

УДК 577.152.242

ПОЛУЧЕНИЕ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ АНАЛОГОВ ПУРИНОВЫХ ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДОВ: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

© 2022 г. М. С. Дреничев¹, Е. О. Доринова¹, И. В. Варижук¹, В. Е. Ословский¹, М. А. Варга¹, Р. С. Есипов², Д. Д. Лыкошин², К. С. Алексеев^{1,*,**}

Представлено академиком РАН С.Н. Кочетковым

Поступило 27.10.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принято к публикации 01.12.2021 г.

В работе проведен сравнительный анализ условий трансгликозилирования, катализируемого нуклеозидфосфорилазами *E. coli*, и определены оптимальные условия образования различных нуклеозидов. В условиях реакции трансгликозилирования, исходя из рибонуклеозидов, получены фторсодержащие производные *N*⁶-бензил-2'-дезоксиаденозина – потенциальные ингибиторы репликации энтеровирусов в клетке.

Ключевые слова: аденозин, 7-метилгуанозин, нуклеозидфосфорилаза, ферменты, трансгликозилирование, фторсодержащие производные, бензиладенин

DOI: 10.31857/S268673892202007X

ВВЕДЕНИЕ

Методы ферментативного трансгликозилирования широко применяются для получения лекарственных веществ на основе нуклеозидов и их аналогов и основаны на реакции переноса углеводного остатка с одного гетероциклического основания на другое [1–3]. В качестве катализаторов данных реакций выступают нуклеозидфосфорилазы (НФ), которые осуществляют обратимый фосфорилиз рибонуклеозидов/2'-дезоксирибонуклеозидов с образованием соответствующего гетероциклического основания и α -D-(2-деокси)рибофуранозо-1-фосфата ((d)Rib-P). Равновесие реакции фосфорилиза смещено в сторону образования нуклеозидов, причем в случае пуриновых более значительно [1–6]. Обычно используют сопряженные реакции фосфорилиза – нуклеозида-донора углеводной части и нуклеозида, содержащего гетероциклическое основание-акцептор (рис. 1). Эта общая схема позволяет получать новые моди-

фицированные нуклеозиды в зависимости от набора используемых исходных соединений и субстратной специфичности НФ.

Ранее в лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений (ДиСБАС) ИМБ РАН были изучены подходы к оптимизации реакции трансгликозилирования с использованием 7-метил-2'-дезоксигуанозина в качестве исходного субстрата для получения α -D-2-дезоксирибо-1-фосфата (dRib-1-P), 5-замещенных производных 2'-дезоксисуридина, кладрибина и аллопуринол-рибозида [5, 7], была предложена математическая модель процесса трансгликозилирования, которая может применяться для количественной оценки влияния начальных условий на результат трансгликозилирования [8]. Настоящая работа является продолжением ранее начатых исследований, целью которых являются расширение знаний о субстратной специфичности НФ и получение модифицированных аналогов природных нуклеозидов методом ферментативного трансгликозилирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе работы был проведен сравнительный анализ реакции трансгликозилирования с участием пуриновых (ПНФ) и пиримидиновых (УрФ, ТФ) нуклеозидфосфорилаз *E. coli* (табл. 1). Выбор ферментов бактериального происхождения в качестве катализаторов был обусловлен их

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

²Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: room517@imb.ru

**e-mail: micelle@mail.ru

Стадия 1: Фосфорилиз нуклеозида

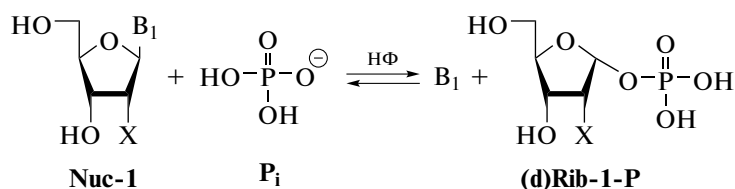
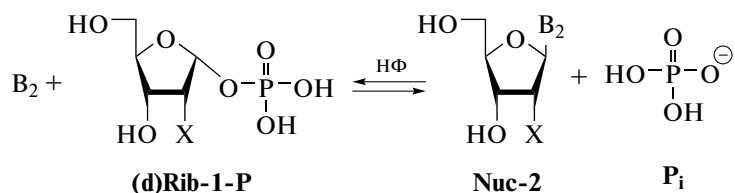
Стадия 2: Синтез нового нуклеозида (перенос углеводного остатка на другое основание B₂)

Рис. 1. Реакция трансгликозилирования. НФ – нуклеозидфосфорилазы, Nuc-1 – нуклеозид-донор, Nuc-2 – целевой нуклеозид, B₁ и B₂ – гетероциклические основания, Pi – фосфат-анион, X=H или OH. Условия реакций: НФ – ПНФ *E. coli*, УрФ *E. coli*, ТФ *E. coli*, 50 мМ Tris-HCl буфер (рН 7.5), 20°C. Составлено по материалам работы [6].

широкой субстратной специфичностью, оптимумом рН в нейтральной/слабощелочной средах и достаточно широким рабочим интервалом температур, что позволяет проводить реакцию в мягких условиях без заметного неспецифического расщепления *N*-гликозидной связи с выходами целевых продуктов, близкими к теоретически предсказываемым [8–13].

