



УДК 577.113.3.017

СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТИНИЛЬНЫХ И АЗИДО-ПРОИЗВОДНЫХ N⁴-ДОДЕЦИЛАМИНО-2'-ДЕЗОКСИЦИТИДИНА

© 2025 г. Д. А. Макаров*,[#], М. В. Ясько*, И. Л. Карпенко*, Э. В. Урбина*,
В. И. Попенко*, О. Г. Леонова*, Я. В. Ткачев*, Б. Ф. Васильева**, О. В. Ефременкова**,
С. Н. Кочетков*, Л. А. Александрова*

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

** Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе,
Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Поступила в редакцию 05.06.2025 г.

После доработки 25.06.2025 г.

Принята к публикации 26.06.2025 г.

Разработаны методы получения новых производных N⁴-додециламино-2'-дезоксидецилцитидина и цитидина. Новые производные содержат 5-этинильную, 5-(проп-2-ин-1-ил)оксиметильную или 5'-азидо-группы, необходимые для введения красителей *in vitro* с использованием методов клик-химии. Полученные соединения (III), (VIII), (XIII), (XVI), как и N⁴-додециламино-2'-дезоксидецилцитидин, показали значительную антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий. Новые нуклеозиды могут быть использованы для визуализации их субклеточной локализации с целью определения возможного механизма действия антибактериальных агентов подобного рода.

Ключевые слова: клик-химия, 1,3-диполярное циклоприсоединение, азид, этинил, нуклеозиды, N⁴-додециламино-2'-дезоксидецилцитидин, N-бромсукцинимид, азобисизобутиронитрил, антибактериальная активность

DOI: 10.7868/S1998286025060101

ВВЕДЕНИЕ

Выявление субклеточной локализации низкомолекулярных соединений – один из методов, который используется для выяснения механизмов действия биологически активных молекул, и таким образом для повышения их эффективности в качестве лекарственных средств. За последние десятилетия эволюция методов молекулярной биологии и микроскопии сделала возможной визуальное детектирование соединений в живых системах [1]. Один из основных способов визуализации субклеточной локализации малых молекул – ковалентное присоединение флуоресцентных красителей методом “клик-химии”. Наиболее распространенная реакция для подобных случаев – катализируемое одновалентной медью Cu(I) 1,3-диполяр-

ное циклоприсоединение Хьюсгена алкинов и азидов (реакция Хьюсгена-Мельдаля-Шарплесса, CuAAC) [2, 3].

С целью разработки удобных синтонов для введения маркерных групп (в первую очередь флуоресцентных красителей) в биополимеры и клетки для дальнейшего изучения их клеточной локализации, нами синтезирован набор производных 4-додециламино-2'-дезоксидецилцитидина и -цитидина, несущих в своем составе этинильные и азидогруппы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химический синтез

Для синтеза целевых соединений мы воспользовались ранее разработанным нами удобным

Сокращения: NBS – N-бромсукцинимид; AIBN – азобисизобутиронитрил; DCE – 1,2-дихлорэтан; DIPEA – диизопропилэтиламин; Вос – трет-бутоксикарбонил; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; CD₅₀ – цитотоксическая доза.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (939) 701-93-96, факс: +7 (499) 135-14-05, эл. почта: dmitmakarov_97@mail.ru).

one pot методом получения N^4 -алкил-2'-дезоксинуклеозидов [4–6], основанным на методе Дивакара и Риза [7, 8]: конденсацией нуклеозидов с защищенными гидроксильными группами, с 1,2,4-триазолом и 2-хлорфенилдихлорфосфатом в пиридине с последующей реакцией с соответствующими алкиламинами и деблокированием.

N^4 -Додециламино-5-этинил-2'-дезоксцитидин синтезировали по аналогии с разработанным нами ранее методами [4–6] исходя из 5-этинил-2'-дезоксйуридина (**I**, схема 1). Последующее деблокирование ацетильных защитных групп действием водно-спиртового раствора аммиака и очистка на колонке с силикагелем привели к получению N^4 -додециламино-5-этинил-2'-дезоксцитидина (**III**).

Исходное соединение в синтезе производного (**VIII**) с пропаргильным фрагментом (схема 2) –

3',5'-ди-*O*-ацетил-5-бромметил-2'-дезоксйуридин (**V**) [9], полученный радикальным бромированием 3',5'-ди-*O*-ацетилтимидина (**IV**) по методу [10, 11]. Нуклеофильное замещение брома в реакции (**V**) с пропаргильным спиртом по разработанному нами ранее рациональному методу [12, 13], последующие введение фрагмента додециламина, удаление защитных групп действием водно-спиртового раствора аммиака и очистка на колонке с силикагелем привели к получению целевого производного (**VIII**).

Для синтеза 5'-азидо- N^4 -додецил-5-метил-5'-дезоксцитидина (**XIII**) в соответствии со схемой 3 защищали в исходном 5-метилуридине (**IX**) 2',3'-цисдиольную группу *изопропилиденовой* защитной группой, тозилную группу вводили в 5'-положение углеводного остатка соединения (**X**) при

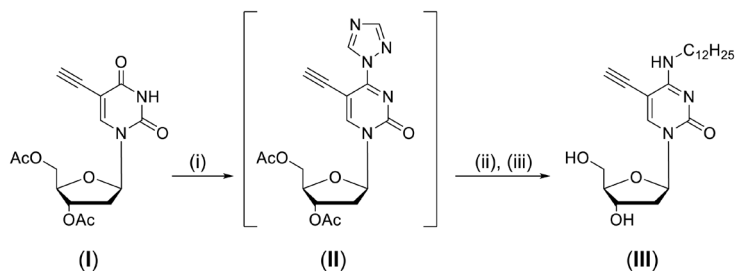


Схема 1. Реагенты и условия: (i) 1,2,4-триазол, 2-хлорфенилдихлорфосфат, пиридин, р.т., 16 ч; (ii) $C_{12}H_{25}NH_2$, DIPEA, диоксан, р.т., 16 ч; (iii) NH_3 (aq), EtOH, р.т., 12 ч.

