Chang Z. Cordycepin induces apoptosis in human bladder cancer cells via activation of A3 adenosine receptors //Tumor Biology. – 2017. – T. 39. – №. 7. – C. 1010428317706915. doi: 10.1177/1010428317706915
94. Nakamura K. et al. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation //Anticancer research. – 2006. – T. 26. – №. 1A. – C. 43-47.

95. Yoshikawa N. et al. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits the growth of B16-BL6 mouse melanoma cells through the stimulation of adenosine A₃ receptor followed by glycogen synthase kinase-3 β activation and cyclin D 1 suppression //Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. – 2008. – T. 377. – C. 591-595. doi: 10.1007/s00210-007-0218-y
96. Lee S. Y. et al. Anti-cancer effect and apoptosis induction of cordycepin through DR3 pathway in the human colonic cancer cell HT-29 //Food and chemical toxicology. – 2013. – T. 60. – C. 439-447. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.068
97. Lee H. H. et al. Involvement of autophagy in cordycepin-induced apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells //Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2014. – T. 38. – №. 1. – C. 239-250. doi: 10.1016/j.etap.2014.06.003
98. Wang D. et al. Cordycepin, a natural antineoplastic agent, induces apoptosis of breast cancer cells via caspase-dependent pathways //Natural product communications. – 2016. – T. 11. – №. 1. – C. 1934578X1601100119.
99. Yoon S. Y., Park S. J., Park Y. J. The anticancer properties of cordycepin and their underlying mechanisms //International journal of molecular sciences. – 2018. – T. 19. – №. 10. – C. 3027. doi: 10.3390/ijms19103027
100. McIlwain D. R., Berger T., Mak T. W. Caspase functions in cell death and disease //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2013. – T. 5. – №. 4. – C. a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a026716
101. Choi S. et al. Cordycepin-induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells are independent of the estrogen receptor //Toxicology and applied pharmacology. – 2011. – T. 257. – №. 2. – C. 165-173. doi: 10.1016/j.taap.2011.08.030
102. Kim H. et al. Cordycepin blocks lung injury-associated inflammation and promotes BRCA1-deficient breast cancer cell killing by effectively inhibiting PARP //Molecular medicine. – 2011. – T. 17. – C. 893-900. doi: 10.2119/molmed.2011.00032
103. Gessi S. et al. Adenosine receptors and cancer //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2011. – T. 1808. – №. 5. – C. 1400-1412. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.09.020
104. Antonioli L. et al. Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much //Immunology letters. – 2019. – T. 205. – C. 9-15. doi: 10.1016/j.imlet.2018.04.006
105. Ramkumar V. et al. The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells //Journal of Biological Chemistry. – 1993. – T. 268. – №. 23. – C. 16887-16890. doi: 10.1016/S0021-9258(19)85277-8
106. Ali H. et al. Methylxanthines block antigen-induced responses in RBL-2H3 cells independently of adenosine receptors or cyclic AMP: evidence for inhibition of antigen binding to IgE //The

- Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 1991. – T. 258. – №. 3. – C. 954-962. doi: 10.1016/S0022-3565(25)20387-1
107. Sheth S. et al. Adenosine receptors: expression, function and regulation //International journal of molecular sciences. – 2014. – T. 15. – №. 2. – C. 2024-2052. doi: 10.3390/ijms15022024
 108. Waldo G. L. et al. Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C- β and Gq signaling complex //Science. – 2010. – T. 330. – №. 6006. – C. 974-980. doi: 10.1126/science.119343
 109. Brown S. A. et al. Analysis of phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate signaling in cerebellar Purkinje spines //Biophysical journal. – 2008. – T. 95. – №. 4. – C. 1795-1812. doi: 10.1529/biophysj.108.130195
 110. Pao H. Y. et al. Cordycepin stimulated steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells through the protein kinase C pathway //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2012. – T. 60. – №. 19. – C. 4905-4913. doi: 10.1021/jf205091b
 111. Nakamura K. et al. Effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on hematogenic lung metastatic model mice //in vivo. – 2005. – T. 19. – №. 1. – C. 137-141.
 112. Yoshikawa N. et al. CORDYCEPIN AND CORDYCEPS SINENSIS REDUCE THE GROWTH OF HUMAN PROMYELOCYTIC LEUKAEMIA CELLS THROUGH THE Wnt SIGNALLING PATHWAY //Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology. – 2007. – T. 34. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04781.x
 113. Vara J. Á. F. et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer //Cancer treatment reviews. – 2004. – T. 30. – №. 2. – C. 193-204. doi: 10.1016/j.ctrv.2003.07.007
 114. Wang Z. et al. Cordycepin induces apoptosis and inhibits proliferation of human lung cancer cell line H1975 via inhibiting the phosphorylation of EGFR //Molecules. – 2016. – T. 21. – №. 10. – C. 1267. doi: 10.3390/molecules21101267
 115. Fishman P. et al. Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists //Drug discovery today. – 2012. – T. 17. – №. 7-8. – C. 359-366. doi: 10.1016/j.drudis.2011.10.007
 116. Lallas G. C., Courtis N., Havredaki M. K562 cell sensitization to 5-fluorouracil-or interferon-alpha-induced apoptosis via cordycepin (3'-deoxyadenosine): fine control of cell apoptosis via poly (A) polymerase upregulation //The International journal of biological markers. – 2004. – T. 19. – №. 1. – C. 58-66.
 117. Gao Y. et al. Cordycepin enhances the chemosensitivity of esophageal cancer cells to cisplatin by inducing the activation of AMPK and suppressing the AKT signaling pathway //Cell death & disease. – 2020. – T. 11. – №. 10. – C. 866. doi: 10.1038/s41419-020-03079-4