Согласно рис. 1, реакция трансгликозилирования протекает через стадию образования α -*D*-рибозо-1-фосфата (Rib-1-P) или α -*D*-2-дезоксирибозо-1-фосфата (dRib-1-P). В синтезе пуриновых нуклеозидов из пиримидиновых и наоборот требуется участие двух ферментов: ПНФ и УрФ (или ТФ). Константы равновесия фосфорилиза природных пиримидиновых нуклеозидов в присутствии УрФ и ТФ выше, чем константы равновесия фосфорилиза природных пуриновых нуклеозидов в присутствии ПНФ [2, 5, 8, 11, 14], поэтому более целесообразно использование в качестве доноров Rib-1-P и dRib-1-P пиримидиновых нуклеозидов, а не пуриновых [8, 15, 16].

Хорошо подтверждают эту целесообразность экспериментальные данные, приведенные в табл. 1.

При получении аденозина из уридина реакция протекала с высоким выходом, который определяли как отношение равновесной концентрации продукта к начальной концентрации исходного основания или гликозил-донора в зависимости от того, что было взято в недостатке (табл. 1, строки 1–3, 77–94% по данным ВЭЖХ). При получении уридина из аденозина выход реакции значи-

тельно снижался (табл. 1, строки 4–6, 22–27% по данным ВЭЖХ). В ряду пуриновых нуклеозидов инозин выступал в качестве более продуктивного гликозил-донора, чем аденозин, поэтому реакция получения аденозина из инозина протекала с более высоким выходом (табл. 1, строка 8, 76% по данным ВЭЖХ), чем обратная реакция (табл. 1, строка 7, 53% по данным ВЭЖХ). С повышением количества нуклеозида-донора в реакционной смеси закономерно удается повысить выход целевого нуклеозида (и, соответственно, конверсию основания), но при этом также увеличивается количество непрореагировавших компонентов, что увеличивает трудоемкость последующей обработки реакционной смеси и ее очистку (табл. 1, строки 3, 6, 13, 15).

Упрощение реакции трансгликозилирования может быть проведено двумя путями:

1) исключение стадии фосфорилиза нуклеозида, выступающего в качестве гликозил-донора в реакции трансгликозилирования (рис. 1, стадия 1), введением в реакцию готового Rib-1-P или dRib-1-P [7];

2) превращение стадии 1 в необратимую, используя в качестве источника рибозного остатка 7-метил-(2'-дезоксигуанозина (7-Me(d)Guo) за счет его практически необратимого фосфорилиза [17, 18].

Использование (d)Rib-1-P уменьшает число компонентов в составе реакционной смеси, облегчает выделение целевых соединений и позво-

Таблица 1. Сравнительный анализ условий трансгликозилирования, катализируемого нуклеозидфосфорилазами *E. coli*.¹

№	Гликозил- донор (Д)	Основание (О)	Продукт	Д: О: Р ₁ (моль)	Фермент	Выход (по данным ВЭЖХ)	Конверсия основания О в нуклеозид (по данным ВЭЖХ)
1	Urd	Ade	Ado	1:1:5:1	УрФ/ПНФ	77%	51%
2	Urd	Ade	Ado	1.5:1:1	УрФ/ПНФ	88%	88%
3	Urd	Ade	Ado	3:1:2	УрФ/ПНФ	94%	94%
4	Ado	Ura	Urd	1:1.5:1	ПНФ/УрФ	22%	13%
5	Ado	Ura	Urd	1.5:1:1	ПНФ/УрФ	22%	22%
6	Ado	Ura	Urd	3:1:0.5	ПНФ/УрФ	27%	27%
7	Ado	Hyp	Ino	1:1.5:1	ПНФ	53%	35%
8	Ino	Ade	Ado	1:1.5:1	ПНФ	76%	53%
9	7-Me-Guo	Ura	Urd	1:1.5:1	ПНФ/УрФ	63%	42%
10	7-Me-Guo	Ura	Urd	1.5:1:1	ПНФ/УрФ	80%	80%
11	7-Me-Guo	Ade	Ado	1:1.5:1	ПНФ	79%	52%
12	7-Me-Guo	Ade	Ado	1.5:1:1	ПНФ	94%	94%
13	7-Me-Guo	Ade	Ado	3:1:2	ПНФ	100%	99%
14	Rib-P	Ade	Ado	1:1.5	ПНФ	98%	66%
15	Thd	5-Et-Ura	5-Et-Urd	5:1:0.5	ТФ	80%	80%
16	7-Me-dGuo	PfPh-Ade	PfPh-dAdo	1.5:1:1	ПНФ	89%	89%
				1.5:1:0.5		95%	95%
				1.5:1:0.25		97%	97%
17	7-Me-dGuo	<u>TFMBn-Ade</u>	TFMBn-dAdo	1.5:1:1	ПНФ	96%	96%
				1.5:1:0.5		98%	98%
				1.5:1:0.25		100%	100%