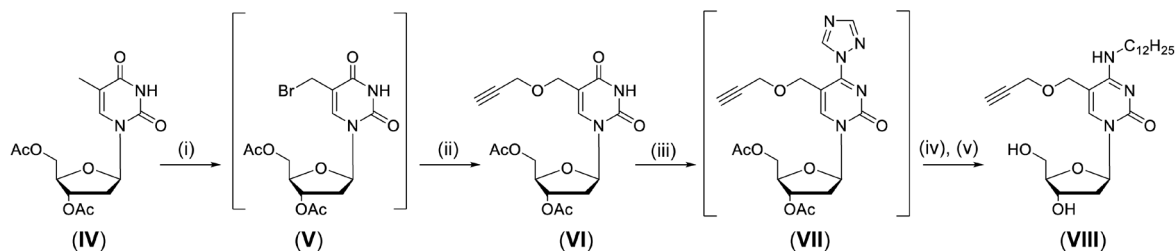


Схема 2. Реагенты и условия: (i) NBS, AIBN, 1,2-дихлорэтан, Δ , 3 ч; (ii) пропаргильный спирт, DMF, 37°C, 12 ч; (iii) 1,2,4-триазол, 2-хлорфенилдихлорфосфат, пиридин, р.т., 16 ч; (iv) $C_{12}H_{25}NH_2$, DIPEA, диоксан, р.т., 16 ч; (v) NH_3 (aq), EtOH, р.т., 12 ч.

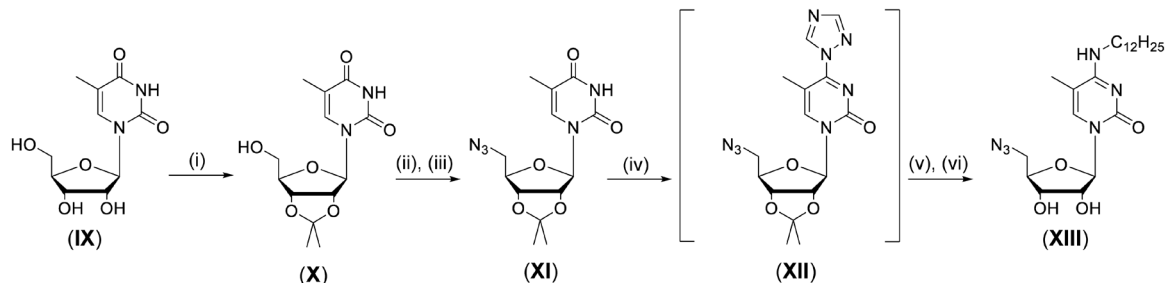


Схема 3. Реагенты и условия: (i) 2,2-диметоксипропан, $pTsOH$, диоксан, р.т., 12 ч; (ii) $pTsCl$, пиридин, 25°C, 12 ч; (iii) NaN_3 , DMF, 37°C, 12 ч; (iv) 1,2,4-триазол, 2-хлорфенилдихлорфосфат, пиридин, р.т., 16 ч; (v) $C_{12}H_{25}NH_2$, DIPEA, диоксан, р.т., 16 ч; (vi) CF_3COOH , H_2O , р.т., 12 ч.

действии тозилхлорида в пиридине, после чего конденсацией с азидом натрия получали 5'-азидо-2',3'-изопропилиден-5'-дезоксисуридин (XI). Далее по методикам, описанным выше [4-6], с последующим удалением изопропилиденовой защитной группы действием трифторуксусной кислоты и очистки на колонке с силикагелем был получен

5'-азидо- N^4 -додецил-5-метил-5'-дезоксидитидина (XIII).

Для повышения растворимости в водно-органических средах было получено производное (XVI), содержащее 5'-азидо- и 3'-аминогруппы. Его синтез осуществляли исходя из 3'-амино-3'-дезокситимидина (XIV) в соответствии со схемой 4.

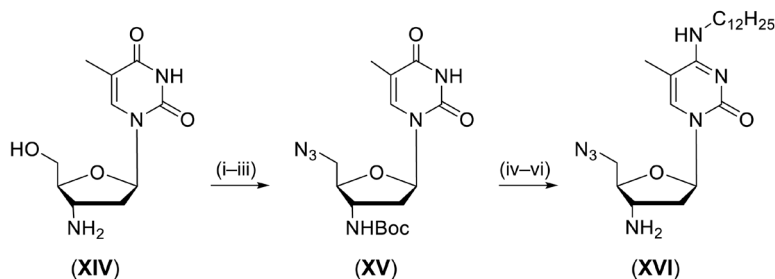


Схема 4. Реагенты и условия: (i) Boc_2O , EtOH, 37°C, 12 ч; (ii) $p\text{TsCl}$, пиридин, r.t., 12 ч; (iii) NaN_3 , DMF, 60°C, 3 ч; (iv) 1,2,4-триазол, 2-хлорфенилдихлорфосфат, пиридин, r.t., 16 ч; (v) $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NH}_2$, диоксан, 37°C, 16 ч; (vi) CF_3COOH , DCE, r.t., 12 ч.