118. Lee H. J. et al. The nucleoside antagonist cordycepin causes DNA double strand breaks in breast cancer cells //Investigational new drugs. – 2012. – T. 30. – C. 1917-1925. doi: 10.1007/s10637-012-9859-x
119. Yong T. et al. Cordycepin, a characteristic bioactive constituent in *Cordyceps militaris*, ameliorates hyperuricemia through URAT1 in hyperuricemic mice //Frontiers in microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 58. doi: 10.3389/fmicb.2018.00058
120. Lui J. C. K. et al. Cordycepin induced eryptosis in mouse erythrocytes through a Ca²⁺-dependent pathway without caspase-3 activation //Archives of toxicology. – 2007. – T. 81. – C. 859-865. doi: 10.1007/s00204-007-0214-5
121. Wei H. P. et al. Synthesis and pharmacokinetic evaluation of novel N-acyl-cordycepin derivatives with a normal alkyl chain //European journal of medicinal chemistry. – 2009. – T. 44. – №. 2. – C. 665-669. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.05.013
122. Bi Y. E. et al. Targeted delivery of cordycepin to liver cancer cells using transferrin-conjugated liposomes //Anticancer research. – 2017. – T. 37. – №. 9. – C. 5207-5214.
123. Aramwit P. et al. Toxicity evaluation of cordycepin and its delivery system for sustained in vitro anti-lung cancer activity //Nanoscale Research Letters. – 2015. – T. 10. – C. 1-10. doi: 10.1186/s11671-015-0851-1
124. El Khadem H. S., El Sayed H. Synthesis of cordycepin-C [8-(3'-deoxy-β-D-erythropentofuranosyl) adenine] //Carbohydrate Research. – 1973. – T. 29. – №. 2. – C. 525-527. doi: 10.1016/S0008-6215(00)83043-8
125. Tsai Y. J., Lin L. C., Tsai T. H. Pharmacokinetics of adenosine and cordycepin, a bioactive constituent of *Cordyceps sinensis* in rat //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2010. – T. 58. – №. 8. – C. 4638-4643. doi: 10.1021/jf100269g
126. Roy S. et al. The Lingulodinium circadian system lacks rhythmic changes in transcript abundance //BMC biology. – 2014. – T. 12. – C. 1-8.
127. Xia, Y.; Luo, F.; Shang, Y.; Chen, P.; Lu, Y.; Wang, C. Fungal Cordycepin Biosynthesis Is Coupled with the Production of the Safeguard Molecule Pentostatin. Cell Chem. Biol. 2017, 24, 1479–1489. doi: 10.1186/s12915-014-0107-z
128. Vodnala S. K. et al. Structure–activity relationships of synthetic cordycepin analogues as experimental therapeutics for African trypanosomiasis //Journal of medicinal chemistry. – 2013. – T. 56. – №. 24. – C. 9861-9873. doi: 10.1021/jm401530a
129. Yang Q. Z., Yang J., Zhang C. K. Synthesis and properties of cordycepin intercalates of Mg–Al–nitrate layered double hydroxides //International journal of pharmaceutics. – 2006. – T. 326. – №. 1-2. – C. 148-152. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.06.037

130. Pan B. S. et al. Cordycepin induced MA-10 mouse Leydig tumor cell apoptosis by regulating p38 MAPKs and PI3K/AKT signaling pathways //Scientific reports. – 2015. – T. 5. – №. 1. – C. 13372. doi: 10.1038/srep13372
131. Kadomatsu M. et al. Cordycepin as a sensitizer to tumour necrosis factor (TNF)- α -induced apoptosis through eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α)-and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated inhibition of nuclear factor (NF)- κ B //Clinical & Experimental Immunology. – 2012. – T. 168. – №. 3. – C. 325-332. doi: 10.1111/cei.12276
132. Kitamura M. et al. Aberrant, differential and bidirectional regulation of the unfolded protein response towards cell survival by 3'-deoxyadenosine //Cell Death & Differentiation. – 2011. – T. 18. – №. 12. – C. 1876-1888. doi: 10.1038/cdd.2011.63
133. Qu S. et al. Design, synthesis, antibacterial/antitumor activity and in vitro stability of novel cordycepin derivatives with unsaturated fatty acid chain //European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2023. – T. 187. – C. 106466. doi: 10.1016/j.ejps.2023.106466
134. Cui L. et al. Antitumor mechanism and therapeutic potential of cordycepin derivatives //Molecules. – 2024. – T. 29. – №. 2. – C. 483. <https://doi.org/10.3390/molecules29020483>
135. Hiraoka W. et al. Metabolic effects of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) and 2-halo-3'-deoxyadenosine on repair of x-ray-induced potentially lethal damage in Chinese hamster V79 cells //Radiation research. – 1988. – T. 114. – №. 2. – C. 231-239. doi: 10.2307/3577221
136. Rosowsky A. et al. Synthesis of the 2-chloro analogs of 3'-deoxyadenosine, 2', 3'-dideoxyadenosine, and 2', 3'-didehydro-2', 3'-dideoxyadenosine as potential antiviral agents //Journal of medicinal chemistry. – 1989. – T. 32. – №. 5. – C. 1135-1140. doi: 10.1021/jm00125a031
137. Gushiken F. C. Peliosis hepatis after treatment with 2-chloro-3'-deoxyadenosine //Southern medical journal. – 2000. – T. 93. – №. 6. – C. 625-626.
138. Dickinson M. J. et al. 3'-Deoxynucleosides. V. 3'-Deoxy-2-fluoroadenosine //Journal of Medicinal Chemistry. – 1967. – T. 10. – №. 6. – C. 1165-1166. doi: 10.1021/jm00318a042
139. Wilson D. K., Rudolph F. B., Quioco F. A. Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations //Science. – 1991. – T. 252. – №. 5010. – C. 1278-1284. doi: 10.1126/science.192553
140. Shelton J. et al. Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs //Chemical reviews. – 2016. – T. 116. – №. 23. – C. 14379-14455. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00209
141. Fateev I. V. et al. The chemoenzymatic synthesis of clofarabine and related 2'-deoxyfluoroarabinosyl nucleosides: The electronic and stereochemical factors determining