¹Условия реакции: Реакции проводились в пластиковых пробирках 1.5 мл, объем реакционной смеси 1 мл в 50 мМ Tris-HCl (рН 7.5) буфере, концентрации субстратов Д: О: Р₁ в диапазоне 0.01–1 мМ, 0.35 ед. ПНФ *E. coli*, 0.34 ед. УрФ *E. coli*. Условия анализа: линейный градиент 2–12% CH₃CN в 0.08% водном растворе ТФУ за 10 мин, колонка 4.6 × 150 mm Luna C18(2) (строки 1–6, 9–15); 0.5–3% CH₃CN в 0.08% водном растворе ТФУ за 15 мин, колонка 4.6 × 150 mm Luna C18(2) (строки 7, 8); 2–60% CH₃CN в 10 мМ водном растворе ацетата натрия за 25 мин, колонка 4.6 × 250 mm Nucleosil C18 (строки 16, 17).

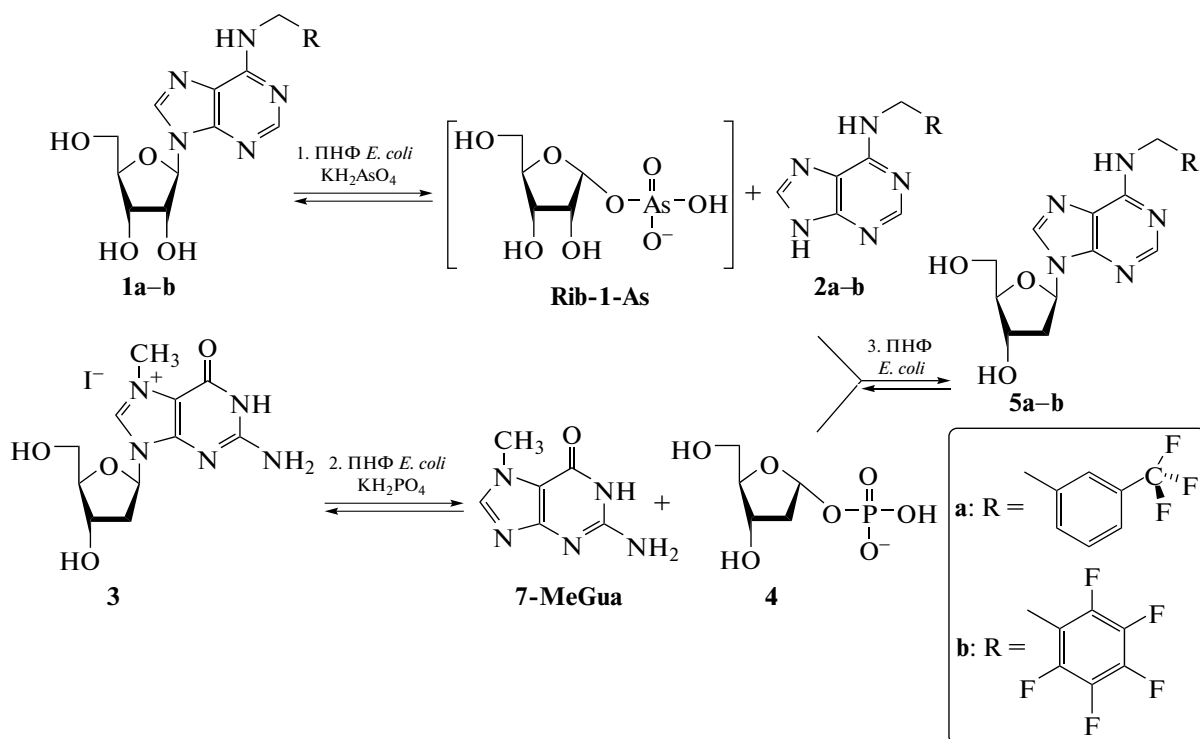


Рис. 2. Синтез фторсодержащих 2'-деоксирибонуклеозидов из рибонуклеозидов. Реагенты и условия: (1) **1a-b** (0.212–0.235 ммоль), ПНФ *E. coli* (0.25 единиц), KH_2AsO_4 (0.212–0.235 ммоль), 50 мМ Tris-HCl-буфер (pH 7.5, 10 мл), 50°C, 20 ч – **2a** (91%), **2b** (85%). (2–3). **2a** (20 мг, 0.068 ммоль), **2b** (20 мг, 0.064 ммоль), **3** (0.102 ммоль), ПНФ *E. coli* (0.98 единиц), KH_2PO_4 (0.064–0.068 ммоль), 50 мМ Tris-HCl-буфер (pH 7.5, 63 мл) – ДМСО (10%, 7 мл), 20°C, 24 ч – 86% (**5a**), 47% (**5b**).

ляет существенно сместить равновесие реакции гликозилирования в сторону образования нуклеозидов (табл. 1, строка 14, 98% по данным ВЭЖХ, выход рассчитывался по реагенту, взятому в недостатке – Rib-1-P). Замена (d)Rib-1-P на более доступный 7-Me(d)Guo приводит к сравнимым выходам продуктов реакции (табл. 1).