Прежде всего, защищали 3'-аминогруппу 3'-амино-3'-дезокситимидина (XIV) Вос-группой действием Вос-ангидрида в этаноле, затем описанным выше методом получения соединения (XI) вводили в 5'-положение углеводного фрагмента азидо-группу. Далее модифицировали азотистое основания соединения (XV) по аналогичным методикам [4-6], с последующим удалением действием трифторуксусной кислоты Вос-защитной группы и очистки на колонке с силикагелем получали 5'-азидо-3'-амино- N^4 -додециламино-5-метил-2',3',5'-тридезоксидитидин (XVI).

Цитотоксичность синтезированных соединений (CD_{50}) оценивали с помощью МТТ-теста [14] на клеточных линиях *HeLa* и *A 549*. Соединения (III, VIII и XIII) продемонстрировали цитотоксическую активность в концентрациях 35–65 мкМ на клеточных линиях *HeLa* и 35–55 мкМ на клеточных линиях *A 549*. 5'-Азидо-3'-амино- N^4 -додецил-5-метил-2',3',5'-тридезоксидитидин (XVI) показал высокую цитотоксичность на обеих линиях клеток (20 мкМ).

Изучение антибактериального действия полученных соединений. Антибактериальное действие полученных соединений (по сравнению с N^4 -додецил-5-метил-2'-дезоксидитидином (XVII) и рядом применяемых в клинике антибиотиков) изучали по их способности ингибировать *in vitro* рост ряда микроорганизмов [15]. В табл. 1 представлены

значения минимальных ингибирующих концентраций для синтезированных соединений. Данные были получены по результатам трех независимых экспериментов в трех повторах. Перечень микроорганизмов приведен в экспериментальной части.

Из-за низкой растворимости исследуемых веществ в воде, их растворяли в 30% водном метаноле. Добавление 10% применяемой смеси растворителей к инкубационной смеси не оказывало токсического действия на тест-штаммы изучаемых микроорганизмов.

Полученные соединения ингибировали рост изученных грамположительных бактерий, включая их лекарственно устойчивые штаммы с эффективностью, сравнимой, в большинстве случаев, с действием как N^4 -додецил-5-метил-2'-дезоксидитидина (XVII), так и ряда применяемых в клинике антибиотиков. Введение дополнительных этилильных фрагментов по азотистому основанию приводило к незначительному понижению активности производных (III) и (VIII), по сравнению с родительским соединением (XVII), в то время как нуклеозиды (XIII) и (XVI) с азидо-группами в углеводной части по активности оказались близки к исходному N^4 -додецил-5-метил-2'-дезоксидитидину (XVII).

Проникновение синтона (XIII) в культуру клеток Huh7. В качестве примера возможности применения полученных нами соединений для выяв-

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК, мкг/мл) полученных соединений

Соединения	Бактерии						
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	<i>Mycobacterium smegmatis</i> VKPM Ac-1339	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
(III)	23	23	>23	23	23	<6	>23
(VIII)	>26	>26	26	26	<7	13	13
(XIII)	17	<9	<68	34	<9	<9	17
(XVI)	12	12	12	<6	<6	<6	<6
(XVII)	10	40	10	12	100	10	10
Применяемые антибиотики*	VA>275	AN 50 CIP 15 INZ 29 RFP 5	AN 29 CIP 12 INZ 2 RFP 10	AN 3,4 CIP 3 OX 2.5	AN 5 CIP 12 OX 80	AN 1	AN 4

* Амикацин (AN), ципрофлоксацин (CIP), изониазид (INZ), рифампицин (RFP), оксациллин (OX), ванкомицин (VA).

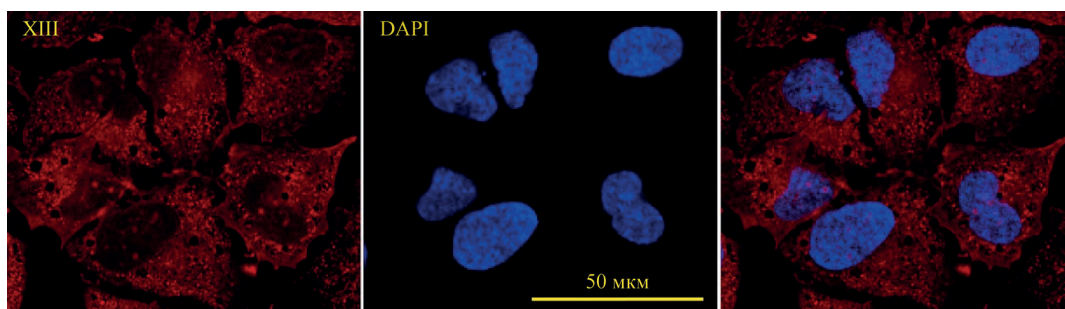


Рис. 1. Конфокальная микроскопия клеток Nuh7, обработанных синтоном (XIII) (*N*⁴-додецил-5'-азидо-5-метил-5'-дезокситидином). Слева – локализация синтона (XIII) в клетках, в центре – окрашивание хроматина ядра красителем DAPI, справа – наложение изображений.

ления их внутриклеточной локализации на рис. 1 представлены микрофотографии клеток карциномы печени Nuh7 после инкубации с синтоном (XIII). Данные клетки были выбраны нами исходя из того, что они доступные и удобные модельные объекты для получения предварительных данных по внутриклеточной локализации, в отличие от бактериальных клеток. Более того, полученные результаты представляется интересным сравнить с будущими данными для бактерий, что может дать лучшее понимание сути происходящих процессов. Для визуализации соединения с использованием конфокального микроскопа было проведено катализируемое одновалентной медью Cu(I) 1,3-дипольное циклоприсоединение сульфо-цианин3 алкина (рис. 2), содержащего этинильную группу, методом “клик-химии”.

