

УДК 579.66:577.15 + 577.113.3

А. И. БЕРЕСНЕВ¹, С. В. КВАЧ¹, Г. Г. СИВЕЦ², Т. С. БОЖОК²,
Е. Н. КАЛИНИЧЕНКО², А. И. ЗИНЧЕНКО¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ НУКЛЕОЗИДОВ

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: zinch@mbio.bas-net.by,

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск,

(Поступила в редакцию 30.12.2014)

Введение. В настоящее время большинство представителей класса модифицированных нуклеозидов получают с использованием ферментов микроорганизмов. Каноническая схема их получения состоит в фосфоролитическом расщеплении уридинфосфорилазой (УРФаза), тимидинфосфорилазой (ТФаза) или пиримидиннуклеозидфосфорилазой (ПирНФаза) в присутствии фосфат-ионов сравнительно дешевого пиримидинового нуклеозида с образованием α -D-сахаро-1-фосфата и в последующем его переносе пуридиннуклеозидфосфорилазой (ПурНФаза) на пуриновое азотистое основание, в результате чего образуются пуриновый нуклеозид и молекула неорганического фосфата [1].

Ежегодно появляются новые публикации, описывающие получение модифицированных нуклеозидов с использованием ферментов, изолированных из гипертермофильных микроорганизмов. Так, в ряде наших работ [2, 3], а также в сообщении [4] показаны уникальные каталитические свойства мутантной ПирНФазы *Thermus thermophilus* (мутПирНФазы), одним из которых является способность катализировать фосфоролиз пиримидиновых нуклеозидов, содержащих атом фтора в углеводной части молекулы. Помимо этого, высокая термостабильность фермента обеспечивает его длительное функционирование при повышенных температурах реакционной среды, что уменьшает время протекания реакций.

Все известные к настоящему времени ПурНФазы из термофильных микроорганизмов проявляют ферментативную активность в отношении 6-оксопуриновых нуклеозидов, однако некоторые из них способны использовать в качестве субстратов 6-аминопуриновые нуклеозиды [5, 6]. В нашей недавней публикации продемонстрировано, что замена аспарагина в положении 204 полипептидной цепи ПурНФазы *T. thermophilus* (мутПурНФаза) на аспарагиновую кислоту позволяет полученному генно-инженерному ферменту катализировать реакцию образования производного 6-аминопуринового нуклеозида – 3'-фтор-2',3'-дидезокси-2-аминоаденозина [7].

Цель работы – изучение некоторых физико-химических свойств ПирНФазы и мутПурНФазы *T. thermophilus*, сравнительной субстратной специфичности трех рекомбинантных пиримидиннуклеозидфосфорилаз в отношении широкого ряда производных пиримидиновых нуклеозидов, а также получение с применением биокатализаторов ряда нуклеозидных аналогов, модифицированных в углеводной части и гетероциклическом основании.

Материалы и методы исследования. В работе использовали полученные нами ранее мутПирНФазу *T. thermophilus* [2], мутПурНФазу *T. thermophilus* [7] и ПурНФазу *Escherichia coli* [8]. Активность этих ферментов определяли спектрофотометрическими методами.

Для определения pH-оптимума мутПурНФазы реакционные смеси, содержащие 0,2 М калий-фосфатный буфер (КФБ; pH 3–9), 20 мМ инозин и 10 ед/мл мутПурНФазы, инкубировали в течение 20 мин при 80 °С.

Смеси для изучения фосфоролитической активности мутПирНФазы состояли из 50 мМ КФБ (рН 6,0), 10 мМ пиримидинового нуклеозида и 2 ед/мл мутПирНФазы. Растворы инкубировали при 80 °С в течение 96 ч. В качестве сравнения аналогичные реакции были проведены при 45 °С с использованием ранее полученных в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси рекомбинантных ТФазы и УРФазы *E. coli*. Данные по выходу целевых продуктов приведены в виде молярных процентов от теоретически возможной величины.