ПНФ *E. coli* была применена для получения из коммерчески более доступных рибонуклеозидов менее доступных дезоксирибонуклеозидов: N^6 -пентафторфенилметил-2'-деоксиаденозина (PFPh-dAdo, **5b**) и N^6 -(3-трифторметилбензил)-2'-деоксиаденозина (TFMBn-dAdo, **5a**) (рис. 2) – потенциальных ингибиторов репликации энтеровирусов в клетке [19].

Метод синтеза состоял из трех отдельных стадий, протекание каждой стадии катализировалось ПНФ *E. coli*. Исходные основания N^6 -(3-трифторметилбензил)аденин (TFMBn-Ade, **2a**) и N^6 -пентафторфенилметиладенин (PFPh-Ade, **2b**) были получены из рибонуклеозидов в условиях ферментативного арсенлиза (рис. 2, стадия 1). В основе ферментативного арсенлиза лежит расщепление рибонуклеозида в присутствии дигидроортоарсената калия (KH_2AsO_4) на пуриновое основание и высоко лабильный α -D-рибофу-

ранозо-1-арсенат (Rib-1-As), который необратимо гидролизуется, что смещает равновесие расщепления рибонуклеозида в сторону образования основания [20]. К смещению равновесия также приводит плохая растворимость гетероциклических оснований **2a** и **2b** в воде и в Tris-HCl буфере. Для предотвращения образования смеси рибо- и дезоксирибонуклеозидов в ходе дальнейших стадий стадия 1 должна проводиться в отдельной колбе. Далее основания **2a** и **2b** отфильтровывали и вводили в реакцию трансгликозилирования с 7-Me-dGuo в присутствии дигидроортофосфата калия и ПНФ *E. coli* (рис. 2, стадия 2–3). В реакционной смеси 7-Me-dGuo превращался в dRib-1-P (рис. 2, стадия 2), который далее вступал в реакцию с фторсодержащим основанием (рис. 2, стадия 3). Стадии 2 и 3 проводились в одной колбе. Для увеличения растворимости основания реакцию проводили в буферном растворе с добавлением 10% (об.) диметилсульфоксида.

Концентрация диметилсульфоксида в реакционной смеси не влияла существенным образом на ферментативную активность ПНФ, что согласуется с литературными данными [18]. Реакцию трансгликозилирования проводили при разных соотношениях гликозил-донор: основание : фос-

фат (табл. 1). Проведение реакции с небольшим избытком гликозил-донора в присутствии эквимолярного количества фосфата (1.5: 1: 1) или его недостатка (1.5: 1: 0.5, 1.5: 1: 0.25) приводило к высоким выходам целевых нуклеозидных продуктов при незначительном падении скорости реакции по сравнению со скоростью реакции в присутствии эквимолярных количеств фосфата. С повышением количества фосфата в реакционной смеси (начиная с эквимолярного количества и выше) возрастает скорость образования dRib-1-P, гидролиз которого может снижать выходы целевых нуклеозидов (табл. 1, строки 16–17), поэтому наибольшие выходы были достигнуты при соотношении гликозил-донор: основание: фосфат – 1.5:1:0.25 (табл. 2). Выход препаративного метода получения продукта **5a** составил 100% по ВЭЖХ (86% после очистки методом обращенно-фазной хроматографии на силикагеле- C_{18}), продукта **5b** – 92% по данным ВЭЖХ (47% после аналогичной очистки, низкий выход обусловлен сорбцией вещества на силикагеле- C_{18}).

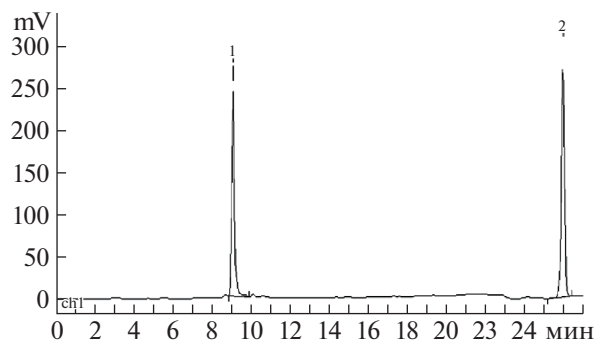
Структура полученных соединений была подтверждена методами ЯМР-спектроскопии. В ^{13}C -ЯМР спектре трифторметилзамещенного дезоксирибонуклеозида **5a** присутствовал резонансный сигнал трифторметильной группы в виде квартета низкой интенсивности с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^1J_{C-F} = 31$ Гц. В ^{13}C -ЯМР спектре пентафторзамещенного дезоксирибонуклеозида **5b** присутствовали резонансные сигналы ядер ^{13}C фенильной группы в виде трех широких дублетов с КССВ $^1J_{C-F}$ порядка 250 Гц. В ^{19}F -ЯМР спектре сигнал трифторметильной группы соединения **5a** был разрешен в виде синглета с химическим сдвигом $\delta = 61.4$ м.д. ^{19}F -ЯМР спектр пентафторзамещенного нуклеозида **5b** показывает сложное спин-спиновое взаимодействие: дублет дублетов для ядер ^{19}F в *орто*-положении фенильного заместителя с КССВ $^3J_{F-F} = 22$ Гц, $^4J_{F-F} = 6$ Гц, триплет дублетов для ядер ^{19}F в *мета*-положении с КССВ $^3J_{F-F} = 22$ Гц, $^4J_{F-F} = 6$ Гц и триплет для ядер ^{19}F в *пара*-положении фенильного кольца с КССВ $^3J_{F-F} = 22$ Гц. Наличие пентафторзамещенного фрагмента в составе структуры **5b** подтверждалось также спектром 1H -ЯМР, в котором не наблюдались резонансные сигналы протонов фенильной группы.