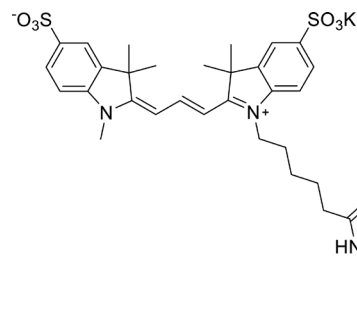


Рис. 2. Структурная формула используемого красителя сульфо-цианин3 алкина.

На микрофотографиях, полученных с помощью конфокальной микроскопии видно, что полученный нуклеозид (XIII) способен проникать в клетки Nuh7, он равномерно распределен в цитоплазме, находится в ядрышках, однако не при-

сутствует в ядрах клеток. На основании представленных данных можно говорить о том, что механизм действия соединения (**XIII**) не связан со встраиванием его в клеточную ДНК. По-видимому, мишень, на которую направлены подобные производные нуклеозидов или находится внутри клетки или же происходит взаимодействие соединений с клеточной мембраной. Поэтому данные по внутриклеточной локализации нуждаются в более детальном исследовании, что будет служить предметом будущих публикаций.

Таким образом, нами синтезированы удобные синтоны (**III**, **VIII**, **XIII** и **XVI**) для введения маркерных групп в нуклеозиды методами клик-химии. Производные могут быть использованы для изучения их клеточной локализации в микроорганизмах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие реактивы фирм “Fluka” (Германия), “Sigma-Aldrich” (США) и “Acros Organics” (США). 5-Этинил-2'-дезоксидитидин формы Lumiprobe, (Россия). Колонную хроматографию проводили с использованием силикагеля Kieselgel 60 (40–63 мкм) (Merck, Германия). Спектры ЯМР (δ , м.д., КССВ, Гц) регистрировали в DMSO- d_6 на спектрометре Avance III (Bruker, США) с рабочей частотой 300 МГц для ЯМР ^1H (внутренний стандарт – Me_4Si), 75 МГц для ЯМР ^{13}C (внутренний стандарт – Me_4Si). ТСХ проводили на пластинках Merck. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре SF-102 (Akvilon, Россия) в метаноле. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе Bruker Daltonics micrOTOF-Q II (Bruker, США) методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных ионах. Напряжение на капилляре: 4500 В; диапазон сканирования масс: m/z 50–2500 Да; калибровка: внешняя (LC/MS Calibration standard for ESI-TOF, Agilent); давление на распылителе: 0.4 бар; скорость потока: 3 мкл/мин; газ-распылитель: азот (4 л/мин); температура интерфейса: 180°C. Образцы подавались в распылительную камеру масс-спектрометра после жидкостного хроматографа Agilent 1260 (Agilent, США), оснащенного колонкой Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0 \times 50 мм; 2.7 мкм); скорость потока 0.2 мл/мин; образцы веществ подавались в ВЭЖХ-хроматограф из раст-

вора в метаноле (5 мкл). N^4 -Додецил-5-метил-2'-дезоксидитидин (**XVII**) получен по методу [4]. Конфокальную микроскопию проводили, добавляя синтон (**XIII**) в среду для культивирования клеток культуры карциномы печени Huh7 до концентрации 12,5 мкМ. Через 1 ч клетки промывали чистой средой, фиксировали 4% параформальдегидом в 0.1 М фосфатном буфере при pH 7.3 в течение 20 мин при комнатной температуре. Для выявления синтона (**XIII**) в клетках проводили клик-реакцию с сульфо-цианин3 алкином (кат. № A13B0, Lumoprobe, Россия) с использованием набора для клик-реакции (кат. № C10638, Thermo Fisher Scientific, США). Препараты заключали в среду “Slowfade Gold” (кат. № S36936, Thermo Fisher Scientific, США) с 1 мкг/мл 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (кат. № D9542, Sigma-Aldrich, США) и просматривали в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Для возбуждения использовали 405 и 543 нм лазеры, диапазоны регистрации флуоресценции 415–480 и 555–620 нм, соответственно.

Общий метод синтеза N^4 -алкилцитидинов (III**), (**VIII**), (**XIII**), (**XVI**) через активацию по Дивакару-Рису.** К охлажденному до 0°C раствору исходного нуклеозида (1 экв) и 1,2,4-триазола (6 экв) в сухом пиридине (10 мл) добавляли 2-хлорфенилди-хлорфосфат (2.2 экв) и оставляли полученную смесь при перемешивании в течение 16 ч при комнатной температуре. Затем раствор упаривали, остаток экстрагировали в слоях хлороформа и 0.5 М водного раствора гидрокарбоната натрия (3 \times 20 мл). Органический слой отбирали, сушили над Na_2SO_4 , после чего упаривали в вакууме, а затем растворяли полученный остаток в безводном диоксане. К полученному раствору добавляли додециламин (2 экв), диизопропилэтиламин (5 экв) и оставляли при комнатной температуре в течение 16 ч.

N^4 -Додецил-5-этинил-2'-дезоксидитидин (III**).** Синтезировали по общему методу синтеза N^4 -алкилцитидинов из исходного нуклеозида (**I**) (200 мг, 0.59 ммоль), 1,2,4-триазола (250 мг, 3.57 ммоль), 2-хлорфенилди-хлорфосфата (210 мкл, 1.31 ммоль), додециламина (220 мг, 1.19 ммоль), диизопропилэтиламина (510 мкл, 2.97 ммоль). Далее реакционную смесь упаривали в вакууме, растворяли в этаноле (5 мл) и добавляли концентрированный раствор водного аммиака (5 мл) и остав-