Ферментативный синтез модифицированных нуклеозидов проводили при 60 °С в течение 24–120 ч, а реакционные смеси имели следующий компонентный состав: 15 мМ нуклеозид (донор углеводного компонента), 10 мМ азотистое гетероциклическое основание, 5 мМ КФБ (рН 7,0), 20 ед/мл мутПирНФазы *T. thermophilus*, 200 ед/мл ПурНФазы *E. coli* или 40 мутПурНФазы *T. thermophilus*. В реакциях, где в качестве субстратов применялись только пиримидиновые нуклеозидные аналоги, использовали одну мутПирНФазу. Такие реакции вели при температуре 80 °С.

Контроль накопления продуктов в реакциях по изучению рН-оптимума мутПурНФазы, фосфоролитической активности нуклеозидфосфорилаз и синтезу модифицированных нуклеозидов проводили путем ТСХ в системах растворителей: 1) хлороформ – этанол (4:1, об/об); 2) изопропанол – хлороформ – 25 %-ный водный аммиак (10:10:1, об/об); 3) н-бутанол – 25 %-ный водный аммиак (7:2, об/об).

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой доверительные интервалы среднего арифметического для 95 %-ного уровня вероятности.

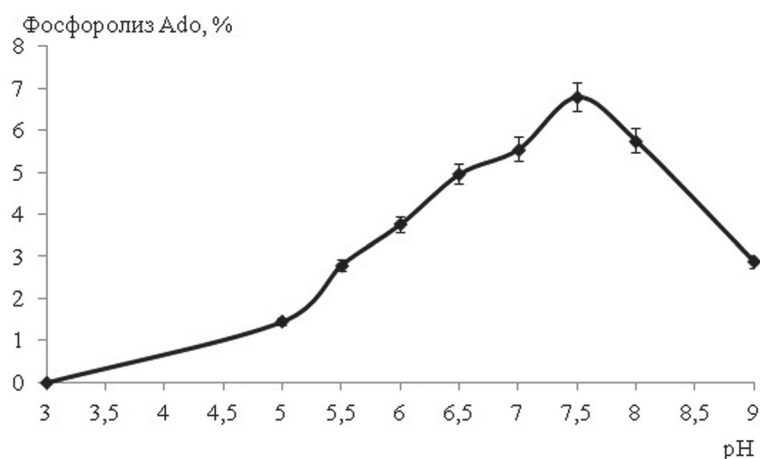
Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования после наработки и частичной очистки целевых ферментов проведено измерение их ферментативной активности. Данные, полученные в ходе выполнения экспериментов, представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, замена в положении 204 полипептидной цепи мутПурНФазы *T. thermophilus* Asp на Asp приводит к появлению способности фермента воспринимать в качестве субстрата аденин, который является представителем класса пуринов, содержащих 6-NH₂-группу. Аналогичный фермент с нативной полипептидной структурой не способен использовать в качестве субстратов гетероциклические основания указанного типа [9]. Однако следует отметить, что приобретенная активность фермента в несколько раз ниже, чем у существующих ферментов мезофильных микроорганизмов в отношении аденина и его производных, что на данный момент, даже с учетом высокой термостабильности мутПурНФазы, делает затруднительным его использование для получения модифицированных нуклеозидов в препаративных количествах.

Т а б л и ц а 1. Ферментативная активность ПурНФазы *E. coli*, мутПирНФазы и мутПурНФазы *T. thermophilus*

Фермент	Активность		
	ед/мг клеток	ед/л КЖ	ед/мг белка
ПурНФаза	180 ± 15	1 350 000 ± 12 300	430 ± 26
МутПирНФаза	12,7 ± 0,9	18450 ± 220	65 ± 3,4
МутПурНФаза	2,5 ± 0,3	3750 ± 230	14 ± 1,3

Ранее нами было установлено, что оптимальными условиями проведения синтеза модифицированных нуклеозидов с участием мутПирНФазы *T. thermophilus* являются значение температуры 60–80 °С и рН 6 ± 0,5. В свою очередь для ПурНФазы *E. coli* такими условиями являются температура в диапазоне значений 50–60 °С и рН 7,5 ± 0,5. В одной из наших работ было показано, что мутПурНФаза, как и ПирНФаза, проявляет достаточную удельную активность для катализа и реакций синтеза модифицированных нуклеозидов при 80 °С [10]. Как следует из данных, представленных на рисунке, наибольшую каталитическую активность мутПурНФаза проявляет при значениях рН реакционной среды 7,5 ± 0,5.