В настоящее время проводится изучение противовирусной активности полученных соединений.

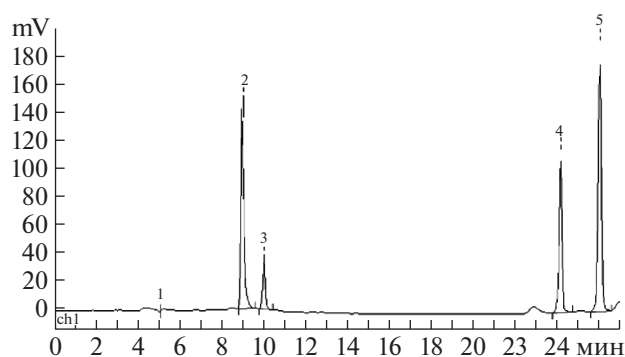
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения реакций и выделения веществ использовались коммерчески доступные реагенты и растворители. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ-анализа на приборе Стайер-М

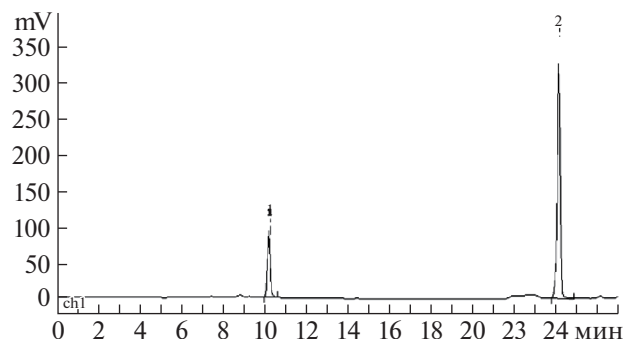
Таблица 2. ВЭЖХ-анализ реакции образования нуклеозида **5a** из основания **2a** и 7Me-dGuo (**3**) в присутствии ПНФ *E. coli*



A ($t_{initial}$): 1 – 7Me-dGuo (**3**); 2 – TFMBn-Ade (**2a**)



B (35 мин): 2 – 7Me-dGuo (**3**); 3 – 7-MeGua; 4 – TFMBn-dAdo (**5a**), 5 – TFMBn-Ade (**2a**)



C ($t_{equilibrium}$): 1 – 7-MeGua, 2 – TFMBn-dAdo (**5a**)

Условия анализа: Nucleosil 100–5 C18 4.6 × 250 мм (5 мкм, Macherey-Nagel GmbH&Co. KG), MeCN в 10 mM NaOAc/H₂O от 2 до 60% (25 мин) (с дальнейшей промывкой в системе 60–80% MeCN/10 mM NaOAc/H₂O за 25–25.1 мин, затем 80–2% за 25.1–25.9 мин), поток 1 мл/мин, УФ – 265 нм.

(Аквилон, Россия). Условия ВЭЖХ анализа: колонка 4.6 × 250 мм (Nucleosil 100–5 C18, 5 мкм, Macherey-Nagel GmbH&Co. KG) линейный градиент ацетонитрила в 10 mM растворе ацетата натрия в деионизированной воде от 2 до 60% в течение 25 мин (с дальнейшей промывкой в системе 60–80% ацетонитрил/10 mM NaOAc в H₂O за 25–25.1 мин, затем 80–2% за 25.1–25.9 мин) при ско-

рости потока 1 мл/мин, УФ детекция производилась при 265 нм, объем пробы 20 мкл. ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker AMX 400 (Германия). Величины констант спин – спинового взаимодействия (КССВ, J) измерены в герцах (Гц). При описании спектров ЯМР приняты следующие сокращения: с – синглет, ус – уширенный синглет, д – дублет, дд – дублет дублетов, ддд – дублет дублетов дублетов, т – триплет, дт – дублет триплетов, м – мультиплет. Калибровку спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР проводили по остаточному сигналу растворителя $\text{DMSO-}d_6$ (2.50 и 39.52 м.д.).

