

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 57.042

ГЛИКОЛЕВЫЕ И ФОСФАТНЫЕ ДЕПО-ФОРМЫ
4- И/ИЛИ 5-МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ,
ПРОЯВЛЯЮЩИХ ПРОТИБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2021 г. С. Д. Негря^а, М. В. Ясько^а, Д. А. Макаров^{а, д}, П. Н. Сольев^а, И. Л. Карпенко^а,
О. В. Шевченко^а, О. В. Чехов^{а, с}, А. А. Глухова^б, Б. Ф. Васильева^б, Т. А. Ефименко^б,
И. Г. Сумарукова^б, О. В. Ефременкова^б, С. Н. Кочетков^а, Л. А. Александрова^{а, *}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бНаучно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

^сМосковский физико-технический институт (государственный университет)

Долгопрудный, Московская область, 141700 Россия

^дРоссийский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Высший химический колледж
Российской академии наук, Москва, 125047 Россия

*e-mail: ala2004_07@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2020 г.

После доработки 24.06.2020 г.

Принята к публикации 25.06.2020 г.

Возникновение резистентности к большинству препаратов, применяемых при инфекционных заболеваниях, требует создания новых соединений, эффективных в отношении лекарственно-устойчивых штаммов патогенов. Недавно мы синтезировали несколько групп модифицированных нуклеозидов, показавших значительную протибактериальную активность *in vitro*, однако их дальнейшее изучение затрудняла низкая растворимость в водных средах. В связи с этим мы синтезировали соединения, хорошо растворимые в водно-органических средах, которые оказались более эффективными ингибиторами роста грамположительных бактерий и микобактерий. Мы предположили, что рассмотренные в настоящем сообщении растворимые формы модифицированных нуклеозидов представляют собой их депо-формы. Для подтверждения этого предположения изучена способность этих соединений гидролизываться в различных средах, а также проведен молекулярный докинг соединений в активный центр предполагаемого белка-мишени – флавинозависимой тимидилатсинтазы *Mycobacterium tuberculosis* (ThuX). Результаты компьютерного моделирования показали, что водорастворимые производные не являются ингибиторами тимидилатсинтазы ThuX, что может подтвердить наше предположение о действии производных нуклеозидов как депо-форм. Соединения были устойчивы к химическому гидролизу, но гидролизовались и карбоксилэстеразой печени свиньи, и в сыворотке крови человека, а также при инкубации со *Staphylococcus aureus* 209P. Полученные данные позволяют со значительной долей уверенности утверждать, что изученные соединения являются депо-формами модифицированных нуклеозидов.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, противовирусная и протибактериальная активность, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, пролекарство, депо-форма лекарственных препаратов, тимидилатсинтаза *Mycobacterium tuberculosis*

DOI: 10.31857/S0026898421010122

ВВЕДЕНИЕ

Одно из важнейших достижений медицины XX века – широкое использование противовирусных и протибактериальных средств, позволило значительно облегчить протекание инфекционных заболеваний и существенно снизить смертность. Однако в настоящее время большая часть патогенных бактерий и вирусов выработала резистентность к используемым в клинике лекарственным препаратам [1], в частности, появились

новые штаммы возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) и широкой лекарственной устойчивостью (XDR) [2].

Нуклеотиды и нуклеозиды – это не только основные структурные единицы ДНК и РНК, они также принимают участие в различных биохимических реакциях. В связи с этим даже небольшие модификации нуклеинового основания или углеводного фрагмента нуклеозида могут оказывать существенное влияние на узнавание и ингибиро-

вание соответствующих ферментов и/или рецепторов, и, как следствие, на его активность как антипатогена. На сегодняшний день аналоги и производные нуклеозидов используются в качестве противоопухолевых, противовирусных и, в значительно меньшей степени, противогрибковых препаратов [3–8]. В то же время обнаружена антибактериальная активность нуклеозидов, что привело к активному развитию этой области [9–13]. Только в начале XXI века появились сообщения о нескольких группах модифицированных нуклеозидов, обладающих заметным антимикобактериальным действием *in vitro* [13–18]. В частности, 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды с протяженными 1-алкинильными, алкилоксиметильными и алкилтриазолилметильными заместителями обладают ингибирующей активностью *in vitro* в отношении ряда микобактерий (*M. tuberculosis*, *M. avium* и *M. bovis*) [19–27]. Несмотря на интенсивные исследования, биологические мишени и механизм действия соединений этой группы пока окончательно не выявлены. В работах бельгийских ученых показано, что 5'-монофосфаты 5-модифицированных 2'-дезоксисуридинов эффективно ингибируют флавин зависимую тимидилатсинтазу *ThuX M. tuberculosis* [КФ 2.1.1.148] (уникальный фермент микобактерий), практически не взаимодействуя с основным бактериальным ферментом *ThuA* (близким к эукариотическим тимидилатсинтазам) [28–31]. В связи с этим можно предположить, что одной из возможных мишеней 5-модифицированных 2'-дезоксисуридинов может быть этот фермент [28–31]. С другой стороны, нами показано, что неспособные к фосфорилированию 5'-иодо-, азидо- и аминопроизводные 5-додецилоксиметил-2'-дезоксисуридина [24] и 5-замещенные карбоциклические 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-5'-норуридины с протяженными 1-алкинильными [25], алкилоксиметильными и алкилтриазолилметильными [26, 27] заместителями обладают значительной ингибирующей активностью *in vitro* в отношении *M. tuberculosis*, связанной с разрушением клеточной стенки микобактерии [26, 27]. Таким образом, можно предположить несколько механизмов действия модифицированных уридинов в отношении *M. tuberculosis*.

Серьезную проблему при изучении биологических свойств модифицированных нуклеозидов, проявляющих противобактериальную и/или противовирусную активность, представляет их низкая растворимость в воде. Для решения этой задачи необходимо ввести в состав молекулы гидрофильные группировки, синтезируя так называемые депо-формы (“пролекарства”), с помощью которых можно модулировать фармакокинетику, фармакодинамику и токсичность препарата. Термин депо-форма означает биологически инертное или слабо активное соединение, содержащее исходное лекар-

ственное средство, которое подвергается трансформации *in vivo* вследствие химического или ферментативного расщепления. Такой подход, с одной стороны, позволяет эффективно доставлять молекулу в клетки, а с другой, улучшать фармакокинетические характеристики препарата за счет более медленного высвобождения активного компонента [32–39].

Недавно мы синтезировали ряд водорастворимых форм 5-модифицированных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов. Они оказались как минимум на два порядка лучше растворимыми по сравнению с исходными формами. Полученные соединения были активны против ряда грамположительных бактерий (МИС 20–95 мкг/мл), включая лекарственно-устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus* и *M. smegmatis*, обладали низкой цитотоксичностью в отношении клеточных линий человека ($CD_{50} \geq 100$ мкг/мл) [40, 41].

Настоящая работа посвящена изучению химической и ферментативной стабильности синтезированных соединений с целью определения возможного механизма их действия для подтверждения нашей гипотезы о том, что они являются депо-формами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемые соединения синтезированы согласно разработанным нами ранее методам [31, 40, 41].

Идентификацию продуктов гидролиза проводили методом хромато-масс-спектрометрии. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе Bruker Daltonics micrOTOF-Q II методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных ионах в соответствии с применяемыми ранее условиями [42].