В качестве соединений для исследования субстратной специфичности ПирНФазы выбраны такие природные и модифицированные пиримидиновые нуклеозиды, как 2'-дезоксирибофуранозилурацил (2'-dUrd), 3'-дезоксирибофуранозилурацил (3'-dUrd), β-D-арабинофуранозилурацил



Влияние pH реакционной среды на активность мутПирНФазы *T. thermophilus*

(ara-U), β -D-арабинофуранозилцитозин (ara-C), β -D-рибофуранозилцитозин (Cyd), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозилцитозин (3'-F-3'-dCyd), 3'-дезоксирибофуранозилцитозин (3'-dCyd), 2'-фтор-2'-дезоксирибофуранозилцитозин (2'-F-2'-dCyd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозилурацил (3'-F-2',3'-ddUrd), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозилурацил (3'-F-3'-dUrd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозилтимин (3'-F-2',3'-ddThd), 3'-азидо-2',3'-дидезоксирибофуранозилтимин (3'-N₃-2',3'-ddThd), 2'-фтор-2'-дезоксирибофуранозилурацил (2'-F-2'-dUrd), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозилтимин (3'-F-3'-dThd), 2'-фтор-2'-дезоксиарабинофуранозилурацил (2'-F-2'-daraU), 3'-фтор-3'-дезоксисилофуранозилурацил (3'-F-3'-dxyloU), 3'-дезоксиарабинофуранозилурацил (3'-daraU), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозил-5-фторурацил (3'-F-3'-d-5F-Urd), 3'-фтор-5'-хлор-3',5'-дидезоксирибофуранозил-5-фторурацил (3'-F-5'-Cl-3',5'-dd-5F-Urd), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозил-6-азаурацил (3'-F-3'-d-6-Aza-Urd). Указанные соединения были также исследованы в качестве субстратов для ТФазы и УРФазы *E. coli*, полученных как описано в публикациях [11, 12].

Результаты исследования фосфорилиза пиримидиновых нуклеозидов изучаемыми ферментами суммированы в табл. 2. Как следует из представленных данных, производные рибонуклеозиды цитозина с атомом фтора в 2'- или 3'-положениях углеводной части, а также 3'-dCyd, Cyd и ara-C не являются субстратами для мутПирНФазы, ТФазы и УРФазы и не могут быть использованы в энзиматических превращениях под действием этих биокатализаторов.

Исследованные нуклеозиды урацила, модифицированные в углеводном фрагменте и 5(6)-положениях гетерооснования, также не являются субстратами для всех изученных фосфорилиз.

Наилучшими субстратами мутПирНФазы являются 3'- и 2'-дезоксирибонуклеозиды урацила и 2'-dThd.

Из всех указанных соединений УРФаза способна катализировать фосфоролитическое расщепление 3'- и 2'-дезоксуридиновых производных, а также ara-U, но их фосфорилиз в присутствии этого фермента происходит с намного более низкой эффективностью по сравнению с мутПирНФазой. Стоит отметить, что ТФаза среди изученных в работе ферментов обладает наиболее узкой субстратной специфичностью и способна катализировать фосфорилиз только 2'-dThd и 2'-dUrd.

Особый интерес вызывает способность мутПирНФазы использовать в качестве субстратов монофторзамещенные нуклеозиды урацила и тимина с атомом фтора в 2'- или 3'-положении углеводного фрагмента – 3'-F-3'-dUrd/dThd, 2'-F-2'-d-araU, 2'-F-2'-dUrd, 3'-F-2',3'-ddUrd/ddThd, 3'-F-3'-d-xyloU. Однако фосфорилиз нуклеозидов, содержащих атом фтора в углеводной части молекулы в указанных положениях, протекает значительно медленнее, чем реакция с их природными аналогами.