ляли при перемешивании при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем упаривали в вакууме, целевое соединение выделяли с помощью колоночной хроматографии в системе этилацетат–этанол (15 : 1). Выход: 210 мг (87%). УФ: $\lambda_{\max} = 277$ нм (ϵ 12900). ЯМР ^1H (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 8.21 (с, 1H, 6-H), 7.26 (т, $J = 6.5$ Гц, 1H, 4-NH), 6.11 (т, $J = 6.4$ Гц, 1H, 1'-H), 5.20 (уш. с, 1H, 5'-OH), 5.08 (уш. с, 1H, 3'-OH), 4.40 (с, 1H, 5-C \equiv CH), 4.22 (дт, $J = 6.6, 3.5$ Гц, 1H, 3'-H), 3.80 (кв, $J = 3.4$ Гц, 1H, 4'-H), 3.67–3.53 (м, 2H, 5'-CH $_2$), 3.34–3.25 (м, 2H, α -CH $_2$), 2.24–2.09 (м, 1H, 2'-Ha), 2.06–1.95 (м, 1H, 2'-Hb), 1.59–1.42 (м, 2H, β -CH $_2$), 1.29–1.18 (м, 18H, (CH $_2$) $_9$), 0.94–0.79 (м, 3H, CH $_3$). ЯМР ^{13}C (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 161.47 (C-4), 153.28 (C-2), 144.52 (C-6), 89.36 (C-4'), 87.44 (C-1'), 86.54 (C-5), 85.38 (5-C \equiv CH), 75.58 (5-C \equiv CH), 70.02 (C-3'), 60.92 (C-5'), 40.81 (α -CH $_2$), 40.26 (C-2'), 31.28, 29.01, 28.75, 28.50, 26.37, 22.08 ((CH $_2$) $_{10}$), 13.92 (CH $_3$). MS (ESI) рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4$ 420.2857 $[M + \text{H}]^+$, найдено 420.2786.

Синтез 3',5'-ди-*O*-ацетил-5-бромметил-2'-дезоксинуридина (V). Исходный нуклеозид (IV) (1 г, 3.07 ммоль) растворяли в 1,2-дихлорэтаноле, добавляли *N*-бромсукцинимид (650 мг, 3.68 ммоль) и азобисизобутиронитрил (25 мг, 0.15 ммоль), смесь кипятили с обратным холодильником в атмосфере аргона в течение 3 ч. Затем смесь упаривали в вакууме, растворяли в хлороформе, проводили флеш-хроматографию, элюируя системой этилацетат–гексан (4 : 1), после чего полученный раствор упаривали в вакууме, переупаривали с толуолом. Полученную смесь использовали в дальнейшей реакции без выделения целевого продукта.

3',5'-Ди-*O*-ацетил-5-(проп-2-ин-1-илокси)метил-2'-дезоксинуридин (VI). Реакционную смесь, содержащую соединение (V), растворяли в диметилформамиде (5 мл) и добавляли пропаргильовый спирт (360 мкл, 6.14 ммоль). Раствор оставляли на 24 ч при температуре 37°C, затем упаривали в вакууме. Целевой продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, элюируя системой хлороформ–этанол (60 : 1). Выход соединения (VI) составил 460 мг (39%). ЯМР ^1H (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 11.50 (с, 1H, 3-NH), 7.66 (с, 1H, 6-H), 6.18 (дд, $J = 8.1, 6.2$ Гц, 1H, 1'-H), 5.20 (дт, $J = 6.2, 2.6$ Гц, 1H, 3'-H), 4.28–4.18 (м, 5H, 5-CH $_2$, 5'-CH $_2$, 4'-H), 4.16 (д, $J = 2.4$ Гц, 2H, OCH $_2$ -C \equiv CH), 3.44 (т, $J = 2.4, 2.4$ Гц, 1H, 5-C \equiv CH), 2.49–2.23 (м, 2H, 2'-H), 2.12–2.02 (м, 6H, 2Ac).

***N*⁴-Додecil-5-(проп-2-ин-1-илокси)метил-2'-дезоксинуридин (VIII).** Синтезировали по общему методу синтеза *N*⁴-алкилцитидинов из исходного нуклеозида (VI) (400 мг, 1.05 ммоль), 1,2,4-триазола (430 мг, 6.31 ммоль), 2-хлорфенилдихлорфосфата (370 мкл, 2.31 ммоль), додециламина (390 мг, 2.1 ммоль), диизопропилэтиламина (910 мкл, 5.26 ммоль). Далее реакционную смесь упаривали в вакууме, растворяли в этаноле (5 мл) и добавляли концентрированный раствор водного аммиака (5 мл) и оставляли при перемешивании при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем упаривали в вакууме, целевое соединение выделяли с помощью колоночной хроматографии в системе этилацетат–этанол (15 : 1). Выход: 424 мг (87 %). УФ: $\lambda_{\max} = 277$ нм (ϵ 12900). ЯМР ^1H (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 7.81 (с, 1H, 6-H), 6.93 (т, $J = 5.7$ Гц, 1H, 4-NH), 6.15 (дд, $J = 7.3, 6.0$ Гц, 1H, 1'-H), 5.17 (д, $J = 4.2$ Гц, 1H, 3'-OH), 4.96 (т, $J = 5.2$ Гц, 1H, 5'-OH), 4.30–4.18 (м, 3H, 5-CH $_2$, 3'-H), 4.13 (д, $J = 2.4$ Гц, 2H, OCH $_2$ -C \equiv CH), 3.77 (кв, $J = 3.7$ Гц, 1H, 4'-H), 3.66–3.48 (м, 2H, 5'-CH $_2$), 3.45 (т, $J = 2.4$ Гц, 1H, 5-C \equiv CH), 3.31–3.19 (м, 2H, α -CH $_2$), 2.12 (ддд, $J = 13.2, 6.0, 3.4$ Гц, 1H, 2'-Ha), 1.98 (ддд, $J = 13.2, 7.4, 6.0$ Гц, 1H, 2'-Hb), 1.58–1.44 (м, 2H, β -CH $_2$), 1.35–1.20 (м, 18H, (CH $_2$) $_9$), 0.90–0.81 (м, 3H, CH $_3$). ЯМР ^{13}C (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 161.75 (C-4), 154.68 (C-2), 140.31 (C-6), 101.86 (C-5), 87.20 (C-4'), 84.83 (C-1'), 80.02 (5-C \equiv CH), 77.40 (5-C \equiv CH), 70.26 (C-3'), 65.05 (5-CH $_2$), 61.26 (C-5'), 56.25 (OCH $_2$ -C \equiv CH), 40.33 (C-2'), 31.25, 29.20, 28.19, 26.36, 22.04 ((CH $_2$) $_{10}$), 13.90 (CH $_3$). MS (ESI) рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5$ 464.3119 $[M + \text{H}]^+$, найдено 464.3154.