Количественный анализ смеси продуктов гидролиза проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Kieselgel 60 F254 (“Merck”, Германия) в системах хлороформ–этанол 9 : 1 (система А), диоксан–аммиак (25% водн.) 4 : 1 (система Б) или диоксан–аммиак (25% водн.)–вода 6 : 1 : 4 (система В). Анализ ТСХ проводили на приборе ChemiDoc Imaging System (“Bio-Rad”, США). Результаты обрабатывали с помощью программы Image Lab Software 6.1 (“Bio-Rad”). Средние значения и стандартные отклонения, приведенные на диаграммах, получали исходя из трех независимых экспериментов. Экспериментальные данные, полученные в программе Image Lab, анализировали с применением программного обеспечения Excel.

Растворимость соединений определяли путем перемешивания на магнитной мешалке 20 мг соединения в 3 мл воды в течение 24 ч. Осадок отделяли центрифугированием (10 мин, 14000 об./мин).

Концентрацию вещества определяли, измеряя УФ-поглощение полученного раствора.

Химический гидролиз соединений и гидролиз соединений в сыворотке крови человека проводили в соответствии с разработанными ранее условиями [43].

Ферментативный гидролиз соединений проводили карбоксилэстеразой из свиной печени [КФ 3.1.1.1] (“Sigma-Aldrich”, лиофилизат, ≥ 15 ед./мг).

Химический гидролиз соединений. К 100 мкл раствора нуклеозида (40 мМ) в ДМСО добавляли 1.9 мл растворов, содержащих 0.2 М глицин + 0.2 М HCl-буфер (pH 2.2), или 0.1 М калий-фосфатный буфер (pH 7.5), или 0.2 М глицин + 0.2 М NaOH-буфер (pH 9.0), и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Аликвоты (0, 0.5, 2, 4, 8, 12, 16, 24 ч) анализировали с помощью ТСХ (в системе А).

Гидролиз соединений в сыворотке крови человека. В сыворотку крови человека (100%, 196 мкл) добавляли 4 мкл раствора изучаемых соединений (20 мМ) в ДМСО. Смесь инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Аликвоты (15 мкл) отбирали через определенные промежутки времени, добавляли этанол (60 мкл), смесь выдерживали в течение 20 мин при -20°C и центрифугировали (10 мин, 14000 об./мин). Отбирали супернатант и выпаривали его до получения сухого остатка. Полученные остатки растворяли в этаноле (10 мкл) и анализировали методами хромато-масс-спектрометрии и ТСХ в системах А для производных нуклеозидов, Б и В для производных нуклеотидов.

Ферментативный гидролиз соединений. Карбоксилэстеразу (5 ед.) растворяли в 28 мкл буферной смеси №1 (25 мМ Трис-HCl, 50 мМ KCl, pH 8.0). Затем к полученному раствору добавляли 5 мкл раствора изучаемых соединений (20 мМ) в этаноле, 40 мкл буферной смеси № 2 (50 мМ Трис-HCl, 6 мМ CaCl₂, 350 мМ NaCl, pH 7.6) и 127 мкл H₂O. Полученную реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Аликвоты (15 мкл) отбирали через определенные промежутки времени, добавляли этанол (60 мкл), смесь выдерживали в течение 20 мин при -20°C и центрифугировали (10 мин, 14000 об./мин). Отбирали супернатант и выпаривали его до получения сухого остатка. Полученные остатки растворяли в этаноле (10 мкл) и анализировали методами хромато-масс-спектрометрии или ТСХ в системе А.

Гидролиз соединений 1c и 5c при инкубировании с *Staphylococcus aureus* FDA 209P. Соединения 1c и 5c (3.3 мг) растворяли в смеси MeOH : H₂O 1 : 1 (5 мл) и 180 мкл смеси добавляли к 2820 мкл модифицированной питательной среды № 2 Гаузе, инфицированной *S. aureus* FDA 209P (10⁶ клеток/мл). Пробы инкубировали при 37°C, отбирая аликвоты (300 мкл) в 0, 1, 2, 4 и 8 ч, после чего выдерживали во льду в течение 5 мин и отделяли супернатант центрифугированием (13000 об./мин, 5 мин,

Erpendorf). К отобранному супернатанту (300 мкл) добавляли 1 мл этанола и выдерживали в течение 20 мин при -20°C . Далее полученную суспензию центрифугировали в тех же условиях, отбирали супернатанты и выпаривали их до получения сухого остатка, который растворяли в этаноле (20 мкл) и анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрии или ТСХ. К осадкам, содержащим бактериальные клетки, добавляли по 100 мкл водного раствора лизоцима с концентрацией 10 мкг/мкл, встряхивали на вортексе в течение 1 мин и помещали в термостат с температурой 37°C на 30 мин. Полное разрушение клеток стафилококка было подтверждено после завершения инкубирования путем микроскопирования. В пробирки вносили по 800 мкл этанола, выдерживали в течение 20 мин при -20°C , отделяли супернатант центрифугированием в описанном режиме и анализировали по приведенной выше методике.

Компьютерное моделирование связывания 5'-О- и 3'-О-(триэтиленгликоль)карбонил-5-додецилосиметил-2'-дезоксинуридина (5c и 1c) и dUMP с белком (ThyX). Связывание 5c и 1c с белком ThyX изучали на его структуре, полученной с разрешением 2.01 Å (идентификатор PDB – 2AF6 [44]). В качестве исходной брали геометрию комплекса ThyX с 5'-монофосфатом 5-додецилосиметил-2'-дезоксинуридина, полученную в [31]. На основе этой же работы применили процедуру пошагового наращивания звеньев фрагмента каждого соединения – 5c или 1c. В результате получили структуры комплексов 5c и 1c с активным центром ThyX и определили их энергии. Далее определили структуры и энергии этих комплексов, когда 5c и 1c удалены более чем на 15 Å от ThyX. Разность этих энергий и энергий 5c и 1c в активном центре ThyX интерпретировали как искомые энергии связывания.

Использование системы параметров MMFF94x [45] и критериев окончания расчетов в программе Molecular Operating Environment (МОЕ) версии 2009.10 [46] подробно описаны в [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отнесение противобактериальных модифицированных нуклеозидов к депо-формам требует, прежде всего, изучения их химической и ферментативной стабильности. С этой целью мы выбрали ряд модифицированных 2'-дезоксинуклеозидов, содержащих различные заместители как в пиримидиновом основании, так и в углеводном фрагменте молекулы (рис. 1).