Получение N^6 -(2,3,4,5,6-пентафторбензил)аденина (2b)

К смеси N^6 -(2,3,4,5,6-пентафторбензил)аденозина **1b** (95 мг, 0.212 ммоль) и KH_2AsO_4 (38 мг, 0.212 ммоль, 1 экв) в 50 мМ трис-НСI буфере pH 7.5 (10 мл) добавляли ПНФ (0.050 мл, 5 единиц активности) и выдерживали смесь при 50°C в течение 20 ч. В ходе реакции наблюдались растворение исходного нуклеозида и кристаллизация продукта. Через 20 ч реакционную смесь остужали до комнатной температуры и выдерживали 24 ч при +4°C. Выпавший осадок фильтровали, промывали водой (5 × 5 мл) и сушили в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 в течение суток. Выход 57 мг (85%) в виде белого порошка. $R_f = 0.4$ (CH_2Cl_2 :EtOH-95:5 v/v). ^1H -ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 12.96$ (уш с, 1H, N9H), 8.21 (с, 1H, H2-Ade), 8.15 (уш с, 1H, $N^6\text{H}$), 8.11 (с, 1H, H8-Ade), 4.83 (уш с, 1H, $N^6\text{CH}_2$). ^{19}F -ЯМР (282 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = -142.50$ (дд, $^3J_{\text{F-F}} = 24.0$ Гц, $^4J_{\text{F-F}} = 7.9$ Гц), -156.85 (т, $^3J_{\text{C-F}} = 22.1$), -163.68 (тт, $^3J_{\text{F-F}} = 23.1$ Гц, $^4J_{\text{F-F}} = 7.8$ Гц).

Получение N^6 -(3-трифторметилбензил)аденина (2a)

Методика аналогична получению N^6 -(2,3,4,5,6-пентафторбензил)аденина (**2b**), исходя из N^6 -(3-трифторметилбензил)аденозина (**1a**) (100 мг, 0.235 ммоль). Выход **2a** 63 мг (91%) в виде белого порошка. $R_f = 0.42$ (CH_2Cl_2 :EtOH – 95:5 v/v). ^1H -ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 12.95$ (уш с, 1H, N9H), 8.29 (уш с, 1H, $N^6\text{H}$), 8.17 (с, 1H, H2-Ade), 8.12 (с, 1H, H8-Ade), 8.0–7.4 (м, 4H, Ph), 4.81 (уш с, 1H, $N^6\text{CH}_2$). ^{19}F -ЯМР (282 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = -61.00$.

Получение N^6 -(3-трифторметилбензил)-2'-дезоксиаденозина (5a)

К 70 мл раствора 7-метил-2'-дезоксигуанозина (41.82 мг, 0.102 ммоль), мета-трифторметилбензиладенина (20.00 мг, 0.068 ммоль) и дигидрофос-

фата калия (2.32 мг, 0.017 ммоль) в 50 мМ Трис-НСI-буфере (pH 7.5) с добавлением 10% (об.) ДМСО при комнатной температуре добавляли 0.98 ед. ПНФ *E. coli* (10 мкл раствора 1.0 мг/мл-Sigma с концентрацией 98 ед/мл), аккуратно перемешивали 5 мин и оставляли при комнатной температуре на 24 ч. Выпавший осадок 7-метилгуанина отфильтровывали через нейлоновую мембрану Phenomenex (диаметр 47 мм, размер пор 0.2 мкм). Отфильтрованный прозрачный раствор упаривали в вакууме до объема ~7 мл, разбавляли водой (7 мл) и наносили на колонку с обращенно-фазным сорбентом C_{18} . Выход: 99% (ВЭЖХ, количественный). Колонку промывали смесью вода : этанол с градиентом концентрации этанола 0–20%. Продукт элюировали в системе вода : этанол-60: 40. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме, соупаривали с этанолом. Выход после выделения и очистки составил 26 мг (86%) в виде пены. ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.51$ (уш с, 1H, $N^6\text{H-Ade}$), 8.38 (с, 1H, H2-Ade), 8.21 (с, 1H, H8-Ade), 7.71 с (1H, *o*-H, Ph), 7.65 д (1H, $^3J = 7.2$, *p*-H, Ph), 7.60–7.49 м (2H, Ph), 6.36 дд (1H, $J_{1'2'a} = 7.6$, $J_{1'2'b} = 6.2$, H-1'), 5.32 уш с (1H, 3'-OH), 5.19 уш.с (1H, 5'-OH), 4.79 уш с (2H, CH_2), 4.46–4.38 м (1H, H-3'), 3.89 тд (1H, $J_{4'5'a} = J_{4'3'} = 4.2$, $J_{4'5'b} = 2.6$, H-4'), 3.62 уш.д. (1H, $J_{5'a5'b} = -11.7$, H-5'a), 3.52 уш.д. (1H, $J_{5'b5'a} = -11.7$, H-5'b), 2.73 ддд (1H, $J_{2'a2'b} = -13.3$, $J_{2'a1'} = 7.6$, $J_{2'b3'} = 5.9$, H-2'a), 2.27 ддд (1H, $J_{2'b2'a} = -13.3$, $J_{2'b1'} = 6.2$, $J_{2'b3'} = 2.6$, H-2'b). ^{13}C -ЯМР (150 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): 154.37 (C-2), 152.32 (C-4), 141.59 (C-6), 139.74 (C-8), 131.33 (Ph), 129.29 (Ph), 128.90 q ($^1J_{\text{C-F}} = 31.4$, CF_3), 123.65 q ($^3J_{\text{C-F}} = 3.8$, Ph), 123.43 q ($^3J_{\text{C-F}} = 3.7$, Ph), 119.68 (C-5), 88.03 (C-1'), 83.97 (C-3'), 70.94 (C-4'), 61.87 (C-5'), 42.62 (CH_2), 39.47 (C-2'). ^{19}F -ЯМР (282 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = -61.04$.