2',3'-*O*-Изопропилиден-5-метилуридин (X). 5-Метилуридин (IX) (2 г, 7.7 ммоль) суспендировали в диоксане (20 мл) и добавляли при перемешивании 2,2-диметоксипропан (1.75 мл, 23.1 ммоль) и *para*-толуолсульфоновую кислоту (290 мг, 1.54 ммоль) и оставляли реакционную смесь при комнатной температуре в течение 12 ч до полного растворения осадка исходного нуклеозида. После чего смесь упаривали в вакууме и выделяли целевой продукт с помощью колоночной хроматографии, элюируя системой хлороформ–этанол (30 : 1). Выход соединения (X) составил 2.2 г (96%). ЯМР ^1H (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 11.32 (с, 1H, 3-NH), 7.64 (кв, $J = 1.1$ Гц, 1H, 6-H), 5.84 (д, $J = 2.9$ Гц, 1H, 1'-H), 5.05 (т, $J = 5.3$ Гц, 1H, 5'-OH), 4.87 (дд, $J = 6.4, 2.9$ Гц, 1H, 2'-H), 4.76 (дд, $J = 6.5, 3.6$ Гц, 1H,

3'-H), 4.04 (кв, $J = 4.2$ Гц, 1H, 4'-H), 3.66–3.50 (м, 2H, 5'-CH₂), 1.78 (д, $J = 1.2$ Гц, 3H, 5-CH₃), 1.50 (с, 3H, CH₃(Ip)), 1.30 (с, 3H, CH₃(Ip)).

5'-Азидо-2',3'-О-изопропилиден-5-метил-5'-дезоксинуридин (XI). Исходный нуклеозид (X) (1 г, 3.35 ммоль) растворяли в сухом пиридине (15 мл), добавляли к полученному раствору *пара*-толуолсульфонилхлорид (960 мг, 5.02 ммоль) и оставляли реакционную смесь при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем смесь упаривали в вакууме, остаток экстрагировали в слоях хлороформа и 0.5 М водного раствора гидрокарбоната натрия. Органический слой отбирали, сушили над Na₂SO₄, после чего упаривали в вакууме, и растворяли в диметилформамиде (10 мл). К полученному раствору добавляли азид натрия (2.18 г, 33.5 ммоль) и оставляли при 37°C в течение 12 ч. После прохождения реакции смесь упаривали в вакууме, остаток экстрагировали в слоях хлороформа и воды. Органический слой отбирали, сушили над Na₂SO₄, после чего упаривали в вакууме. Целевой продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, элюируя системой хлороформ–этанол (30 : 1). Выход соединения (XI) составил 940 мг (87%). ЯМР ¹H (300 МГц, DMSO-*d*₆): 11.43 (с, 1H, 3-NH), 7.58 (кв, $J = 1.2$ Гц, 1H, 6-H), 5.81 (д, $J = 2.4$ Гц, 1H, 1'-H), 5.07 (дд, $J = 6.5, 2.4$ Гц, 1H, 2'-H), 4.77 (дд, $J = 6.6, 4.2$ Гц, 1H, 3'-H), 4.13 (тд, $J = 5.6, 4.1$ Гц, 1H, 4'-H), 3.64–3.55 (м, 2H, 5'-CH₂), 1.78 (д, $J = 1.2$ Гц, 3H, 5-CH₃), 1.50 (с, 3H, CH₃(Ip)), 1.30 (с, 3H, CH₃(Ip)).

5'-Азидо- N^4 -додecil-5-метил-5'-дезоксидитидин (XIII). Синтезировали по общему методу синтеза N^4 -алкилцитидинов из исходного нуклеозида (XI) (900 мг, 2.78 ммоль), 1,2,4-триазола (1.15 г, 16.72 ммоль), 2-хлорфенилди-хлорфосфата (990 мкл, 6.13 ммоль), додециламина (1.03 г, 5.56 ммоль), диизопропилэтиламина (2.4 мл, 13.9 ммоль). Далее реакционную смесь упаривали в вакууме, растворяли в 80% растворе трифторуксусной кислоты (5 мл) и оставляли при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем упаривали в вакууме, целевое соединение выделяли с помощью колоночной хроматографии в системе этилацетат–этанол (15 : 1). Выход: 1.04 г (83 %). УФ: $\lambda_{\max} = 276$ нм (ϵ 12900). ЯМР ¹H (300 МГц, DMSO-*d*₆): 7.46 (т, $J = 6.0$ Гц, 1H, 4-NH), 7.41 (кв, $J = 1.5$ Гц, 1H, 6-H), 5.82 (д, $J = 4.8$ Гц, 1H, 1'-H), 4.14–4.02 (м, 1H, 2'-H), 4.00–3.86 (м, 2H, 3'-H,