Были исследованы 3'-О- и 5'-О-карбонилтри- и тетраэтиленгликолевые производные 5-алкилосиметил-2'-дезоксинуридина (3': 1a–c, 2c и 5': 5a–c, 6c), 3'-О- и 5'-О-карбонилтри- и тетраэтиленгликолевые производные 5-(4-алкилтриазол-

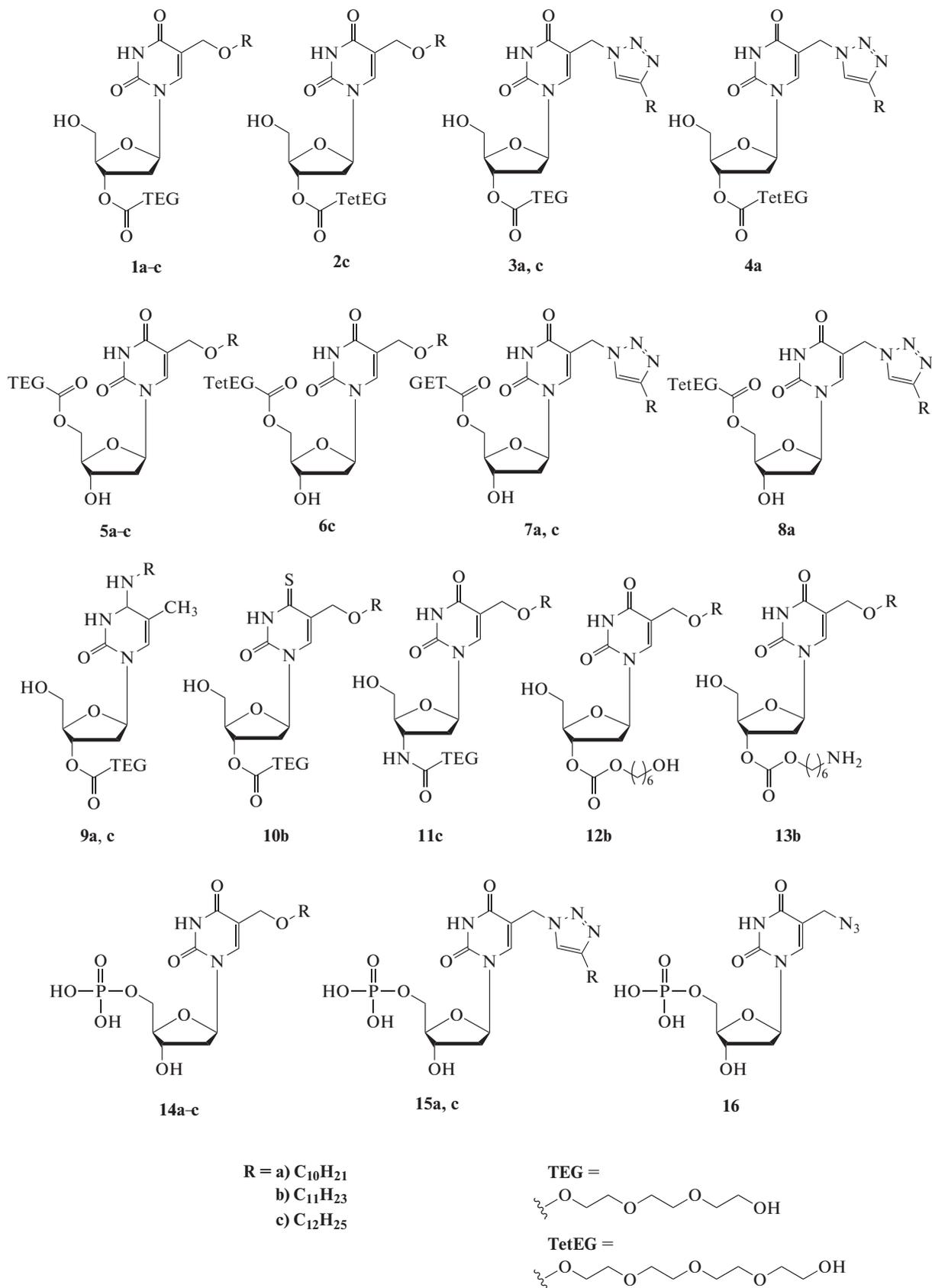


Рис. 1. Исследованные соединения.

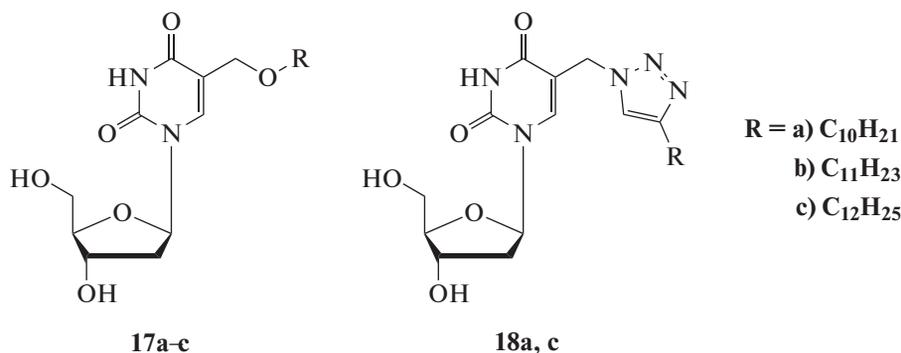


Рис. 2. Исходные 5-модифицированные производные 2'-деоксиуридина.

1-ил)метил-2'-деоксиуридина (3': **3a-c** и **4a** и 5': **7a, c**, **8a**), 3'-O-карбонилтриэтиленгликолевые производные N⁴-алкил-2'-деокси-5-метилцитидина (**9a, c**), 3'-O-(триэтиленгликоль)карбонил-4-тио-5-ундецилоксиметил-2'-деоксиуридин (**10b**), 3'-(триэтиленгликоль)карбониламино-5-додецилоксиметил-2',3'-дидезоксиуридин (**11c**), 3'-O-(6-гидроксигексилоксикарбонил)-5-ундецилоксиметил-2'-деоксиуридин (**12b**), 3'-O-(6-аминогексилоксикарбонил)-5-ундецилоксиметил-2'-деоксиуридин (**13b**) и также 5'-монофосфаты 5-алкилоксиметил-2'-деоксиуридина (**14a-c**) и 5-(4-алкилтриазол-1-ил)метил-2'-деоксиуридина (**15a, c**).

При изучении стабильности гликолевых производных модифицированных нуклеозидов в качестве контролей использовали 3',5'-диацетат тимидина и 5'-монофосфат тимидина, а при исследовании стабильности 5'-монофосфатов модифицированных нуклеозидов применяли 5'-

монофосфаты тимидина и 5-азидометил-2'-деоксиуридина (**16**).

Как сказано во введении, растворимость депозитов изученных модифицированных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов (рис. 2) в воде была лучше, чем у исходных соединений.

В табл. 1 в качестве примера приведены растворимости в воде исходных 5-модифицированных производных 2'-деоксиуридина и их 5'-триэтиленгликолевых производных.

Химическая и ферментативная стабильность

Стабильность соединений в буферных растворах и в сыворотке крови человека оценивали, используя метод [43]. Все изученные производные нуклеозидов были устойчивы в буферных растворах при двух значениях pH: 2.2 и 7.5 – и незначительно гидролизировались при pH 9.0. Это указывает на химическую стабильность исследованных

Таблица 1. Значения растворимости в воде некоторых гликолевых производных 5-модифицированных 2'-деоксиуридинов

№	Заместитель при нуклеиновом основании	Заместитель при углеводном фрагменте	Растворимость, мг/мл	№	Заместитель при нуклеиновом основании	Заместитель при углеводном фрагменте	Растворимость, мг/мл
17a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	—	0.028	18a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	—	0.01
17b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	—	0.017	18c	5-CH ₂ -TriC ₁₂ H ₂₅	—	0.005
17c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	—	0.009	3a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁ ***	3'-O-C(O)TEG	1.25
1a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	3'-O-C(O)TEG*	4.46	3c	5-CH ₂ -TriC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TEG	0.78
1b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	3'-O-C(O)TEG	3.61	7a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	5'-O-C(O)TEG	2.82
1c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TEG	1.3	7c	5-CH ₂ -TriC ₁₂ H ₂₅	5'-O-C(O)TEG	1.18
5a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	5'-O-C(O)TEG	5.5	4a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	3'-O-C(O)TetEG	2.14
5b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	5'-O-C(O)TEG	2.26	8a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	5'-O-C(O)TetEG	4.36
5c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	5'-O-C(O)TEG	0.85				

* TEG – триэтиленгликоль.