Энзиматический синтез новых и известных пуриновых модифицированных нуклеозидов, большинство из которых получены ранее только химическими способами, осуществляли из пуриновых нуклеозидов [3'-фтор-3'-деоксиаденозин (3'-F-3'-dAdo)], пиримидиновых нуклеозидов (3'-F-3'-dUrd, 3'-F-2',3'-ddThd, 3'-F-3'-dThd, 2'-F-2'-daraU, 3'-F-3'-dxyloU), пуриновых гетероцикли-

Таблица 2. Субстратная специфичность ПирНФазы *T. thermophilus*, ТФазы и УРФазы *E. coli*

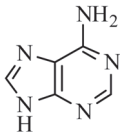
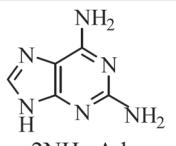
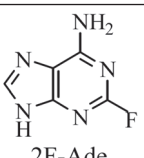
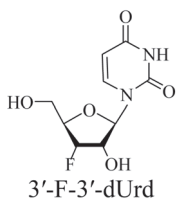
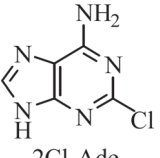
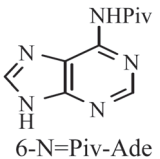
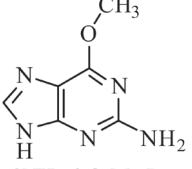
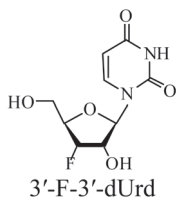
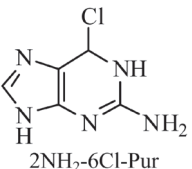
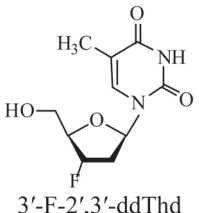
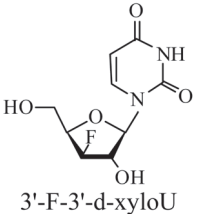
Субстрат	Степень фосфоролита, %		
	ПирНФазой	УРФазой	ТФазой
2'-dUrd	100,0	92,4 ± 3,4	24,1 ± 1,7
3'-dUrd	89,0 ± 3,0	33,7 ± 2,9	–
2'-dThd	100,0	–	32,1 ± 1,9
Ara-U	55,0 ± 2,5	47,5 ± 2,3	–
Ara-C	–	–	–
Cyd	–	–	–
3'-F-3-dCyd	–	–	–
3'-dCyd	–	–	–
2'-F-2'-dCyd	–	–	–
3'-F-2',3'-ddUrd	54,2 ± 2,4	–	–
3'-F-3'-dUrd	48,3 ± 2,5	–	–
3'-F-2'3'-ddThd	60,8 ± 2,7	–	–
3'-N ₃ 2'3'-ddThd	–	–	–
2'-F-2'dUrd	46,3 ± 2,3	–	–
3'-F-3'-dThd	41,2 ± 2,1	–	–
2'-F-2'-d-araU	44,3 ± 2,2	–	–
3'-F-3'-d-xyloU	8,0 ± 1	–	–
3'-d-araU	–	–	–
3'-F-3'-d-5FUrd	–	–	–
3'-F-5'-Cl-3',5'-dd-5FUrd	–	–	–
3'-F-3'-d-6-AzaUrd	–	–	–