- substrate recognition by *E. coli* nucleoside phosphorylases //Beilstein journal of organic chemistry. – 2014. – T. 10. – №. 1. – C. 1657-1669. doi: 10.3762/bjoc.10.173
142. Barai V. N. et al. Chemo-Enzymatic Synthesis of 3'-Deoxy- β -D-ribofuranosyl Purines //Helvetica chimica acta. – 2002. – T. 85. – №. 7. – C. 1893-1900. doi: 10.1002/1522
 143. Masuda M. et al. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* //Enzyme and microbial technology. – 2006. – T. 39. – №. 4. – C. 641-646. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.010
 144. Cui J. D., Jia S. R. Optimization of medium on exopolysaccharides production in submerged culture of *Cordyceps militaris* //Food science and biotechnology. – 2010. – T. 19. – C. 1567-1571. doi: 10.1007/s10068-010-0222-8
 145. Ni H. et al. Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waste medium //Journal of Chromatography B. – 2009. – T. 877. – №. 22. – C. 2135-2141. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.06.009
 146. Wang L. et al. Research progress on cordycepin synthesis and methods for enhancement of cordycepin production in *Cordyceps militaris* //Bioengineering. – 2022. – T. 9. – №. 2. – C. 69. doi: 10.3390/bioengineering9020069
 147. Hansske F., Robins M. J. Regiospecific and stereoselective conversion of ribonucleosides to 3'-deoxynucleosides. A high yield three-stage synthesis of cordycepin from adenosine //Tetrahedron letters. – 1985. – T. 26. – №. 36. – C. 4295-4298. doi: 10.1016/S0040-4039(00)98716-1
 148. Aman S. et al. From adenosine to 3'-deoxyadenosine: development and scale up //Organic Process Research & Development. – 2000. – T. 4. – №. 6. – C. 601-605. doi: 10.1021/op000209x
 149. Mikhailopulo I. A. Biotechnology of nucleic acid constituents-State of the art and perspectives //Current Organic Chemistry. – 2007. – T. 11. – №. 4. – C. 317-335. doi: 10.2174/138527207780059330
 150. Friedkin M. DESOXYRIBOSE-1-PHOSPHATE: II. THE ISOLATION OF CRYSTALLINE DESOXYRIBOSE-1-PHOSPHATE //Journal of Biological Chemistry. – 1950. – T. 184. – №. 2. – C. 449-459. doi: 10.1016/S0021-9258(19)50973-5
 151. Koellner G. et al. Crystal structure of the ternary complex of *E. coli* purine nucleoside phosphorylase with formycin B, a structural analogue of the substrate inosine, and phosphate (sulphate) at 2.1 Å resolution //Journal of molecular biology. – 1998. – T. 280. – №. 1. – C. 153-166. doi: 10.1006/jmbi.1998.1799
 152. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects //Pharmacology & therapeutics. – 2000. – T. 88. – №. 3. – C. 349-425. doi: 10.1016/S0163-7258(00)00097-8

153. Nicolaou K. C. et al. Synthesis and biological evaluation of 2', 4'-and 3', 4'-bridged nucleoside analogues //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2011. – T. 19. – №. 18. – C. 5648-5669. doi: 10.1016/j.bmc.2011.07.022
154. Antonio Hernández Martínez S. et al. Immobilized Nucleoside 2'-Deoxyribosyltransferases from Extremophiles for Nucleoside Biocatalysis //ACS omega. – 2024. – T. 10. – №. 1. – C. 1067-1076. doi: 10.1021/acsomega.4c08364
155. Sherif S. H. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of benzimidazole derivatives //Scholars International Journal of Chemistry and Material Sciences. – 2021. – T. 4. – №. 4. – C. 14-19 doi: 10.36348/sijcms.2021.v04i04.001.
156. Yadav S. et al. Synthesis and evaluation of antimicrobial, antitubercular and anticancer activities of benzimidazole derivatives //Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences. – 2018. – T. 5. – №. 1. – C. 100-109. doi: 10.1016/j.ejbas.2017.11.001.
157. Srivastava R. et al. Synthesis, antibacterial activity, synergistic effect, cytotoxicity, docking and molecular dynamics of benzimidazole analogues //Computational biology and chemistry. – 2018. – T. 76. – C. 1-16. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.05.021.
158. Brink N. G., Folkers K. Vitamin B12. VI. 5, 6-Dimethylbenzimidazole, a degradation product of vitamin B12 //Journal of the American Chemical Society. – 1949. – T. 71. – №. 8. – C. 2951-2951. doi: 10.1021/ja01176a532,
159. Kamanna K. Synthesis and Pharmacological //Chemistry and applications of benzimidazole and its derivatives. – 2019. – C. 51. doi: 10.5772/intechopen.85229
160. Faydalı N., Arpacı Ö. T. Benzimidazole and Benzoxazole Derivatives Against Alzheimer's Disease //Chemistry & Biodiversity. – 2024. – T. 21. – №. 6. – C. e202400123. doi: 10.1002/cbdv.202400123
161. Shinde V. S. et al. Synthesis of benzimidazole nucleosides and their anticancer activity //Carbohydrate Research. – 2020. – T. 498. – C. 108178. doi: 10.1016/j.carres.2020.108178
162. Kharitonova M. I., Konstantinova I. D., Miroshnikov A. I. Benzimidazole nucleosides: Antiviral and antitumour activities and methods of synthesis //Russian Chemical Reviews. – 2018. – T. 87. – №. 11. – C. 1111. doi: 10.1070/RCR4832
163. Carvalho L. C. R., Fernandes E., Marques M. M. B. Developments towards regioselective synthesis of 1, 2-disubstituted benzimidazoles //Chemistry–A European Journal. – 2011. – T. 17. – №. 45. – C. 12544-12555. doi: 10.1002/chem.201101508
164. Marty F. M. et al. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial //The Lancet infectious diseases. – 2011. – T. 11. – №. 4. – C. 284-292. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70024-X