** TetEG – тетраэтиленгликоль.

*** Tri – 1,2,3-триазолил-.

соединений, и их гидролиз в сыворотке крови был практически полностью ферментативным.

Оптимальное время полугидролиза депо-форм составляет 5–12 ч, согласно [47]. Практически все полученные гликолевые производные, за исключением 3'-*O*-карбонилтриэтиленгликолевых производных N⁴-алкил-2'-дезоксидезокси-5-метилцитидина (**9a**, **c**) и 3'-*O*-(триэтиленгликоль)карбониламино-5-додецилоксиметил-2',3'-дидезоксиуридина (**11c**), имели оптимальное время полугидролиза 2–12 ч (табл. 2) и расщеплялись только до исходных 5-модифицированных нуклеозидов. Наличие более протяженного алкильного или гликолевого заместителя обычно увеличивало время гидролиза.

На рис. 3 в качестве примера представлена диаграмма гидролиза 3'-*O*-(триэтиленгликоль)карбонил-5-додецилоксиметил-2'-дезоксидезоксиуридина **1c** в сыворотке крови человека, из которой следует, что время полугидролиза ($t_{1/2}$) **1c** с образованием "родительского" 5-додецилоксиметил-2'-дезоксидезоксиуридина **17c** (Схема 1) составляет 4 ± 0.5 ч.

Время полугидролиза соединений **1c** и **5c** карбоксилэстеразой составило 60 ± 10 мин (рис. 4).

Гидролиз соединений 1c и 5c при инкубации с S. aureus 209P

Изучение продуктов метаболизма **1c** и **5c** показало, что родительский нуклеозид 5-додецилоксиметил-2'-дезоксидезоксиуридин **17c** образуется при инкубации соединений **1c** и **5c** (в концентрациях, соответствующих 1/2 МПК) в инкубационной среде, содержащей *S. aureus* FDA 209P. Обнаружено, что после инкубации в течение 8 ч конверсия **1c** и **5c** в родительский нуклеозид **17c** составляет около 30% как внутри бактерий, так и в инкубационной среде.

Компьютерное моделирование соединений 1c и 5c с активным центром ThyX

Как сказано выше, данные об эффективном ингибировании микобактериальной флавинозависимой тимидилатсинтазы ThyX 5'-монофосфатами 5-модифицированных 2'-дезоксидезоксиуридинов

Таблица 2. Значения времени полугидролиза соединений в сыворотке крови человека

№	Заместитель при нуклеиновом основании	Заместитель при углеводном фрагменте	$t_{1/2}$ (ч \pm 0.5)	№	Заместитель при нуклеиновом основании	Заместитель при углеводном фрагменте	$t_{1/2}$ (ч \pm 0.5)
1a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	3'-O-C(O)TEG*	2	8a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	5'-O-C(O)TetEG	12
1b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	3'-O-C(O)TEG	3	9a	4-NHC ₁₀ H ₂₁	3'-O-C(O)TEG	>24
1c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TEG	4	9c	4-NHC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TEG	>24
5a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	5'-O-C(O)TEG	3	10b	4-S 5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	3'-O-C(O)TEG	6
5b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	5'-O-C(O)TEG	3	11c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	3'-NH-C(O)TEG	>24
5c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	5'-O-C(O)TEG	5	12b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	3'-O-C(O)OC ₆ H ₁₂ OH	14
2c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TetEG**	7	13b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	3'-O-C(O)OC ₆ H ₁₂ NH ₂	16
6c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	5'-O-C(O)TetEG	8	14a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	5'-O-P(O)(OH) ₂	>12
3a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁ ***	3'-O-C(O)TEG	6	14b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	5'-O-P(O)(OH) ₂	>12
3c	5-CH ₂ -TriC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TEG	8	14c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	5'-O-PO(OH) ₂	>12
7a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	5'-O-C(O)TEG	7	15a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	5'-O-P(O)(OH) ₂	9
7c	5-CH ₂ -TriC ₁₂ H ₂₅	5'-O-C(O)TEG	5	15c	5-CH ₂ -TriC ₁₂ H ₂₅	5'-O-P(O)(OH) ₂	11
4a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	3'-O-C(O)TetEG	10	16	5-CH ₂ N ₃	5'-O-P(O)(OH) ₂	1.5
TMP	—	5'-O-P(O)(OH) ₂	40 \pm \pm 10 мин.	Ac₂T	—	3'-OAc 5'-OAc	3

* TEG – триэтиленгликоль.
 ** TetEG – тетраэтиленгликоль.
 *** Tri – 1,2,3-триазолил-.

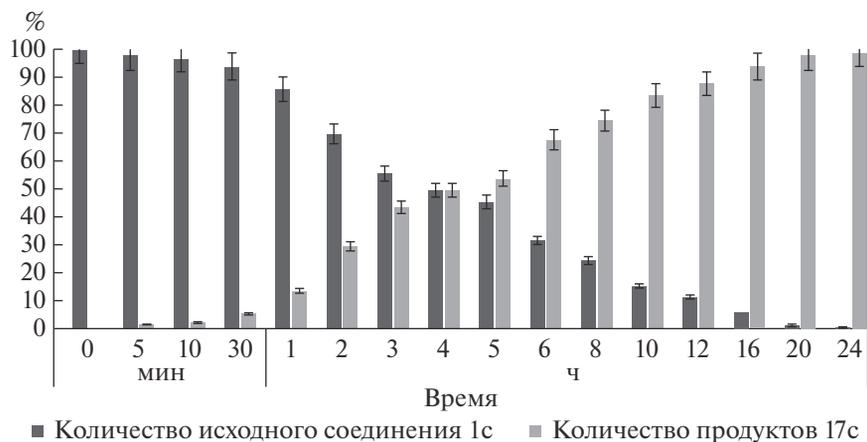


Рис. 3. Гидролиз соединения **1с** в сыворотке крови человека. По оси X отложено время отбора проб, по оси Y – количество вещества в процентах. Гидролиз проводили в условиях, приведенных в Экспериментальной части (см. Гидролиз соединений в сыворотке крови человека).

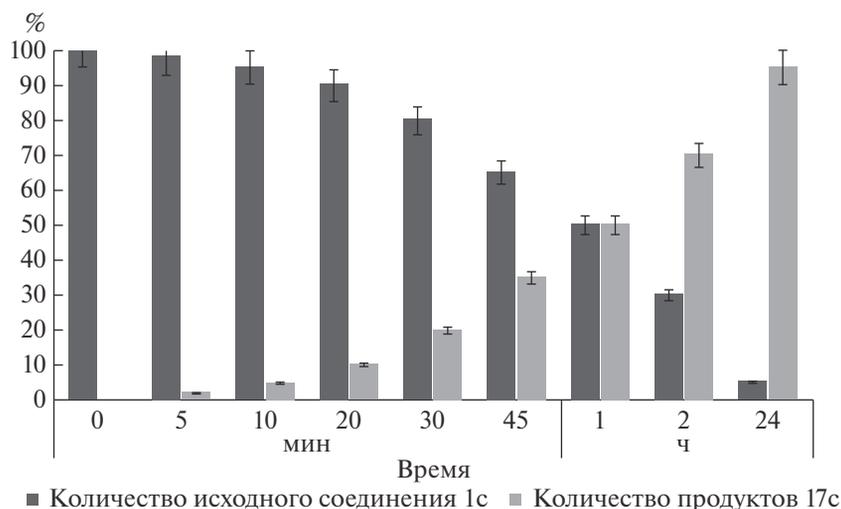


Рис. 4. Ферментативный гидролиз соединения **1с** карбоксилэстеразой. По оси X отложено время отбора проб, по оси Y – количество вещества в процентах. Гидролиз проводили в условиях, приведенных в Экспериментальной части (см. Ферментативный гидролиз соединений).