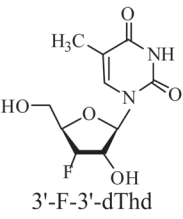
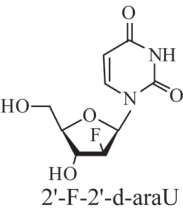
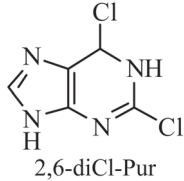
ческих оснований [2-хлораденин (2Cl-Ade), 2-фтораденин (2F-Ade), 6-пивалоиладенин (6-N=Piv-Ade), 2-аминоаденин (2NH₂-Ade), 2-амино-6-хлорпуридин (2NH₂-6Cl-Pur), 2,6-дихлорпуридин (2,6-diCl-Pur), 2-амино-6-метоксипуридин (2NH₂-6-O-Me-Pur), Ade], пиримидиновых азотистых оснований [5-бромурацил (5-BrU), 5-йодурацил (5-IU), 5-аминоурацил (5-NH₂U), 5-пропилурацил (5-propU), 5-бутилурацил (5-butU), 5-октилурацил (5-octU), 5-фторурацил (5-FU)] в присутствии неорганического фосфата и рекомбинантных мутПирНФазы *T. thermophilus*, мутПурНФазы *T. thermophilus* и ПурНФазы *E. coli* в качестве биокатализаторов реакций фосфоролита нуклеозидов стереоселективного гликозилирования гетерооснований. Данные о компонентах реакционных сред и конечном выходе целевых продуктов представлены в табл. 3, 4.

В результате проведения реакций получены пуриновые и пиримидиновые модифицированные нуклеозиды, такие как 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозиладенин (3'-F-3'-dAdo), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозил-2-аминоаденин (3'-F-3'-d-2NH₂-Ado), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозилгуанин (3'-F-3'-dGuo), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-2-фтораденин (3'-F-2',3'-dd-2F-Ado), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-2-хлораденин (3'-F-2',3'-dd-2Cl-Ado), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозиладенин (3'-F-2',3'-ddAdo), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозил-2-фтораденин (3'-F-3'-d-2F-Ado), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозил-2-хлораденин (3'-F-3'-d-2Cl-Ado), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-2-аминоаденин (3'-F-2',3'-dd-2NH₂-Ado), 3'-фтор-2',3'-дезоксирибофуранозилгуанин (3'-F-2',3'-ddGuo), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозил-6-пивалоиладенин (3'-F-3'-d-6-N=Piv-Ado), 3'-фтор-3'-дезоксирибофуранозил-2-амино-6-метоксипуридин (3'-F-3'-d-2-NH₂-6-O-Me-PurR), 2'-фтор-2'-дезоксисарабинофуранозил-2-хлораденин (2'-F-2'-d-2Cl-araA), 2'-фтор-2'-дезоксисарабинофуранозил-2,6-дихлорпуридин (2'-F-2'-d-2,6-diCl-araPur), 3'-дезоксисарабинофуранозил-2-фтораденин (3'-d-ara-2F-Ade), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-2-амино-6-хлорпуридин (3'-F-2',3'-dd-2NH₂-6Cl-PurR), 2'-дезоксирибофуранозил-5-фторурацил (2'-d-5-FUrd).

Как следует из данных, представленных в табл. 3, ПурНФаза *E. coli* способна катализировать образование ряда 3'- и 2'-фтор-замещенных 2'-дезоксидеокси и 2',3'-дидезокси-пуриновых нуклеозидов, некоторые из которых содержат заместители различной природы во втором и шестом положениях гетероцикла. Так, наибольший выход целевых соединений наблюдается в реакциях

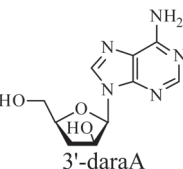
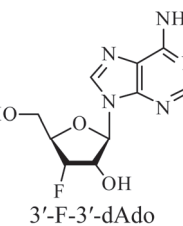
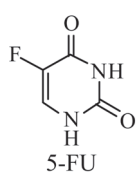
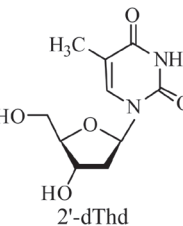
Таблица 3. Ферментативный синтез пуриновых модифицированных нуклеозидов с использованием ПурНФазы *T. thermophilus*