165. Williams S. L. et al. In vitro activities of benzimidazole D-and L-ribonucleosides against herpesviruses //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – T. 47. – №. 7. – C. 2186-2192. doi: 10.1128/aac.47.7.2186-2192.2003
166. Prichard M. N. et al. Benzimidazole analogs inhibit human herpesvirus 6 //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – T. 55. – №. 5. – C. 2442-2445. doi: 10.1128/aac.01523-10
167. Hwang J. S. et al. Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates and other herpesviruses to new acetylated, tetrahalogenated benzimidazole D-ribonucleosides //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – T. 53. – №. 12. – C. 5095-5101. doi: 10.1128/aac.00809-09
168. Biron K. K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases //Antiviral research. – 2006. – T. 71. – №. 2-3. – C. 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.002>
169. Tamm I. et al. Inhibition of influenza virus multiplication by N-glycosides of benzimidazoles //The Journal of Experimental Medicine. – 1954. – T. 99. – №. 3. – C. 227-250. doi: 10.1084/jem.99.3.227
170. Tamm I., Sehgal P. B. Halobenzimidazole ribosides and RNA synthesis of cells and viruses //Advances in Virus Research. – 1978. – T. 22. – C. 187-258. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60775-
171. Tamm I., Overman J. R. Relationship between structure of benzimidazole derivatives and inhibitory activity on vaccinia virus multiplication //Virology. – 1957. – T. 3. – №. 1. – C. 185-196. doi: 10.1016/0042-6822(57)90032-6
172. 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 //Journal of General Virology. – 1981. – T. 55. – №. 1. – C. 87-94. doi: 10.1099/0022-1317-55-1-87
173. Bucknall R. A. The effects of substituted benzimidazoles on the growth of viruses and the nucleic acid metabolism of host cells //Journal of General Virology. – 1967. – T. 1. – №. 1. – C. 89-99. doi: 10.1099/0022-1317-1-1-89
174. Diwan A. et al. Anti-viral activity of 5, 6-dichloro-1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl) benzimidazole and related derivatives //Journal of General Virology. – 1968. – T. 3. – №. 3. – C. 393-402. doi: 10.1099/0022-1317-3-3-393
175. Kazimierczuk Z. et al. Preparation of 1- α -D-arabinofuranosylbenzimidazole and its 5, 6-dichloro derivative, and the direct bromination of benzimidazole nucleosides //Zeitschrift für Naturforschung C. – 1980. – T. 35. – №. 1-2. – C. 30-35. doi: 10.1515/znc-1980-1-207
176. Kissman H. M., Child R. G., Weiss M. J. Synthesis and biological properties of certain 5, 6-dichlorobenzimidazole ribosides //Journal of the American Chemical Society. – 1957. – T. 79. – №. 5. – C. 1185-1188. doi: 10.1021/ja01562a041

177. Kharitonova M. I. et al. Chemoenzymatic synthesis of modified 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl benzimidazoles and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1 //Synthesis. – 2017. – T. 49. – №. 05. – C. 1043-1052. doi: 10.1055/s-0036-1588625
178. Townsend L. B. et al. Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2, 5, 6-Trihalo-1-(β -D-ribofuranosyl) benzimidazoles //Journal of medicinal chemistry. – 1995. – T. 38. – №. 20. – C. 4098-4105. doi: 10.1021/jm00020a025
179. Zou R. et al. 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. – T. 19. – №. 1-2. – C. 125-153. doi: 10.1080/15257770008033000
180. 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 Through Clinical Trials. – 2011. – C. 417-433. doi: 10.1002/9780470929353.ch29
181. North T. W. et al. Rhesus Cytomegalovirus Is Similar to Human Cytomegalovirus in Susceptibility to Benzimidazole Nucleosides //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2004. – T. 48. – №. 7. – C. 2760-2765. doi: 10.1128/aac.48.7.2760-2765.2004
182. Gourin C., Alain S., Hantz S. Anti-CMV therapy, what next? A systematic review //Frontiers in Microbiology. – 2023. – T. 14. – C. 1321116. doi: 10.3389/fmicb.2023.1321116
183. Krosky P. M. et al. Phosphorylation of β -D-ribosylbenzimidazoles is not required for activity against human cytomegalovirus //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – T. 46. – №. 2. – C. 478-486. doi: 10.1128/AAC.46.2.478-486.2002)
184. Underwood M. R. et al. Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product //Journal of virology. – 1998. – T. 72. – №. 1. – C. 717-725. doi: 10.1128/jvi.72.1.717-725.1998
185. McVoy M. A., Nixon D. E. Impact of 2-Bromo-5, 6-Dichloro-1- β -D-Ribofuranosyl benzimidazole riboside and inhibitors of DNA, RNA, and protein synthesis on human cytomegalovirus genome maturation //Journal of virology. – 2005. – T. 79. – №. 17. – C. 11115-11127. doi: 10.1128/JVI.79.17.11115-11127.2005
186. Zou R. et al. Synthesis and antiviral evaluation of certain disubstituted benzimidazole ribonucleosides //Journal of medicinal chemistry. – 1996. – T. 39. – №. 18. – C. 3477-3482. doi: 10.1021/jm960157v
187. Zacny V. L. et al. Inhibition of Epstein-Barr virus replication by a benzimidazole 1-riboside: novel antiviral mechanism of 5, 6-dichloro-2-(isopropylamino)-1- β -1-ribofuranosyl-1H-