Получение N^6 -(2,3,4,5,6-пентафторфенил-1-метил)-2'-дезоксиаденозина (5b)

Методика аналогична предыдущей, исходя из N^6 -(2,3,4,5,6-пентафторбензил)аденина (20.00 мг, 0.064 ммоль). Очистку проводили на колонке с обращенно-фазным сорбентом C_{18} с использованием в качестве подвижной фазы смеси вода : этанол с градиентом концентрации этанола 0–20%. Выход 13 мг (47%) в виде белой серебристой пены. ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.37$ (с, 1H, H2-Ade), 8.35 (уш с, 1H, $N^6\text{H-Ade}$), 8.25 (с, 1H, H8-Ade), 6.35 дд (1H, $J_{1'2'a} = 7.6$, $J_{1'2'b} = 6.2$, H-1'), 5.30 уш с (1H, 3'-OH), 5.14 уш.т (1H, $J_{5'\text{OH}} = 4.2$, 5'-OH), 4.82 уш с (2H, CH_2), 4.45–4.37 м (1H, H-3'), 3.87 тд (1H, $J_{4'5'a} = J_{4'3'} = 4.3$, $J_{4'5'b} = 2.8$, H-4'), 3.62 уш.д. (1H, $J_{5'a5'b} = -11.7$, H-5'a), 3.55–3.45 м (1H, H-5'b), 2.72 ддд (1H, $J_{2'a2'b} = -13.3$, $J_{2'a1'} = 7.7$, $J_{2'b3'} = 5.8$, H-

2'a), 2.27 ддд (1H, $J_{2'b2'a} = -13.3$, $J_{2'b1'} = 6.1$, $J_{2'b3'} = 2.8$, H-2'b). ^{13}C -ЯМР (150 МГц, DMSO- d_6): 153.85 (C-2), 152.14 (C-4), 148.57 (C-6), 145.10 дддд ($^1J_{\text{C-F}} = 245.8$, $^2J_{\text{C-F}} = 13.2$, $^2J_{\text{C-F}} = 9.1$, $^3J_{\text{C-F}} = 3.9$, орто- C_6F_5), 139.79 (C-8), 139.68 дддд ($^1J_{\text{C-F}} = 250.5$, $^2J_{\text{C-F}} = 13.7$, $^2J_{\text{C-F}} = 12.4$, $^3J_{\text{C-F}} = 5.6$, мета- C_6F_5), 136.69 дтт ($^1J_{\text{C-F}} = 248.8$, $^2J_{\text{C-F}} = 12.6$, $^3J_{\text{C-F}} = 3.9$, пара- C_6F_5), 119.65 (C-5), 113.01 т ($^2J_{\text{C-F}} = 17.6$, C-1- C_6F_5), 87.98 (C-1'), 83.88 (C-3'), 70.88 (C-4'), 61.81 (C-5'), 39.42 (C-2'), 32.22 (CH_2). ^{19}F -ЯМР (282 МГц, DMSO- d_6): $\delta = -142.50$ дд ($^3J_{\text{F-F}} = 22$ Гц, $^4J_{\text{F-F}} = 6$ Гц), -156.74 т ($^3J_{\text{F-F}} = 22$ Гц), -163.65 тд ($^3J_{\text{F-F}} = 22$ Гц, $^4J_{\text{F-F}} = 6$ Гц).