[28–31] позволяют рассматривать данный фермент в качестве одной из мишеней ингибирующего действия 5-модифицированных 2'-дезоксиринидинов. С целью выявления возможности связывания полученных нами водорастворимых производных с ThyX проведен молекулярный докинг 5'-O- и 3'-O-(триэтиленгликоль)карбонил-5-додецилоксиметил-2'-дезоксиринидина (**5с** и **1с**, в качестве примера) с активным центром фер-

мента и сравнение полученных энергий связывания ThyX с соединениями **5с**, **1с** и субстратом фермента – монофосфатом 2'-дезоксиринидина (dUMP). Результаты расчетов приведены в табл. 3, а геометрия полученных комплексов – на рис. 5.

Максимальные значения энергии связывания исследуемых аналогов с ThyX 77.1 и 50.1 ккал/моль, соответственно, что хуже энергии связывания с субстратом. Это свидетельствует о том, что дан-

Таблица 3. Энергия связывания соединений с активным центром флавинзависимой тимидилатсинтазы *M. tuberculosis* (белка ThyX)

Соединение	Субстрат dUMP [31]	Аналог 5с	Аналог 1с
Энергия связывания, ккал/моль	–189.4	–50.1	–77.1

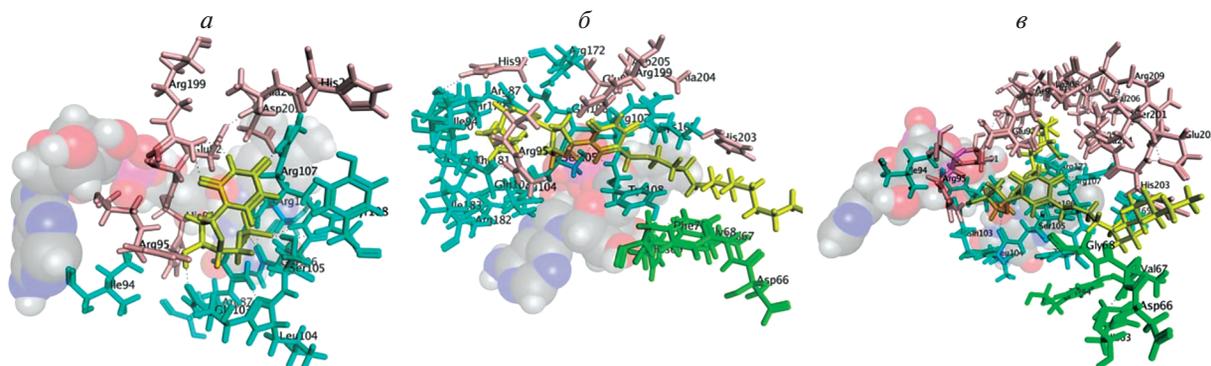


Рис. 5. Расположение субстрата и его аналогов в активном центре ThyX. *a* – ThyX с субстратом, *б* – ThyX с аналогом **1c**, *в* – ThyX с аналогом **5c**. Желтым цветом показаны субстрат и, соответственно, его аналоги **1c** и **5c**, кремовым – цепь A ThyX, зеленым – цепь B ThyX, бирюзовым – цепь C ThyX. FAD располагается на переднем плане каждого рисунка и поэтому изображен полупрозрачным.

ные аналоги, скорее всего, не являются ингибиторами ThyX.

Попытки оптимизации геометрии веществ в активном центре для увеличения энергии связывания исследуемых аналогов с ThyX не привели к существенному изменению энергии.

Сравнение положений субстрата, аналога **1c** и аналога **5c** относительно FAD и цепей A, B, C белка ThyX позволяет сделать следующие заключения. Как показано ранее, наличие длинного алифатического заместителя по положению 5 урацила обеспечивает дополнительный контакт этого заместителя с цепью B и не меняет расположение дезоксиуридинового фрагмента относительно FAD. Это обеспечивает успешное ингибирование ThyX 5'-монофосфатами 5-модифицированных пиримидиновых нуклеозидов с протяженными 1-алкинильными, алкилоксиметильными и алкилтриазиолилметильными заместителями, отмечаемое в [28–31].

Появление объемного заместителя по положению 3'-дезоксиуридина приводит к существенному смещению всего аналога относительно FAD. Одновременно ослабляется контакт с цепью A и существенно возрастает контакт с цепью C.

Наконец, такой же заместитель в положении 5'-дезоксиуридина оставляет контакт FAD с урацильным остатком близким к контакту FAD с субстратом, но, одновременно, усиливает контакт аналога с цепью A.

Из этого можно заключить, что контакт 5'-заместителя с цепью A оказывается энергетически невыгодным и, несмотря на остальные относительно удачные контакты, приводит к практически нулевому связыванию аналога **5c** в активном центре ThyX.

Взаимодействие 3'-заместителя с цепью C не является столь же невыгодным, как взаимодействие с цепью A, но сопровождающие его измене-

ния в расположении аналога **1c** относительно активного центра фермента (и FAD) все же приводят к уменьшению энергии связывания ThyX и **1c** настолько, что он является плохим ингибитором этого фермента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кризис антибиотикотерапии, обусловленный резистентностью патогенов к одобренным антибактериальным препаратам, привел к необходимости создания принципиально новых малотоксичных веществ – эффективных ингибиторов лекарственно-устойчивых штаммов патогенов. Очевидно, что для получения лекарственных форм таких соединений желательно, чтобы они были растворимы в воде. Дизайн депо-форм представляет собой широко используемую стратегию молекулярной модификации, которая направлена на оптимизацию физико-химических и фармакологических свойств лекарств, для улучшения их растворимости и фармакокинетических свойств и, зачастую, снижения их токсичности [33, 37]. Как указывалось выше, предложен ряд способов получения депо-форм соединений [32, 35–43, 48, 49]. В качестве пероральных пролекарств хорошо зарекомендовали себя аминокислотные (в первую очередь валиновые) эфиры нуклеозидов [50–52].

Другой подход к повышению растворимости биологически активных нуклеозидов – синтез их 5'-фосфатных или 5'-фосфонатных производных, которые под действием клеточных ферментов гидролизуются с постепенным образованием активного нуклеозидного ингибитора. В качестве примера можно привести 5'-фосфонатные гомо- и гетеродимеры нуклеозидов с противовирусной и противобактериальной активностью [41, 53] или применяемый в терапии онкологических заболеваний 5'-фосфат 2-фторараденозина (флу-

дарабин) [54], а также созданные в нашей лаборатории 5'-Н-фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (никавир), используемый в России для лечения инфицированных вирусом иммунодефицита человека [55], и 5'-Н-фосфонат 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина [49].

Мы воспользовались этими подходами для синтеза растворимых производных полученных нами ранее нуклеозидов, проявляющих противобактериальную активность.