- benzimidazole //Journal of virology. – 1999. – T. 73. – №. 9. – C. 7271-7277. doi: 10.1128/jvi.73.9.7271-7277.1999
188. Sun K. et al. Maribavir: Mechanism of action, clinical, and translational science //Clinical and Translational Science. – 2024. – T. 17. – №. 1. – C. e13696. doi: 10.1111/cts.13696
 189. <https://www.pharmiweb.com/press-release/2021-12-08/takeda-announces-publication-of-data-from-solstice-a-pivotal-phase-3-trial-for-livtencity-maribav>
 190. Griffiths P., Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host //Nature Reviews Microbiology. – 2021. – T. 19. – №. 12. – C. 759-773. doi: 10.1038/s41579-021-00582-z
 191. Steingruber M., Marschall M. The cytomegalovirus protein kinase pUL97: host interactions, regulatory mechanisms and antiviral drug targeting //Microorganisms. – 2020. – T. 8. – №. 4. – C. 515. doi: 10.3390/microorganisms8040515
 192. Shannon-Lowe C. D., Emery V. C. The effects of maribavir on the autophosphorylation of ganciclovir resistant mutants of the cytomegalovirus UL97 protein //Herpesviridae. – 2010. – T. 1. – C. 1-13. doi: 10.1186/2042-4280-1-4
 193. Prichard M. N. Function of human cytomegalovirus UL97 kinase in viral infection and its inhibition by maribavir //Reviews in medical virology. – 2009. – T. 19. – №. 4. – C. 215-229. doi: 10.1002/rmv.615
 194. Biron K. K. et al. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – T. 46. – №. 8. – C. 2365-2372. doi: 10.1128/AAC.46.8.2365-2372.2002;
 195. Hamirally S. et al. Viral mimicry of Cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress //PLoS pathogens. – 2009. – T. 5. – №. 1. – C. e1000275. doi: 10.1371/journal.ppat.1000275;
 196. Drew W. L. et al. Maribavir sensitivity of cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir, cidofovir or foscarnet //Journal of clinical virology. – 2006. – T. 37. – №. 2. – C. 124-127. doi: 10.1016/j.jcv.2006.07.010
 197. Kharitonova M. I. et al. New modified 2-aminobenzimidazole nucleosides: Synthesis and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1 //Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2017. – T. 27. – №. 11. – C. 2484-2487. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.100
 198. Shrivastava N. et al. Benzimidazole scaffold as anticancer agent: synthetic approaches and structure–activity relationship //Archiv der Pharmazie. – 2017. – T. 350. – №. 6. – C. e201700040. doi: 10.1002/ardp.201700040,

199. A. El Rashedy A., Y. Aboul-Enein H. Benzimidazole derivatives as potential anticancer agents //Mini reviews in medicinal chemistry. – 2013. – T. 13. – №. 3. – C. 399-407. doi: 10.2174/138955713804999847
200. Gan C. et al. Untargeted metabolomics study and pro-apoptotic properties of B-norcholesteryl benzimidazole compounds in ovarian cancer SKOV3 cells //The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 2020. – T. 202. – C. 105709. doi: 10.1016/j.jsbmb.2020.105709.
201. Goud N. S. et al. Novel benzimidazole-triazole hybrids as apoptosis inducing agents in lung cancer: Design, synthesis, 18F-radiolabeling & galectin-1 inhibition studies //Bioorganic chemistry. – 2020. – T. 102. – C. 104125. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104125
202. Fang Y. et al. Discovery and optimization of 2-(trifluoromethyl) benzimidazole derivatives as novel ferroptosis inducers in vitro and in vivo //European journal of medicinal chemistry. – 2023. – T. 245. – C. 114905. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114905
203. Galal S. A. et al. Part II: New candidates of pyrazole-benzimidazole conjugates as checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibitors //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – T. 144. – C. 859-873. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.023.
204. Chen H. et al. A derivate of benzimidazole-isoquinolinone induces SKP2 transcriptional inhibition to exert anti-tumor activity in glioblastoma cells //Molecules. – 2019. – T. 24. – №. 15. – C. 2722. doi: 10.3390/molecules24152722
205. Li S. et al. Crystal structure, DNA interaction and in vitro anticancer activity of Cu (II) and Pt (II) compounds based on benzimidazole-quinoline derivative //Polyhedron. – 2020. – T. 179. – C. 114369. doi: 10.1016/j.poly.2020.114369
206. Bhattacharya S., Chaudhuri P. Medical implications of benzimidazole derivatives as drugs designed for targeting DNA and DNA associated processes //Current medicinal chemistry. – 2008. – T. 15. – №. 18. – C. 1762-1777. doi: 10.2174/092986708785133013
207. Akhtar M. J. et al. Design, synthesis, docking and QSAR study of substituted benzimidazole linked oxadiazole as cytotoxic agents, EGFR and erbB2 receptor inhibitors //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2017. – T. 126. – C. 853-869. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.12.014
208. Abdel-Maksoud M. S. et al. Design, synthesis and anticancer profile of new 4-(1 H-benzo [d] imidazol-1-yl) pyrimidin-2-amine-linked sulfonamide derivatives with V600EBRAF inhibitory effect //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 19. – C. 10491. doi: 10.3390/ijms221910491
209. Sagam R. R. et al. Synthesis of new morpholine-benzimidazole-pyrazole hybrids as tubulin polymerization inhibiting anticancer agents //Journal of Molecular Structure. – 2022. – T. 1268. – C. 133692. doi: 10.1016/j.molstruc.2022.133692