4'-H), 3.67–3.54 (м, 2H, 5'-CH₂), 3.32 (дт, $J = 6.8, 6.7$ Гц, 2H, α -CH₂), 1.88 (с, 3H, 5-CH₃), 1.58–1.50 (м, 2H, β -CH₂), 1.32–1.21 (м, 18H, (CH₂)₉), 0.91–0.78 (м, 3H, CH₃). ЯМР ¹³C (75 МГц, DMSO-*d*₆): 161.86 (C-4), 154.26 (C-2), 137.77 (C-6), 102.24 (C-5), 89.57 (C-1'), 81.59 (C-4'), 72.74 (C-2'), 70.38 (C-3'), 51.74 (C-5'), 40.50 (α -CH₂), 31.26, 29.00, 28.80, 28.67, 28.45, 26.38, 22.05 (CH₂)₁₀, 13.89 (CH₃), 12.89 (5-CH₃). MS (ESI) рассчитано для C₂₂H₃₈N₆O₄ 451.3027 [$M + H$]⁺, найдено 451.3013.

3'-(*трет*-Бутилоксикарбонил)амино-5'-азидо-3',5'-дидезокситимидин (XV). К раствору 400 г 3'-амино-3'-дезокситимидина (XIV) (340 мг, 1.41 ммоль) в 30 мл этанола прибавляли Вос₂O (300 мг, 2.29 ммоль) и оставляли при 37°C в течение 12 ч. Затем раствор упаривали, соединение (XV) выделяли с помощью колоночной хроматографии, элюируя системой хлороформ–этанол (20 : 1). Выход соединения (XV) составил 443 мг (92%). ЯМР ¹H (300 МГц, DMSO-*d*₆): 11.31 (с, 1H, 3-NH), 7.53 (кв, $J = 1$ Гц, 1H, 6-H), 7.30 (д, $J = 7.2$ Гц, 1H, 3'-NH), 6.16 (дд, $J = 6.8, 6.6$ Гц, 1H, 1'-H), 4.13–4.03 (м, 1H, 3'-H), 3.86–3.81 (м, 1H, 4'-H), 3.64–3.50 (м, 2H, 5'-CH₂), 2.39–2.29 (м, 1H, 2'-Ha), 2.21–2.12 (м, 1H, 2'-Hb), 1.80 (д, $J = 1$ Гц, 3H, 5-CH₃), 1.40 (с, 9H, ^tBu).

5'-Азидо-3'-амино- N^4 -додecil-5-метил-2',3',5'-тридезоксидитидин (XVI). Исходный нуклеозид (XV) (440 мг, 1.29 ммоль) растворяли в сухом пиридине (10 мл), добавляли к полученному раствору *пара*-толуолсульфонилхлорид (324 мг, 1.7 ммоль) и оставляли реакционную смесь при комнатной температуре на 12 ч. Затем смесь упаривали в вакууме, к остатку приливали 0.5 М водного раствора гидрокарбоната натрия (30 мл), и экстрагировали хлороформом (3 × 20 мл). Органические слои сушили над Na₂SO₄, упаривали в вакууме, и растворяли в диметилформамиде (5 мл). К полученному раствору добавляли азид натрия (0.2 г, 3.1 ммоль) и перемешивали при 60°C в течение 3 ч. После прохождения реакции смесь упаривали в вакууме, к остатку добавляли воду (30 мл), и экстрагировали хлороформом (3 × 20 мл). Органические слои сушили над Na₂SO₄, и упаривали в вакууме, растворяли в сухом пиридине (15 мл), прибавляли 1,2,4-триазол (642 мг, 9.3 ммоль), охлаждали раствор до 0°C и приливали 2-хлорфенилди-хлорфосфат (300 мкл, 1.86 ммоль), оставляли полученную смесь при

перемешивании при комнатной температуре на 16 ч. Затем раствор упаривали, к остатку приливали 0.5 М водного раствора гидрокарбоната натрия (30 мл), и экстрагировали хлороформом (3×20 мл). Органические слои сушили над Na_2SO_4 , упаривали в вакууме, а затем растворяли полученный остаток в безводном диоксане. К полученному раствору добавляли додециламин (278 мг, 1.5 ммоль) и оставляли при 37°C на 12 ч. Далее реакционную смесь упаривали в вакууме, растворяли в 1,2-дихлорэтаноле (4 мл), добавляли трифторуксусную кислоту (2 мл), и оставляли при комнатной температуре на 12 ч. Реакционную смесь упаривали, соупаривали с толуолом (2×5 мл). Целевой продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, элюируя системой хлороформ–этанол (9 : 1). Выход соединения (**XVI**) составил 205 мг (37%). УФ: $\lambda_{\text{max}} = 276$ нм (ϵ 12800). ЯМР ^1H (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 7.36 (кв, $J = 0.8$ Гц, 1H, 6-H), 7.16 (т, $J = 5.5$ Гц, 1H, 4-NH), 6.19 (дд, $J = 6.6, 6.0$ Гц, 1H, 1'-H), 3.71–3.53 (м, 3H, 5'- CH_2 , 4'-H), 3.38–3.25 (м, 3H, α - CH_2 , 3'-H), 2.13–1.98 (м, 2H, 2'- CH_2), 1.87 (уш.с, 3H, 5- CH_3), 1.53–1.49 (м, 2H, β - CH_2), 1.24 (уш.с, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 0.85 (дд, $J = 7.0, 6.4$ Гц, 3H, CH_3). ЯМР ^{13}C (75 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 161.60 (C-4), 154.96 (C-2), 136.81 (C-6), 101.99 (C-5), 84.46 (C-1'), 84.01 (C-4'), 52.15 (C-3'), 51.80 (C-5'), 40.20 (α - CH_2), 39.94 (C-2'), 31.27, 29.03, 28.99, 28.85, 28.68, 28.55, 26.46, 22.06 ($(\text{CH}_2)_{10}$), 13.86 (CH_3), 13.02 (5- CH_3). MS (ESI) рассчитано для $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_2$ 434.3238 $[M + H]^+$, найдено 434.3217.