Известно, что оптимальное время полугидролиза депо-форм в сыворотке крови человека составляет от 3 до 12 ч [47]. Синтезированные нами 5'-монофосфаты 5-алкилоксиметил-2'-дезоксинуридина (**14a-c**) оказались довольно устойчивыми к ферментативному гидролизу (время полугидролиза в сыворотке крови человека >12 ч), в то время как 5'-монофосфаты 5-(4-алкилтриазол-1-ил)метил-2'-дезоксинуридина (**15a,c**) имели оптимальное время полугидролиза ($t_{1/2}$: 3–11 ч). Для сравнения: $t_{1/2}$ 5'-монофосфатов тимидина и 5-азидометил-2'-дезоксинуридина (**16**) в этих условиях составляет 40 и 90 мин соответственно. Однако применение 5'-монофосфатов в большинстве случаев ограничено неспособностью заряженных соединений проникать через клеточную стенку бактерий [23, 56].

Более перспективным нам представляется применение в качестве депо-форм 3'-*O*- и 5'-*O*-карбонилтри- и тетраэтиленгликолевых производных нуклеозидов. Как сказано во введении и показано в нашей работе (табл. 1), растворимость депо-форм изученных модифицированных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов оказалась, как минимум, на два порядка лучше чем у исходных

форм (для примера, 8.5 мг/мл у 3'-триэтиленгликолевого производного **5c** и 13 мг/мл у 5'-производного по сравнению с 0.09 мг/мл у исходного 5-додецилоксиметил-2'-дезоксинуридина **17c**, табл. 1) При этом растворимость 3'- и 5'-производных различалась незначительно, а замена триэтиленгликолевого фрагмента на тетраэтиленгликолевый приводила к двукратному улучшению растворимости, например, 2.14 у триэтиленгликолевого производного **4a** и 4.36 у тетраэтиленгликолевого производного **8a**.

Практически все полученные соединения, за исключением *N*⁴-алкил-5-метил-2'-дезоксинуридинов (**9a, c**) и 3'-(триэтиленгликоль)карбониламино-5-додецилоксиметил-2',3'-дидезоксинуридина (**11c**), имели время полугидролиза 2–12 ч (табл. 2) и расщеплялись только до исходных нуклеозидов, что соответствует поставленной нами цели. Стоит отметить, что соединения оказались стабильными в буферных растворах с незначительным гидролизом при pH 9.0 и эффективно гидролизывались карбоксилэстеразой (рис. 4), что указывает на ферментативную природу гидролиза в сыворотке крови.

Эти наблюдения также подтверждают, что карбонатные и карбаматные группы в депо-формах соединений отличаются по прочности связи. Оксикарбонильная связь в них не равноценна связи в природных сложных эфирах, однако ее гидролиз в сыворотке крови, вероятно, также осуществляется карбоксилэстеразами в соответствии со схемой 1, но лишь в случае карбонатов, что объясняет сильно различающиеся времена полугидролиза соединений **11c** и **1c** в сыворотке крови человека.

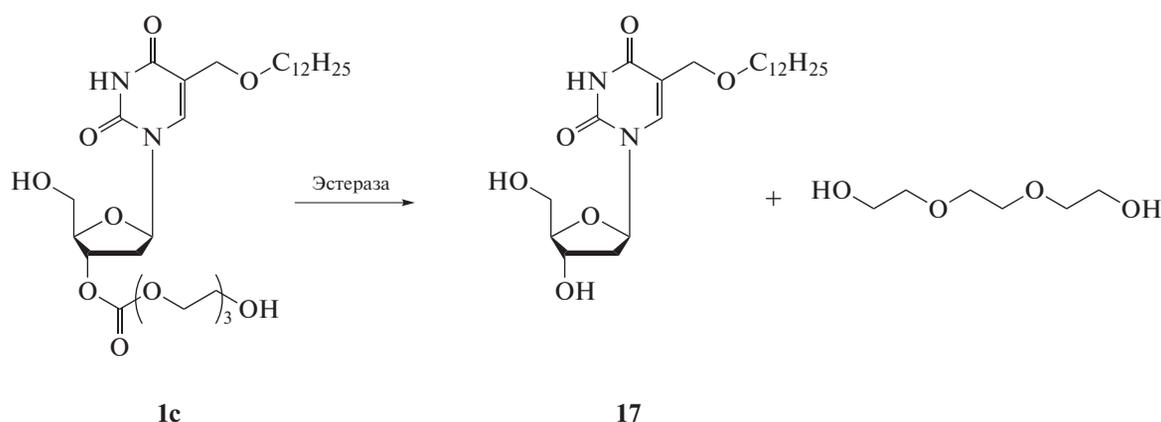


Схема 1. Предполагаемый механизм гидролиза водорастворимых форм нуклеозидов (на примере **1c**).

Из табл. 2 следует, что карбонилтри- и тетраэтиленгликолевые производные различаются по скорости гидролиза в сыворотке крови (тетраэтиленгли-

колевые производные гидролизуются медленнее). С другой стороны, замена гликолевого фрагмента на гидроксигексильный или аминогексильный

приводила к значительному увеличению времени гидролиза соединений **12b** и **13b** ($t_{1/2} = 14$ и 16 ч соответственно).

На устойчивость соединений к гидролизу влияет также модификация нуклеинового основания, например, замена атома кислорода в 4-м положении в соединении **1b** на атом серы **10b** приводила к двукратному увеличению времени гидролиза ($t_{1/2} = 3$ и 6 ч соответственно). Наблюдается также зависимость стабильности гликолевых производных от размера заместителя в позиции 5 основания. Как правило, соединения с более протяженными углеводородными заместителями имеют большее время гидролиза. С другой стороны, нахождение гликолевых заместителей в 3'- или 5'-положении углеводного фрагмента не влияет существенно на устойчивость гликолевых производных.

Среди всех исследованных соединений, три- и тетраэтиленгликолевые производные 5-додецилоксиметил-2'-дезоксинуридина **1c**, **2c**, **5c** и **6c** представляются наиболее перспективными для использования в качестве депо-форм, поскольку обладают как оптимальным временем полугидролиза (4–8 ч), так и заметно увеличенной растворимостью в воде (8.5–13 мг/мл по сравнению с 0.09 мг/мл у исходного соединения).

Результаты теоретических расчетов связывания 5'-*O*- и 3'-*O*-(триэтиленгликоль)карбонил-5-додецилоксиметил-2'-дезоксинуридина (**5c** и **1c**) с флавинозависимой тимидилатсинтазой *M. tuberculosis* (белком ThyX) в сравнении с природным субстратом dUMP позволяют предположить, что эти аналоги **5c** и **1c** не являются ингибиторами ThyX, поскольку значение энергии связывания с исследуемыми аналогами значительно хуже энергии связывания с субстратом. Можно предположить, что проникшие в клетку соединения должны подвергаться расщеплению эстеразами, а уже затем связываться с предполагаемой мишенью ThyX, как это, собственно, и следует из самой концепции депо-формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные (результаты ферментативного гидролиза и теоретические расчеты) позволяют со значительной долей уверенности утверждать, что синтезированные нами хорошо растворимые в водно-органических средах карбонилтри- и тетраэтиленгликолевые производные и 5'-монофосфаты модифицированных нуклеозидов являются депо-формами нуклеозидов, обладающих противобактериальной активностью. Показана перспективность создания подобных производных нуклеозидов для получения эффективных ингибиторов роста микроорганизмов.

Авторы благодарны М.К. Кухановой (ИМБ РАН) за ценные советы и помощь в работе.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-04-01085, 20-04-00094, 20-34-90056, 17-00-00393 и 18-29-08010) и Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (№ 01201363818).