210. Charifson P. S. et al. Novel dual-targeting benzimidazole urea inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV possessing potent antibacterial activity: Intelligent design and evolution through the judicious use of structure-guided design and structure– activity relationships //Journal of Medicinal Chemistry. – 2008. – T. 51. – №. 17. – C. 5243-5263. doi: 10.1021/jm800318d 3
211. Acar Çevik U. et al. Synthesis, anticancer evaluation and molecular docking studies of new benzimidazole-1, 3, 4-oxadiazole derivatives as human topoisomerase types I poison //Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2020. – T. 35. – №. 1. – C. 1657-1673. doi: 10.1080/14756366.2020.1806831
212. Wang J. et al. Effect of DRB on the biological characteristics of human laryngeal carcinoma Hep-2 cell line //Journal of Huazhong University of Science and Technology. – 2007. – T. 27. – C. 104-106. doi: 10.1007/s11596-007-0129-7
213. Wang S., Fischer P. M. Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology //Trends in pharmacological sciences. – 2008. – T. 29. – №. 6. – C. 302-313. doi: 10.1016/j.tips.2008.03.003(2008)
214. Kuo Y. H. et al. 5, 6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) induces apoptosis in breast cancer cells through inhibiting of Mcl-1 expression //Scientific reports. – 2023. – T. 13. – №. 1. – C. 12621. doi: 10.1038/s41598-023-39340-x
215. Townsend L. B., Revankar G. R. Benzimidazole nucleosides, nucleotides, and related derivatives //Chemical Reviews. – 1970. – T. 70. – №. 3. – C. 389-438. doi: 10.1021/cr60265a005
216. Gudmundsson K. S. et al. Synthesis and Antiviral Activity of Certain 5 ‘-Modified Analogs of 2, 5, 6-Trichloro-1-(β-d-ribofuranosyl) benzimidazole //Journal of medicinal chemistry. – 1997. – T. 40. – №. 5. – C. 785-793. doi: 10.1021/jm9604888
217. 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. – T. 9. – №. 4. – C. 569-577. doi: 10.1080/07328319008045188
218. 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. – T. 265. – №. 5. – C. 2682-2683. doi: 10.1016/S0021-9258(19)39855-2
219. Mikhailopulo I. A. et al. Benzimidazoles in the reaction of enzymatic transglycosylation //Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. – 1995. – T. 14. – №. 3-5. – C. 477-480.

220. Davoll J., Brown G. B. A New Synthesis of 1-Glycosylbenzimidazoles //Journal of the American Chemical Society. – 1951. – T. 73. – №. 12. – C. 5781-5782. doi: 10.1021/ja01156a087
221. Mochizuki T. et al. Synthesis of adenophostin A analogues conjugating an aromatic group at the 5'-position as potent IP3 receptor ligands //Journal of medicinal chemistry. – 2006. – T. 49. – №. 19. – C. 5750-5758. doi: 10.1021/jm060310d
222. Wang Z. et al. Stereocontrolled syntheses of deoxyribonucleosides via photoinduced electron-transfer deoxygenation of benzoyl-protected ribo- and arabinonucleosides //The Journal of organic chemistry. – 2000. – T. 65. – №. 19. – C. 5969-5985. doi: 10.1021/jo0003652
223. Zhong M., Nowak I., Robins M. J. 6-(2-Alkylimidazol-1-yl) purines undergo regiospecific glycosylation at N9 //Organic Letters. – 2005. – T. 7. – №. 21. – C. 4601-4603. doi: 10.1021/ol051573p
224. Zhang X. et al. 3-Deoxy-3, 3-difluoro-D-arabinofuranose: First Stereoselective Synthesis and Application in Preparation of gem-Difluorinated Sugar Nucleosides //The Journal of Organic Chemistry. – 2003. – T. 68. – №. 23. – C. 9026-9033. doi: 10.1021/jo034512i
225. Ruf K., Pfeleiderer W. Synthesis and properties of 5, 6-dichlorobenzimidazole 2'→5'- and 3'→5'-nucleotide dimers and trimers //Carbohydrate research. – 1992. – T. 216. – C. 421-439. doi: 10.1016/0008-6215(92)84178-U
226. 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. – T. 3. – №. 1. – C. 33-44. doi: 10.1080/07328318408079417
227. Gudmundsson K. S. et al. Synthesis of fluorosugar analogues of 2, 5, 6-trichloro-1-(β-D-ribofuranosyl) benzimidazole as antivirals with potentially increased glycosidic bond stability //Journal of medicinal chemistry. – 2000. – T. 43. – №. 12. – C. 2473-2478. doi: 10.1021/jm990219s
228. Pankiewicz K. W. Fluorinated nucleosides //Carbohydrate research. – 2000. – T. 327. – №. 1-2. – C. 87-105. doi: 10.1016/S0008-6215(00)00089-6
229. Montgomery J. A. et al. 9-(2-Deoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosyl) guanine: a metabolically stable cytotoxic analogue of 2'-deoxyguanosine //Journal of medicinal chemistry. – 1986. – T. 29. – №. 11. – C. 2389-2392. doi: 10.1021/jm00161a041
230. Niedballa U., Vorbrüggen H. A general synthesis of pyrimidine nucleosides //Angewandte Chemie International Edition in English. – 1970. – T. 9. – №. 6. – C. 461-462. doi: 10.1002/anie.197004612