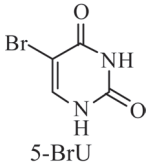
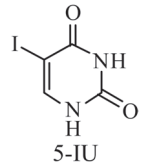
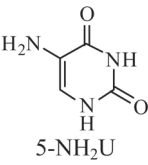
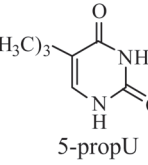
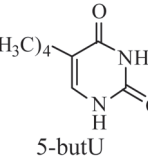
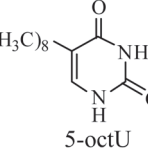
Акцептор	Донор	Продукт	Время, ч	Выход продукта, мол. %	
				ПурНФаза <i>E. coli</i>	МутПурНФаза <i>T. thermophilus</i>
 Ade		3'-F-3'-dAdo	72	55 ± 2	–
 2NH ₂ -Ade		3'-F-3'-d-2NH ₂ -Ado*	72	63 ± 3	–
 2F-Ade	 3'-F-3'-dUrd	3'-F-3'-d-2F-Ado	96	53 ± 2	–
 2Cl-Ade		3'-F-3'-d-2Cl-Ado	96	52 ± 2	–
 6-N=Piv-Ade		3'-F-3'-d-6-N=Piv-Ado	48	40 ± 4	–
 2NH ₂ -6-O-Me-Pur	 3'-F-3'-dUrd	3'-F-3'-d-2-NH ₂ -6-O-Me-PurR	48	–	–
2F-Ade		3'-F-2',3'-dd-2F-Ado	96	64 ± 2	37 ± 3
2Cl-Ade		3'-F-2',3'-dd-2Cl-Ado	96	62 ± 3	38 ± 3
 2NH ₂ -6Cl-Pur	 3'-F-2',3'-ddThd	3'-F-2',3'-dd-2NH ₂ -6Cl-PurR	120	32 ± 3	–
2NH ₂ -Ade		3'-F-2',3'-dd-2NH ₂ -Ado*	96	85 ± 3	27 ± 2
Ade		3'-F-2',3'-ddAdo	96	73 ± 3	22 ± 2
Ade		3'-F-3'-d-xyloA	120	–	–
2NH ₂ -Ade	 3'-F-3'-d-xyloU	2NH ₂ -3'-F-3'-d-xyloA	120	–	–

Акцептор	Донор	Продукт	Время, ч	Выход продукта, мол. %	
				ПурНФаза <i>E. coli</i>	МутПурНФаза <i>T. thermophilus</i>
Ade	 3'-F-3'-dThd	3'-F-3'-dAdo	120	44 ± 3	–
2NH ₂ -Ade		3'-F-3'-d-2NH ₂ -Ado	120	51 ± 3	–
2Cl-Ade	 2'-F-2'-d-araU	2'-F-2'-d-2Cl-araA	72	22 ± 2	19 ± 2
 2,6-diCl-Pur		2'-F-2'-d-2,6-diCl-araPur	72	21 ± 2	21 ± 2

*3'-F-3'-d-2NH₂-Ado и 3'-F-2',3'-dd-2NH₂-Ado были трансформированы в 3'-F-3'-dGuo и 3'-F-2',3'-ddGuo соответственно (с количественным выходом) путем внесения в реакционную смесь рекомбинантной аденозиндезаминазы *E. coli* [13].

Таблица 4. Ферментативный синтез пуриновых и пиримидиновых модифицированных нуклеозидов

Акцептор	Донор	Продукт	Время, ч	Фермент	Выход продукта, мол. %
2F-Ade	 3'-daraA	3'-d-ara-2F-Ade	48	ПурНФаза <i>E. coli</i>	30 ± 2
				МутПурНФаза <i>T. thermophilus</i>	–
6-N=Piv-Ade	 3'-F-3'-dAdo	3'-F-3'-d-6-N=Piv-Ado	72	ПурНФаза <i>E. coli</i>	35 ± 3
				МутПурНФаза <i>T. thermophilus</i>	–
 5-FU	 2'-dThd	2'-d-5-FUrd	0,5	ПирНФаза <i>T. thermophilus</i>	62 ± 2
5-FU	3'-F-2',3'-ddThd	3'-F-2',3'-dd-5-FUrd	48		–