В настоящей работе не использовали людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ventola C.L. (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P&T*. **40**, 277–283.
2. Brown E.D., Wright G.D. (2016) Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. **529**, 336–343.
3. Jordheim L.P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C. (2013) Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **12**, 447–464.
4. Matsuda A., Sasaki T. (2004) Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Cancer Sci.* **95**, 105–111.
5. De Clercq E. (2012) Human viral diseases: what is next for antiviral drug discovery? *Curr. Opin. Virol.* **2**, 572–579.
6. De Clercq E., Li G. (2016) Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 695–747.
7. Winn M., Goss R.J.M., Kimura K., Timothy D.H., Bugg T.D.H. (2010) Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 279–304.
8. Yssel A.E.J., Vanderleyden J., Steenackers H.P. (2017) Repurposing of nucleoside- and nucleobase-derivative drugs as antibiotics and biofilm inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2156–2170.
9. Cui Z., Wang X., Koppermann S., Thorson J.S., Ducho C., Van Lanen S.J. (2018) Antibacterial muraymycins from mutant strains of *Streptomyces* sp. NRRL 30471. *J. Nat. Prod.* **81**, 942–948.
10. Abbas M., Elshahavi S.I., Wang X., Ponomareva L.V., Sajid I., Shaaban K.A., Thorson J.S. (2018) Puromycins B-E, naturally occurring amino-nucleosides produced by the Himalayan isolate *Streptomyces* sp. PU-14G. *J. Nat. Prod.* **81**, 2560–2566.
11. Seydlova G., Pohl R., Zbornikova E., Ehn M., Simak O., Panova N., Kolar M., Bogdanova K., Vecerova R., Fiser R., Sanderova H., Vitovska D., Sudzinova P., Pospisil J., Benada O., Krizek T., Sedlak D., Bartunek P., Krasny L., Rejman D. (2017) Lipophosphonoxins II: design, synthesis, and properties of novel broad spectrum antibacterial agents. *J. Med. Chem.* **60**, 6098–6118.
12. Bockman M.R., Engelhart C.A., Dawadi S., Larson P., Tiwari D., Ferguson D.M., Schnappinger D., Aldrich C.C. (2018) Avoiding antibiotic inactivation in *Mycobacterium tuberculosis* by Rv3406 through strategic nucleoside modification. *ACS Infect. Dis.* **4**, 1102–1113.
13. Serpi M., Ferrari V., Pertusati F. (2016) Nucleoside derived antibiotics to fight microbial drug resistance: new

- utilities for an established class of drugs? *J. Med. Chem.* **59**, 10343–10382.
14. Van Calenbergh S., Pochet S., Munier-Lehmann H. (2012) Drug design and identification of potent leads against *Mycobacterium tuberculosis* thymidine monophosphate kinase. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 694–705.
 15. Duckworth B.P., Nelson K.M., Aldrich C.C. (2012) Adenylating enzymes in *Mycobacterium tuberculosis* as drug targets. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 766–796.
 16. Duckworth B.P., Wilson D.J., Nelson K.M., Boshoff H.I., Barry C.E. 3rd, Aldrich C.C. (2012) Development of a selective activity-based probe for adenylating enzymes: profiling MbtA involved in siderophore biosynthesis from *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1653–1658.
 17. Шмаленюк Э.Р., Кочетков С.Н., Александрова Л.А. (2013) Новые ингибиторы роста *M. tuberculosis* на основе модифицированных пиримидиновых нуклеозидов и их аналогов. *Успехи химии.* **82**, 896–915.
 18. Ferrari V., Serpi M. (2015) Nucleoside analogs and tuberculosis: new weapons against an old enemy. *Future Med. Chem.* **7**, 291–314.
 19. Rai D., Johar M., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D.Y., Kumar R. (2005) Design and studies of novel 5-substituted alkynylpyrimidine nucleosides as potent inhibitors of mycobacteria. *J. Med. Chem.* **48**, 7012–7017.
 20. Johar M., Manning T., Tse C., Desroches N., Kunimoto D.Y., Agrawal B., Kumar R. (2007) Growth inhibition of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium in vitro*: effect of 1-beta-D-2'-arabinofuranosyl and 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-2'-ribofuranosyl) pyrimidine nucleoside analogs. *J. Med. Chem.* **50**, 3696–3705.
 21. Srivastav N.C., Manning T., Kunimoto D.Y., Kumar R. (2007) Studies on acyclic pyrimidines as inhibitors of mycobacteria. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 2045–2053.
 22. Srivastav N.C., Manning T., Kunimoto D.Y., Kumar R. (2006) *In vitro* anti-mycobacterial activities of various 2'-deoxyuridine, 2'-arabinouridine and 2'-arabinofluoro-2'-deoxyuridine analogues: synthesis and biological studies. *Med. Chem.* **2**, 287–293.
 23. Александрова Л.А., Шмаленюк Э.Р., Кочетков С.Н., Ерохин В.В., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н. (2010) Новые 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды – ингибиторы роста микобактерий. *Acta Naturae.* **1**, 115–118.
 24. Shmalenyuk E.R., Chernousova L.N., Karpenko I.L., Kochetkov S.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Efremenkova O.V., Alexandrova L.A. (2013) Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and MDR MS-115 by a new set of C5 modified pyrimidine nucleosides. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 4874–4884.
 25. Matyugina E., Khandazhinskaya A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Chizhov A., Karpenko I., Kochetkov S., Alexandrova L. (2012) The synthesis and antituberculosis activity of 5'-nor carbocyclic uracil derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 6680–6686.
 26. Khandazhinskaya A.L., Alexandrova L.A., Matyugina E.S., Solyev P.N., Efremenkova O.V., Buckheit K.W., Wilkinson M., Buckheit Jr. R.W., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L. (2018) Novel 5'-norcarbocyclic pyrimidine derivatives as antibacterial agents. *Molecules.* **23**, pii: E3069.
 27. Khandazhinskaya A.L., Matyugina E.S., Alexandrova L.A., Kezin V.A., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Popenko V.I., Leonova O.G., Kochetkov S.N. (2020) Interaction of 5-substituted pyrimidine nucleoside analogues and *M. tuberculosis*: a view through an electron microscope. *Biochimie.* **171–172**, 170–177.
 28. Kögler M., Vanderhoydonck B., De Jonghe S., Rozenski J., Van Belle K., Herman J., Louat T., Parchina A., Sibley C., Lescrinier E., Herdewijn P. (2011) Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of flavin-dependent thymidylate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **54**, 4847–4862.
 29. Kögler M., Busson R., De Jonghe S., Rozenski J., Van Belle K., Louat T., Munier-Lehmann H., Herdewijn P.S. (2012) Synthesis and evaluation of 6-aza-2'-deoxyuridine monophosphate analogs as inhibitors of thymidylate synthases, and as substrates or inhibitors of thymidine monophosphate kinase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biodiv.* **9**, 536–556.
 30. Parchina A., Froeyen M., Margamuljana L., Rozenski J., De Jonghe S., Briers Y., Lavigne R., Herdewijn P., Eveline Lescrinier E. (2013) Discovery of an acyclic nucleoside phosphonate that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* ThyX based on the binding mode of a 5-alkynyl substrate analogue. *ChemMedChem.* **8**, 1373–1383.
 31. Alexandrova L.A., Chekhov V.O., Shmalenyuk E.R., Kochetkov S.N., Abu El-Asrar R., Herdewijn P. (2015) Synthesis and evaluation of C-5 modified 2'-deoxyuridine monophosphates as inhibitors of *M. tuberculosis* thymidylate synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 7131–7137.
 32. Rautio J., Kumpulainen H., Heimbach T., Oliyari R., Oh D., Järvinen T., Savolainen J. (2008) Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 255–270.
 33. Huttunen K., Raunio H., Rautio J. (2011) Prodrugs – from serendipity to rational design. *Pharmacol. Rev.* **63**, 750–771.
 34. Stella V.J., Nti-Addae K.W. (2007) Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 677–694.
 35. Beaumont K., Webster R., Gardner I., Dack K. (2003) Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* **4**, 461–485.
 36. Testa B. (2009) Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 338–344.
 37. Jornada D.H., Dos Santos Fernandes G.F., Chiba D.E., De Melo T.R.F., Dos Santos J.L., Chung M.C. (2016) The prodrug approach: a successful tool for improving drug solubility. *Molecules.* **21**. <https://doi.org/10.3390/molecules21010042>
 38. Mori G., Chiarelli L.R., Riccardi G., Pasca M.R. (2017) New prodrugs against tuberculosis. *Drug Discov. Today.* **22**, 519–525.