Изучение антибактериального действия. Использовали следующие тест-штаммы: грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* FDA 209P (MRSA) и метициллин-резистентный штамм *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), стрептококкоподобные бактерии *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, микобактерии: *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 и VKPM Ac 1339 из коллекции Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе.

Эксперименты проводили в соответствии с методиками, описанными ранее [3, 14].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00106).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В эксперименты не были вовлечены животные и люди. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cañeque T., Müller S., Rodriguez R. // Nat. Rev. Chem. 2018. V. 2. P. 202–215. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0030-x>
2. Kaur J., Saxena M., Rishi N. // Bioconj. Chem. 2021. V. 32. P. 1455–1471. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00247>
3. Ustinov A.V., Stepanova I.A., Dubnyakova V.V., Zatselin T.S., Nozhevnikova E.V., Korshun V.A. // Bioorg. Khimia. 2010. V. 36. P. 437–481.
4. Alexandrova L.A., Jasko M.V., Negrya S.D., Solyev P.N., Shevchenko O.V., Solodinin A.P., Kolonitskaya D.P., Karpenko I.L., Efremenkova O.V., Glukhova A.A., Boykova Y.V., Efimenko T.A., Kost N.V., Avdanina D.A., Nuraeva G.K., Volkov I.A., Kochetkov S.N., Zhgun. A.A. // Eur. J. Med. Chem. 2021. V. 215. P. 113212. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113212>
5. Alexandrova L.A., Shevchenko O.V., Jasko M.V., Solyev P.N., Karpenko I.L., Negrya S.D., Efremenkova O.V., Vasilieva B.F., Efimenko T.A., Avdanina D.A., Nuraeva G.K., Potapov M.P., Kukushkina V.I., Kochetkov S.N., Zhgun A.A. // New J. Chem. 2022. V. 46. P. 5614–5626. <https://doi.org/10.1039/D1NJ04312A>
6. Alexandrova L.A., Oskolsky I.A., Makarov D.A., Jasko M.V., Karpenko I.L., Efremenkova O.V., Vasilieva B.F., Avdanina D.A., Ermolyuk A.A., Benko, E.E., Kalinin S.G., Kolganova T.V., Berzina M.Ya., Konstantinova I.D., Chizhov A.O., Kochetkov S.N., Zhgun A.A. // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. P. 3053. <https://doi.org/10.3390/ijms25053053>
7. Divakar K.J., Reese C.B. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1982. P. 1171–1176. <https://doi.org/10.1039/P19820001171>
8. Lin T.S., Gao Y.S., Mancini W.R. // J. Med. Chem. 1983. V. 26. P. 1691–1696. <https://doi.org/10.1021/jm00366a006>

9. Barwolff D., Langen. P. // *Nucleic Acid Chem.* 1978, V. 1. P. 359–366.
10. Wohl A. // *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)* 1919. V. 52. P. 51–63.
11. Ziegler K., Schenck G., Krockow E.W., Siebert A., Wenz A., Weber H. // *Justus Liebig's Ann. der Chemie.* 1942. V. 551. P. 80–119.
12. Levina A.S., Tabatadse D.R., Khalinskaya L.M., Prichodko T.A., Shishkin G.V., Alexandrova L.A., Zarytova V.P. // *Bioconjug. Chem.* 1993. V. 4. P. 319–325.
13. Zarytova V.F., Komarova N.I., Levina A.S., Lokhov S.G., Tabatadze D.R., Khalinskaya L.M., Alexandrova L.A. // *Bioorg. Khim.* 1991. V. 17. P. 1059–1065.
14. Nikš M., Otto M. // *J. Immunol. Methods.* 1990. V. 130. P. 149–151.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90309-j](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90309-j)
15. 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. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 2020. V. 73. P. 236–246.
<https://doi.org/10.1038/s41429-019-0273-x>

Synthesis and Antibacterial Activity of Ethynyl and Azido Derivatives of N^4 -Dodecylamino-2'-deoxycytidine

**D. A. Makarov^{*, #}, M. V. Jasko^{*}, I. L. Karpenko^{*}, E. V. Urbina^{*}, V. I. Popenko^{*},
O. G. Leonova^{*}, Y. V. Tkachev^{*}, B. F. Vasilyeva^{**}, O. V. Efremenkova^{**},
S. N. Kochetkov^{*}, and L. A. Alexandrova^{*}**

[#] Phone: +7 (939) 701-93-96; fax: +7 (499) 135-14-05; e-mail: dmitmakarov_97@mail.ru

^{*} Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

^{**} Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bol'shaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119021 Russia

Methods for obtaining new derivatives of N^4 -dodecylamino-2'-deoxycytidine and cytidine have been developed. The new derivatives contain 5-ethynyl, 5-(prop-2-in-1-yl)oxymethyl or 5'-azido groups necessary for the introduction of dyes *in vitro* using click chemistry methods. The obtained compounds, as well as N^4 -dodecylamino-2'-deoxycytidine, showed significant antibacterial activity against Gram-positive bacteria. The new nucleosides can be used to visualize their subcellular localization in order to determine the possible mechanism of action of antibacterial agents of this kind.

Keywords: click chemistry, 1,3-dipolar cycloaddition, azide, ethynyl, nucleosides, N^4 -dodecylamino-2'-deoxycytidine, *N*-bromosuccinimide, azobisisobutyronitrile, antibacterial activity