Акцептор	Донор	Продукт	Время, ч	Фермент	Выход продукта, мол. %
 5-BrU	3'-F-2',3'-ddThd	3'-F-2',3'-dd-5-BrUrd	48	ПурНФаза <i>T. thermophilus</i>	—
 5-IU		3'-F-2',3'-dd-5-IUrd	48		—
 5-NH ₂ U		3'-F-2',3'-dd-5-NH ₂ Urd	48		—
 5-propU		3'-F-2',3'-dd-5-propUrd	48		—
 5-butU	3'-F-2',3'-ddThd	3'-F-2',3'-dd-5-butUrd	48		—
 5-octU		3'-F-2',3'-dd-5-octUrd	48		—

с 3'-F-2',3'-ddThd и модифицированными производными аденина (60–85 мол. %), что предположительно может быть объяснено низкой фосфоролитической активностью ПурНФазы в отношении образованных продуктов ввиду стабилизации гликозидной связи молекул этих нуклеозидов в данной конфигурации. Выход аналогичных соединений, где в качестве углеводного компонента выступает 3-фтор-3-деоксирибоза, составляет 45–55 мол. %, а соединений, где углеводный компонент представлен 2-фтор-2-деоксиарабинозой, – 20–22 мол. %.

В большинстве реакций с участием мутПурНФазы *T. thermophilus* не наблюдается образования целевых соединений, кроме тех, где в качестве субстратов выступали 3'-F-2',3'-ddThd, 2'-F-2'-daraU и 2'-галогензамещенные производные аденина. Несмотря на то что фермент приобрел способность катализировать образование 6-NH₂-пуриновых модифицированных нуклеозидов, выход продуктов в этих реакциях в 2–3 раза ниже, чем при использовании ПурНФазы *E. coli*.

В реакционных смесях, где в качестве субстратов выступали только пиримидиновые азотистые основания и нуклеозиды, предполагалось получить такие соединения, как 2'-дезоксирибофуранозил-5-фторурацил (2'-d-5-FUrd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-5-фторурацил (3'-F-2',3'-dd-5-FUrd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-5-бромурацил (3'-F-2',3'-dd-5-BrUrd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-5-йодурацил (3'-F-2',3'-dd-5-IUrd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-5-аминоурацил (3'-F-2',3'-dd-5-NH₂Urd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-5-пропилурацил (3'-F-2',3'-dd-5-propUrd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-5-бутилурацил (3'-F-2',3'-dd-5-butUrd), 3'-фтор-2',3'-дидезоксирибофуранозил-5-октилурацил (3'-F-2',3'-dd-5-octUrd). Результаты, полученные в ходе проведения реакций, представлены в табл. 4.

С учетом экспериментов по изучению субстратной специфичности мутПирНФазы, а также исходя из данных табл. 4, следует, что мутПирНФаза не способна катализировать как фосфоролитическое расщепление пиримидиновых нуклеозидов, содержащих заместители различной природы в гетероцикле и атом фтора в 3'-положении углеводного фрагмента, так и синтез соединений схожей природы. Напротив, образование 2'-d-5F-Urd из природного 2'-dThd и 5-FU происходит за короткий промежуток времени, а выход конечного продукта составляет 60 %.

Все соединения, синтезированные в ходе работы и представленные в табл. 3, 4, кроме 3'-F-2',3'-ddGuo и 2'-d-5F-Urd, впервые получены с использованием ферментов. Конечный выход указанных соединений в ходе их получения химическими методами в большинстве случаев не превышает 25–30 %, что обуславливает эффективность продемонстрированного ферментативного подхода.