39. Pochet S., Kansall V., Destouesse F., Sarfatil S.R. (1990) Alkylglycoside carbonates of 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Tetrahedron Lett.* **31**, 6021–6024.
40. Negrya S.D., Jasko M.V., Solyev P.N., Karpenko I.L., Efremenkova O.V., Vasilyeva B.F., Sumarukova I.G., Kochetkov S.N., Alexandrova L.A. (2020) Synthesis of water-soluble prodrugs of 5'-modified 2'-deoxyuridines and their antibacterial activity. *J. Antibiotics.* **73**, 236–246.
41. Alexandrova L. Zicari S., Matyugina E., Khandazhinskaya A., Smirnova T., Andreevskaya S., Chernousova L., Vanpouille C., Kochetkov S., Margolis L. (2017) Dual-targeted anti-TB/anti-HIV heterodimers. *Antiviral Res.* **145**, 175–183.
42. Александрова Л.А., Ефременкова О.В., Андреевская В.Л., Галегов Г.А., Сольев П.Н., Карпенко И.Л., Кочетков С.Н. (2016) 5-(4-алкил-1,2,3-триазол-1-ил)метильные производные 2'-дезоксисуридина – ингибиторы роста бактерий и вирусов. *Биоорганическая химия.* **42**, 746–754.
43. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Karpenko I.L., Zakirova N.F., Tarussova N.B., Kravetsky A.A. (2000) P-(alkyl)-nucleoside 5'-hydrogenphosphonates as depot forms of antiviral nucleotide analogues. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* **19**, 1795–1804.
44. Sampathkumar P., Turley S., Ulmer J.E., Rhie H.G., Sibley C.H., Hol W.G. (2005) Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* flavin dependent thymidylate synthase (MtbThyX) at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **352**, 1091–1104.
45. Halgren T.A. (1999) MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.* **20**, 720–729.
46. Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE) (2012). 10.
47. De Clercq E. (2001) Antiviral drugs: current state of the art. *J. Clin. Vir.* **22**, 73–89.
48. Solyev P.N., Shipitsin A.V., Karpenko I.L., Nosik D.N., Kalnina L.B., Kochetkov S.N., Kukhanova M.K., Jasko M.V. (2012) Synthesis and anti-HIV properties of new carbamate prodrugs of AZT. *Chem. Biol. Drug Des.* **80**, 947–952.
49. Khandazhinskaya A.L., Jasko M.V., Karpenko I.L., Solyev P.N., Golubeva N.A., Kukhanova M.K. (2011) 5'-Phosphonated derivatives of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine as new anti-HIV prodrugs. *Chem. Biol. Drug Des.* **78**, 50–56.
50. McGuigan C., Pathirana R.N., Migliore M., Adak R., Luoni G., Jones A.T., Díez-Torrubia A., Camarasa M.J., Velázquez S., Henson G., Verbeken E., Sienaert R., Naesens L., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J. (2007) Preclinical development of bicyclic nucleoside analogues as potent and selective inhibitors of varicella zoster virus. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 1316–1330.
51. McGuigan C., Balzarini J. (2009) FV100 as a new approach for the possible treatment of varicella-zoster virus infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 671–673.
52. Snoeck R., Andrei G., De Clercq E. (1994) Chemotherapy of varicella zoster virus infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **4**, 211–226.
53. Solyev P.N., Jasko M.V., Karpenko I.L., Sharkin Y.A., Shipitsyn A.V., Kukhanova M.K. (2014) New dinucleoside phosphonate derivatives as prodrugs of 3'-azido-3'-deoxythymidine and β -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine: synthesis and anti-HIV properties. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* **33**, 64–79.
54. Jain N., O'Brien S. (2015) Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood.* **126**, 463–470.
55. Хандажинская А.Л., Широкова Е.А. (2013) 5'-Фосфонаты AZT: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции. *Acta Naturae.* **5**, 57–65.
56. McGuigan C., Derudas M., Gonczy B., Hinsinger K., Kandil S., Pertusati F., Serpi M., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J., McHugh T.D., Maitra A., Akorli E., Evangelopoulos D., Bhakta S. (2014) ProTides of N-(3-(5-(2'-deoxyuridine))prop-2-ynyl)octanamide as potential anti-tubercular and anti-viral agents. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2816–2824.

GLYCOL AND PHOSPHATE DEPOT-FORMS OF 4- AND/OR 5-MODIFIED NUCLEOSIDES EXHIBITING ANTIBACTERIAL ACTIVITY

S. D. Negrya¹, M. V. Jasko¹, D. A. Makarov^{1,4}, P. N. Solyev¹, I. L. Karpenko¹, O. V. Shevchenko¹, O. V. Chekhov^{1,3}, A. A. Glukhova², B. F. Vasilyeva², T. A. Efimenko², I. G. Sumarukova², O. V. Efremenkova², S. N. Kochetkov¹, and L. A. Alexandrova^{1, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

³Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia

⁴Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Higher Chemical College of Russian Academy of Sciences, Moscow, 125047 Russia

*e-mail: ala2004_07@mail.ru

The emergence of resistance to most drugs used in infectious diseases treatment requires the creation of new compounds that are effective against drug-resistant strains of pathogens. Recently, we have synthesized several groups of modified nucleosides that showed significant antibacterial activity *in vitro*, however, their further studies were difficult to make due to the low solubility in water solutions. Thereby, we have synthesized compounds that are well soluble in water-organic solutions and appeared to be more effective inhibitors of

gram-positive bacteria and mycobacteria growth. We suggested that the water-soluble forms of modified nucleosides studied in this communication are their depot forms. To confirm this, we studied their ability to be hydrolyzed in various media and made molecular docking of the compounds into the active center of the proposed target protein ThyX. Computer modelling results showed that water-soluble analogs are presumably not ThyX inhibitors, which may confirm our assumption about the action of nucleoside derivatives as depot forms. The compounds were hydrolyzed both by porcine liver carboxyl esterase and in human serum, and upon incubation with *Staphylococcus aureus* 209P. The data obtained allow us to assert with considerable confidence that the studied compounds are depot forms of modified nucleosides.

Keywords: antibiotic resistance, antiviral and antibacterial activity, modified nucleosides and nucleotides, prodrug, depot-form of drug, thymidilate synthase of *M. tuberculosis*