231. 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. – T. 83. – №. 8. – C. 1791-1808 doi: 10.1002/1522
232. Townsend L. B. et al. Studies designed to increase the stability and antiviral activity (HCMV) of the active benzimidazole nucleoside, TCRB // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. – 1999. – T. 18. – №. 4-5. – C. 509-519. doi: 10.1080/15257779908041486
233. Fernández-Lucas J. et al. Synthesis of 2'-deoxyribosyl nucleosides using new 2'-deoxyribosyltransferase microorganism producers // *Enzyme and microbial technology*. – 2007. – T. 40. – №. 5. – C. 1147-1155. doi: 10.1016/j.enzmtec.2006.08.022
234. Fresco-Taboada A. et al. New insights on nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases: a versatile biocatalyst for one-pot one-step synthesis of nucleoside analogs // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2013. – T. 97. – C. 3773-3785. DOI doi: 10.1007/s00253-013-4816-y
235. Kaminski P. A. et al. In vivo reshaping the catalytic site of nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase for dideoxy- and didehydronucleosides via a single amino acid substitution // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – T. 283. – №. 29. – C. 20053-20059. doi: 10.1074/jbc.M802706200
236. Ye W. et al. Ethenoguanines undergo glycosylation by nucleoside 2'-deoxyribosyltransferases at non-natural sites // *PLoS One*. – 2014. – T. 9. – №. 12. – C. e115082. doi: 10.1371/journal.pone.0115082
237. Sheldon R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – T. 41. – №. 4. – C. 1437-1451. doi: 10.1039/c1cs15219j
238. Mikhailopulo I. A., Miroshnikov A. I. Biologically important nucleosides: Modern trends in biotechnology and application // *Mendeleev Communications*. – 2011. – T. 21. – №. 2. – C. 57-68. doi: 10.1016/j.mencom.2011.03.001
239. Kaminski P. A. Functional Cloning, Heterologous Expression, and Purification of Two Different N-Deoxyribosyltransferases from *Lactobacillus helveticus* // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – T. 277. – №. 17. – C. 14400-14407. doi: 10.1074/jbc.M111995200
240. Kaminski P. A. et al. *Lactobacillus* N-deoxyribosyl transferases, corresponding nucleotide sequences and their uses: пат. – 2003. US7381555B2
241. Fernández-Lucas J. et al. *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides // *Applied and environmental microbiology*. – 2010. – T. 76. – №. 5. – C. 1462-1470. doi: 10.1128/AEM.01685-09
242. Miyamoto Y., Masaki T., Chohnan S. Characterization of N-deoxyribosyltransferase from *Lactococcus lactis subsp. lactis* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2007. – T. 1774. – №. 10. – C. 1323-1330. doi: 10.1016/j.bbapap.2007.08.008

243. Steenkamp D. J., Hälbich T. J. F. Substrate specificity of the purine-2'-deoxyribonucleosidase of *Crithidia luciliae* //Biochemical Journal. – 1992. – T. 287. – №. 1. – C. 125-129. doi: 10.1042/bj2870125
244. Bosch J. et al. Using fragment cocktail crystallography to assist inhibitor design of *Trypanosoma brucei* nucleoside 2-deoxyribosyltransferase //Journal of medicinal chemistry. – 2006. – T. 49. – №. 20. – C. 5939-5946. doi: 10.1021/jm060429m,
245. Lawrence K. A. et al. *Borrelia burgdorferi* bb0426 encodes a 2'-deoxyribosyltransferase that plays a central role in purine salvage //Molecular microbiology. – 2009. – T. 72. – №. 6. – C. 1517-1529. doi: 10.1111/j.1365- 2958.2009.06740.x
246. Fernández-Lucas J. et al. Enzymatic synthesis of nucleoside analogues using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* //Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – T. 91. – C. 317-327. doi: 10.1007/s00253-011-3221-7
247. Lapponi M. J. et al. New developments in nucleoside analogues biosynthesis: A review //Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2016. – T. 133. – C. 218-233. doi: 10.1016/j.molcatb.2016.08.015
248. Rivero C. W. et al. Green production of cladribine by using immobilized 2'-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus delbrueckii* stabilized through a double covalent/entrapment technology //Biomolecules. – 2021. – T. 11. – №. 5. – C. 657. doi: 10.3390/biom11050657
249. Fernández-Lucas J. et al. *Lactobacillus reuteri* 2'-deoxyribosyltransferase, a novel biocatalyst for tailoring of nucleosides //Applied and environmental microbiology. – 2010. – T. 76. – №. 5. – C. 1462-1470. doi: 10.1128/AEM.01685-09
250. Porter D. J. T., Short S. A. Nucleoside 2-Deoxyribosyltransferase: PRE-STEADY-STATE KINETIC ANALYSIS OF NATIVE ENZYME AND MUTANT ENZYME WITH AN ALANYL RESIDUE REPLACING Glu-98 (*) //Journal of Biological Chemistry. – 1995. – T. 270. – №. 26. – C. 15557-15562. doi: 10.1074/jbc.270.26.15557
251. Holguin J., Cardinaud R., Salemink C. A. Trans-N-Deoxyribosylase: Substrate Specificity Studies: Purine Bases as Acceptors //European Journal of Biochemistry. – 1975. – T. 54. – №. 2. – C. 515-520. doi: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb04164.x
252. Pistotnik E. et al. Assay of nucleoside 2-deoxyribosyltransferase activity with pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupling system //Analytical biochemistry. – 1999. – T. 271. – №. 2. – C. 192-193. doi: 10.1006/abio.1999.4136
253. Crespo N. et al. 2'-Deoxyribosyltransferase from *Leishmania mexicana*, an efficient biocatalyst for one-pot, one-step synthesis of nucleosides from poorly soluble purine bases //Applied