Заключение. Таким образом, впервые с использованием ферментов синтезированы такие фторированные нуклеозиды, как 3'-F-3'-dAdo, 3'-F-3'-d-2NH₂-Ado, 3'-F-3'-dGuo, 3'-F-2',3'-dd-2F-Ado, 3'-F-2',3'-dd-2Cl-Ado, 3'-F-2',3'-ddAdo, 3'-F-3'-d-2F-Ado, 3'-F-3'-d-2Cl-Ado, 3'-F-2',3'-dd-2NH₂-Ado, 3'-F-2',3'-ddGuo, 3'-F-3'-d-6-N=Piv-Ado, 3'-F-3'-d-2-NH₂-6-O-Me-PurR, 2'-F-2'-d-2Cl-araA, 2'-F-2'-d-2,6-diCl-araPur, 3'-d-ara-2F-Ade, 3'-F-2',3'-dd-2NH₂-6Cl-PurR. Кроме того, продемонстрирована возможность ферментативного фосфоролитического расщепления 3'(2')-F-dUrd/dThd, 3'-F-2',3'-ddUrd/ddThd, 3'-F-3'-dxylU. Также впервые показана возможность использования мутПирНФазы *T. thermophilus* для ферментативного синтеза 2'-d-5F-Urd.

Полученные результаты сравнительного исследования субстратной специфичности рекомбинантных пиримидин- и пурин-нуклеозидфосфорилаз и ферментативного синтеза некоторых модифицированных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов с использованием биокатализаторов могут лечь в основу разработки препаративных технологий биокаталитического получения фармакологически перспективных соединений этого класса.

Литература

1. Mikhailopulo I. A., Miroshnikov A. I. // Mendeleev Commun. 2011. Vol. 21. P. 57–68.
2. Береснев А. И., Квач С. В., Сивец Г. Г. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 3. С. 73–77.
3. Beresnev A. I., Kvach S. V., Sivets G. G. et al. // 6th Central Eur. Conf., Trieste (Italy), September 10–13, 2013. Trieste, 2013. P. 12.
4. Szeker K., Zhou X., Schwab T. et al. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2012. Vol. 84. P. 27–34.
5. Zhou X., Szeker K., Janocha B. et al. // FEBS J. 2013. Vol. 280, N 6. P. 1475–1490.
6. Almendros M., Berenguer J., Sinisterra J.-V. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. Vol. 78, N 9. P. 3128–3135.
7. Береснев А. И., Квач С. В., Сивец Г. Г. и др. // Микробная биотехнология: фонд. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. 2013. Т. 5. С. 19–29.
8. Квач С. В., Шахбазов А. В., Зинченко А. И. и др. // Микробная биотехнология: фонд. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. 2007. Т. 1. С. 117–124.
9. Sgarrella F., Frassetto L., Allegrini S. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1770, N 10. P. 1498–1505.
10. Береснев А. И., Квач С. В., Зинченко А. И. // Микробные биотехнологии: фонд. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. 2014. Т. 6. С. 26–36.
11. Квач С. В., Ерошевская Л. А., Шахбазов А. В. и др. // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 2–6 июня 2008 г. Минск, 2008. С. 271–273.
12. Квач С. В., Ерошевская Л. А., Зинченко А. И. // Микробные биотехнологии: фонд. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. 2009. Т. 2. С. 148–155.
13. Квач С. В., Ерошевская Л. А., Зинченко А. И. // Микробные биотехнологии: фонд. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. 2007. Т. 1. С. 125–130.

USE OF FERMENTATIVE TRANSGLYCOSYLATION FOR PREPARATION OF FLUORO NUCLEOSIDES

Summary

The possibility of enzymatic phosphorolysis of 3'(2')-fluoro-deoxyribofuranosyl uridine/deoxyribofuranosyl thymidine 3'-fluoro-2',3'-dideoxyribofuranosyl uridine/dideoxyribofuranosyl thymidine, 3'-fluoro-3'-deoxyxylofuranosyl uridine was demonstrated. Using the corresponding enzymes such nucleosides as 3'-fluoro-3'-deoxyribofuranosyl adenine, 3'-fluoro-3'-deoxyribofuranosyl-2-aminoadenine, 3'-fluoro-3'-deoxyribofuranosyl guanine, 3'-fluoro-2',3'-dideoxyribofuranosyl-2-fluoroadenine, 3'-fluoro-2',3'-dideoxyribofuranosyl-2-chloroadenine etc. were produced. 2'-deoxyribofuranosyl-5-fluorouracil synthesis catalyzed by mutant pyrimidine nucleoside phosphorylase *T. thermophilus* has been presented.