ВЫВОДЫ

В ходе работы был проведен сравнительный анализ условий трансгликозилирования в присутствии нуклеозидфосфорилаз *E. coli*, который позволил оптимизировать условия ферментативного синтеза N^6 -пентафторфенилметил-2'-дезоксиаденозина и N^6 -(3-трифторметилбензил)-2'-дезоксиаденозина, потенциальных нуклеозидных ингибиторов репликации энтеровирусов в клетке.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 21-14-00346).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I. Biologically important nucleosides: modern trends in biotechnology and application // Mendeleev ComMun. 2011. V. 21. № 2. P. 57–68.
- Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I. New trends in nucleoside biotechnology // Acta Naturae. 2010. V. 2. № 5. P. 36–56.
- Iglesias L.E., Lewkowicz E.S., Medici R., Bianchi P., Iribarren A.M. Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs. // Biotechnol. Adv., 2015. V. 33. № 5. P. 412–434.
- Parker W.B. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. // Chem. Rev. 2009. V. 109. № 7. P. 2880–2893.
- Goldberg R.N., Tewari Y.B., Bhat T.N. Thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions – a database for quantitative biochemistry. // Bioinformatics. 2004. V. 20. P. 2874–2877.
- Drenichev M.S., Alexeev C.S., Kurochkin N.N. et al. Use of nucleoside phosphorylases for the preparation of purine and pyrimidine 2'-deoxynucleosides. // Adv. Synth. Catal. 2018. V. 360. P. 305–312.
- Kulikova I.V., Drenichev M.S., Solyev P.N., Alexeev C.S. and Mikhailov S.N. Enzymatic Synthesis of 2-Deoxyribose 1-Phosphate and Ribose 1 Phosphate and Subsequent Preparation of Nucleosides. // Eur. J. Org. Chem. 2019. P. 6999–7004.
- Alexeev C.S., Kulikova I.V., Gavryushov S. et al. Quantitative prediction of yield in transglycosylation reaction catalyzed by nucleoside phosphorylases. // Adv. Synth. Catal. 2018. V. 360. P. 3090–3096.
- Ubiali D., Rocchietti S., Scaramozzino F., Terreni M., Albertini A.M., Fernandez-Lafuente R., Guisa J.M., Pregnolato M. Synthesis of 2'-Deoxynucleosides by Transglycosylation with New Immobilized and Stabilized Uridine Phosphorylase and Purine Nucleoside Phosphorylase. // Adv. Synth. Catal. 2004. V. 346. P. 1361–1366.
- Gordon G.E.R., Visser D.F., Brady D., Raseroka N., Moira L., Bode M.L. Defining a process operating window for the synthesis of 5-methyluridine by transglycosylation of guanosine and thymine. // Journal of Biotechnology. 2011. V. 151. P. 108–113.
- Serra I., Bavaro T., Cecchinia D.A., Daly S., Albertini A.M., Terreni M., Ubiali D. A comparison between immobilized pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Bacillus subtilis* and thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* in the synthesis of 5-substituted pyrimidine 2-deoxyribonucleosides. // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013. V. 95. P. 16–22.
- Cattaneo G., Rabuffetti M., Speranza G., Kupfer T., Peters B., Massolini G., Ubiali D., Calleri E. Synthesis of Adenine Nucleosides by Transglycosylation using Two Sequential Nucleoside Phosphorylase-Based Bioreactors with On-Line Reaction Monitoring by using HPLC. // ChemCatChem. 2017. V. 9. P. 4614–4620.
- Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. Properties of Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) of Mammalian and Bacterial Origin. // Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences. 1990. V. 45. P. 59–70.
- Alexeev C.S., Drenichev M.S., Dorinova E.O., Esipov R.S., Kulikova I.V., Mikhailov S.N. Use of nucleoside phosphorylases for the preparation of 5-modified pyrimidine ribonucleosides. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics. V. 1868. P. 140292.
- Roivainen J., Elizarova T., Lapinjoki S., Mikhailopulo I.A., Esipov R.S., Miroshnikov A.I. An Enzymatic Transglycosylation of Purine Bases. // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2007. P. 905–909.
- Zuffi G., Ghisotti D., Oliva I., Capra E., Frascotti G., Tonon G., Orsini G. Immobilized Biocatalysts for the Production of Nucleosides and Nucleoside Analogues by Enzymatic Transglycosylation Reactions. // Biocatalysis and Biotransformation. 2004. V. 22. P. 25–33.
- Kulikowska E., Bzowska A., Wierzchowski J., Shugar D. Properties of two unusual, and fluoresecent, substrates of purine-nucleoside phosphorylase: 7-methylguanosine and 7-methylinosine. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 874. P. 355–363.
- Rabuffetti M., Bavaro T., Semproli R., Cattaneo G., Masone M., Morelli C.F., Speranza G., Ubiali D. Synthesis

- of ribavirin, tecadenoson, and cladribine by enzymatic transglycosylation. // *Catalysts*. 2019. V. 9. P. 355.
19. *Oslovsky V.E., Drenichev M.S., Sun L., Kurochkin N.N., Kunetsky V.E., Mirabelli C., Neyts J., Leyssen P., Mikhailov S.N.* Fluorination of naturally occurring N^6 -benzyladenosine remarkably increased its antiviral activity and selectivity. // *Molecules*. 2017. V. 22. № 7. P. 1219.
20. *Kline P.C., Schramm V.L.* Purine nucleoside phosphorylase. Catalytic mechanism and transition-state analysis of the arsenolysis reaction. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. № 48. P. 13212–13219.

SYNTHESIS OF FLUORINE-CONTAINING ANALOGUES OF PURINE DEOXINUCLEOSIDES: OPTIMIZATION OF ENZYMATIC TRANSGLYCOSYLATION CONDITIONS

M. S. Drenichev^a, E. O. Dorinova^a, I. V. Varizhuk^a, V. E. Oslovsky^a, M. A. Varga^a, R. S. Esipov^b, D. D. Lykoshin^b, and C. S. Alexeev^{a, #, ##}

^a*Laboratory of Design and Synthesis of Biologically Active Compounds, Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

^b*Laboratory of Biopharmaceutical Technologies, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: micelle@mail.ru*

^{##}*e-mail: room517@eimb.ru*

Presented by Academician of the RAS S.N. Kochetkov

In this work, a comparative analysis of the conditions of transglycosylation reactions catalyzed by *E. Coli* nucleoside phosphorylases was carried out, and the optimal conditions for the formation of various nucleosides were determined. Under the optimized conditions of transglycosylation reaction, fluorine-containing derivatives of N^6 -benzyl-2'-deoxyadenosine, potential inhibitors of replication of enteroviruses in a cell, were obtained starting from the corresponding ribonucleosides.

Keywords: adenosine, 7-methylguanosine, nucleoside phosphorylase (NP), enzymes, transglycosylation, fluorine-containing derivatives, benzyladenine