- microbiology and biotechnology. – 2017. – T. 101. – C. 7187-7200. doi: 10.1007/s00253-017-8450-y.;
254. Carson D. A., Wasson D. B. Synthesis of 2', 3'-dideoxynucleosides by enzymatic transglycosylation //Biochemical and biophysical research communications. – 1988. – T. 155. – №. 2. – C. 829-834. doi: 10.1016/S0006-291X(88)80570-9
 255. Freeman G. A. et al. 2-Amino-9-(3-azido-2, 3-dideoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-6-substituted-9H-purines: synthesis and anti-HIV activity //Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 1995. – T. 3. – №. 4. – C. 447-458. doi: 10.1016/0968-0896(95)00030-k
 256. Haertle T. et al. Metabolism and anti-human immunodeficiency virus-1 activity of 2-halo-2', 3'-dideoxyadenosine derivatives //Journal of Biological Chemistry. – 1988. – T. 263. – №. 12. – C. 5870-5875. doi: 10.1016/S0021-9258(18)60646-5
 257. Hutchinson D. W. New approaches to the synthesis of antiviral nucleosides //Trends in biotechnology. – 1990. – T. 8. – C. 348-353. doi: 10.1016/0167-7799(90)90222-J
 258. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. Properties of purine nucleoside phosphorylase (PNP) of mammalian and bacterial origin //Zeitschrift für Naturforschung C. – 1990. – T. 45. – №. 1-2. – C. 59-70.
 259. Oivanen M. et al. Mechanism for Acid-Catalyzed Hydrolysis of Nucleoside and Acyclonucleoside Analogues of Benzimidazole //Nucleosides & Nucleotides. – 1989. – T. 8. – №. 1. – C. 133-144.
 260. Konstantinova I. D. et al. Chemo-enzymatic synthesis and biological evaluation of 5, 6-disubstituted benzimidazole ribo- and 2'-deoxyribonucleosides //Synthesis. – 2013. – T. 45. – №. 02. – C. 272-280. doi: 10.1055/s-0032-1317782
 261. Kharitonova M. I. et al. Chemoenzymatic synthesis and antiherpes activity of 5-substituted 4, 6-difluorobenzimidazoles ribo- and 2'-deoxyribonucleosides //Synthesis. – 2016. – T. 48. – №. 03. – C. 394-406. doi: 10.1055/s-0035-1560911
 262. Walter R. L. et al. 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 & Nucleic Acids. – 1994. – T. 13. – №. 1-3. – C. 689-706. doi: 10.1080/15257779408013273
 263. YAMAZAKI A. et al. Synthesis of 2'- and 3'-deoxyinosines //Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1973. – T. 21. – №. 5. – C. 1143-1146. doi: 10.1248/cpb.21.1143
 264. Mengel, R.; Muhs, W. Urn wandlung von Inosin in 2- und 3-Desoxy- sowie 2,3-Anhydroinosin. Liebigs Ann. Chem. 1977, 10, 1585–1596.

265. Robins, M.J.; Fouron, Y.; Mengel, R. Nucleic Acid Related Compounds. 11. Adenosine 2,3-ribo-Epoxyde. Synthesis, Intramolecular Degradation, and Transformation into 3-Substituted Xylofuranosyl Nucleosides and the lyxo-Epoxyde. *J. Org. Chem.* 1974, 39, 1564–1570.
266. Hori N. et al. Production of 5-methyluridine by immobilized thermostable purine nucleoside phosphorylase and pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus* JTS 859 // *Journal of biotechnology*. – 1991. – Т. 17. – №. 2. – С. 121-131. doi: 10.1016/0168-1656(91)90003-E,
267. Taran S. A. et al. Enzymatic transglycosylation of natural and modified nucleosides by immobilized thermostable nucleoside phosphorylases from *Geobacillus stearothermophilus* // *Russian journal of bioorganic chemistry*. – 2009. – Т. 35. – С. 739-745. doi: 10.1134/S1068162009060107,
268. Del Arco J., Fernández-Lucas J. Purine and pyrimidine salvage pathway in thermophiles: a valuable source of biocatalysts for the industrial production of nucleic acid derivatives // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Т. 102. – С. 7805-7820. doi: 10.1007/s00253-018-9242-8
269. Arnautova A. O. et al. 2-Fluorocordycepin: Chemoenzymatic Synthesis and Study of Anticancer Activities In Vitro // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2025. – Т. 51. – №. 3. – С. 1189-1205. doi: 10.1134/S1068162025601144
270. Robins M. J. et al. Nucleic Acid-Related Compounds. 88. Efficient Conversions of Ribonucleosides into Their 2', 3'-Anhydro, 2'(and 3')-Deoxy, 2', 3'-Didehydro-2', 3'-dideoxy, and 2', 3'-Dideoxynucleoside Analogs // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1995. – Т. 60. – №. 24. – С. 7902-7908. doi: 10.1021/jo00129a034
271. Берзин В. Б. и др. ПРЕПАРАТИВНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА 2-ФТОРАДЕНОЗИНА // *Биоорганическая химия*. – 2009. – Т. 35. – №. 2. – С. 210-214. doi: 10.1134/s1068162009020071
272. WARD D. N. et al. The synthesis of N-(6-PurinyI) amino acids. amino acids with a single reactive amino group Ia // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1961. – Т. 26. – №. 12. – С. 5000-5005. doi: 10.1021/jo01070a054.,
273. Krasnov V. P. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of N-(2-aminopurin-6-yl) and N-(purin-6-yl) amino acids and dipeptides // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – Т. 26. – №. 11. – С. 2645-2648. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.04.017
274. Константинова И. Д., Фатеев И. В., Мирошников А. И. АРСЕНОЛИЗ В ФЕРМЕНТАТИВНОМ СПОСОБЕ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПУРИНОВЫХ β -D-АРАБИНОНУКЛЕОЗИДОВ // *Биоорганическая химия*. – 2016. – Т. 42. – №. 4. – С. 411-411.

- 275. Kharitonova M. I. et al. Chemoenzymatic synthesis of modified 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl benzimidazoles and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1 //Synthesis. – 2017. – T. 49. – №. 05. – C. 1043-1052. doi: 10.1055/s-0036-1588625
- 276. Fateev I. V. et al. Recognition of artificial nucleobases by *E. coli* purine nucleoside phosphorylase versus its Ser90Ala mutant in the synthesis of base-modified nucleosides //Chemistry–A European Journal. – 2015. – T. 21. – №. 38. – C. 13401-13419. doi: 10.1002/chem.201501334
- 277. Esipov R. S. et al. Overexpression of *Escherichia coli* genes encoding nucleoside phosphorylases in the pET/Bl21 (DE3) system yields active recombinant enzymes //Protein Expression and Purification. – 2002. – T. 24. – №. 1. – C. 56-60. doi: 10.1006/prev.2001.1524
- 278. Korovina A. N. et al. Mutations in the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus clinical isolates resistant to antiherpetic drugs //Molecular Biology. – 2010. – T. 44. – C. 431-438. doi: 10.1134/S0026893310030118
- 279. Guskova A. et al. Molecular genetic analysis of thymidine kinase of the herpes simplex virus type 1 //Molecular Biology. – 2005. – T. 39. – №. 1.