

ISSN 0002-3558 (print)

УДК 579.66+577.27

Поступила в редакцию 21.06.2016

Received 21.06.2016

**А. И. Береснев, А. Н. Рымко, Л. А. Ерошевская, С. В. Квач, Е. И. Квасюк, А. И. Зинченко***Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***СИНТЕЗ ФЛУДАРАБИН-5'-МОНОФОСФАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
БАКТЕРИАЛЬНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ**

Разработана и экспериментально обоснована схема ферментативного получения флударабин-5'-монофосфата из 2-фтораденина и циклоцитидина как донора арабинозного фрагмента. При этом донором фосфатной группы служил ацетилфосфат. В качестве биокатализаторов применяли цитидиндезаминазу, уридинфосфорилазу, пуридиннуклеозидфосфорилазу и дезоксинуклеозидкиназу, выделенные из клеток ранее сконструированных штаммов *Escherichia coli*. Полученный препарат флударабин-5'-монофосфата планируется использовать в качестве пролекарства в разрабатываемом ферментативном пролекарственном подходе к терапии рака.

*Ключевые слова:* флударабин, флударабин-5'-монофосфат, рекомбинантный штамм, *Escherichia coli*, ферментативный катализ, модифицированный нуклеозид.

**A. I. Beresnev, A. N. Rymko, L. A. Eroshevskaya, S. V. Kvach, E. I. Kvasyuk, A. I. Zinchenko***Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***SYNTHESIS OF FLUDARABINE 5'-MONOPHOSPHATE  
USING BACTERIAL RECOMBINANT ENZYMES**

The scheme of enzymatic preparation of fludarabine-5'-monophosphate from 2-fluoroadenine and cyclocytidine as a donor of arabinose fragment was developed and experimentally proved. Acetylphosphate was used as a donor of phosphate group. Cytidine deaminase, uridine phosphorylase, purine nucleoside phosphorylase and deoxynucleoside kinase recovered from earlier designed strains of *Escherichia coli* were used as biocatalysts. The synthesized fludarabine-5'-monophosphate is planned for using as a pro-drug in enzymatic pro-medicinal approach to therapy of cancer.

*Keywords:* fludarabine, fludarabine 5'-monophosphate, recombinant strain, *Escherichia coli*, enzymatic catalysis, modified nucleoside.

**Введение.** В последние десятилетия наблюдается значительный прогресс в диагностике, хирургии и радиотерапии рака. В то же время применение химиотерапии при многих видах рака нельзя признать удовлетворительным. Основной проблемой при проведении химиотерапии остаются не только высокая токсичность препаратов, но и многочисленные побочные эффекты после их длительного применения. Такую ситуацию принято объяснять отсутствием у данных препаратов адекватной специфичности в отношении раковых клеток. Поэтому поиск более специфичных мишеней, экспрессирующихся в опухолях, до настоящего времени остается одним из приоритетных направлений в онкофармакологии.

В пионерских исследованиях [1, 2] установлено, что на внешней стороне клеток, относящихся к трем разным типам рака, имеется локализация фосфатидилсерина. Позднее, в 2002 г. [3], повышенное содержание анионных фосфолипидов выявлено также на поверхности опухолевых кровеносных сосудов. Наконец, S. Riedl с соавт. [4], расширив число исследуемых типов опухолевых клеток, включая метастазы, отчетливо продемонстрировали, что расположение фосфатидилсерина на внешней стороне бислоя плазматической мембраны представляет собой общий феномен для раковых клеток, а также для клеток, образующих опухолевые сосуды и метастазы.

Таким образом, использование фосфатидилсерина как маркера, дающее возможность различать раковые и нормальные клетки, позволит разработать новый метод лечения онкологических заболеваний, который существенно дополнит, а в перспективе даже заменит стандартную химиотерапию.

Следует отметить, что наличие специфического маркера в составе опухолевой клетки – необходимое, но недостаточное условие для осуществления направленной доставки противоопухо-

левого препарата только в эти клетки-мишени. Кроме «адреса» необходим также и «почтальон» – транспортер, способный доставить препарат в опухоль в интактном виде. В настоящее время известно, что одним из таких транспортеров может выступать плацентарный человеческий белок аннексин А5.

Аннексин А5 – член семейства кальций-зависимых белков, который высокоаффинно связывается преимущественно с фосфатидилсеринем [5, 6]. Такое специфическое их взаимодействие позволяет предположить, что данный белок может быть использован в качестве средства адресной доставки в микроокружение опухолевой клетки различных противоопухолевых соединений (в том числе ферментов), предварительно связанных с аннексином А5 [7].

Одним из перспективных противоопухолевых препаратов нового поколения является флударабин-5'-монофосфат (синонимы: 9-β-D-арабинофуранозил-2-фторадеинин-5'-монофосфат, 2-F-ara-AMP). Этот модифицированный нуклеотид, обладающий цитотоксическими свойствами, используется в медицине в качестве лекарственного средства для терапии хронической лимфоцитарной лейкемии [8]. Однако более широкому применению препарата препятствует его токсичность в отношении нормальных клеток организма, приводящая к поражению нервной системы [9].

Известно, что в ряде случаев проблема системной токсичности может быть решена путем локальной активации так называемых пролекарств. Так, в научной литературе описан многообещающий подход к терапии злокачественных новообразований, основанный на введении в опухолевые клетки «генов самоубийства», кодирующих ферменты, которые трансформируют введенные системно пролекарства (инертные или относительно терапевтически инертные химические соединения) в летальные для клетки субстанции [10].

К числу наиболее изученных ферментов, кодируемых «генами самоубийства», следует отнести кодируемую геном *deoD Escherichia coli* пуриноклеозидфосфорилазу (ПНФазу), которая способна превращать умеренно токсичное соединение флударабин (синонимы: арабинофуранозил-2-фторадеинин, 2-F-ara-A) в губительный для клетки 2-фторадеинин (2-F-Ade) [11].

Основной проблемой, препятствующей применению суицидной генотерапии в клинической практике, является низкая эффективность доставки терапевтических генов (в том числе гена ПНФазы) в опухолевые клетки [12].

В 2013 г. был предложен альтернативный описанному выше вариант использования флударабина в качестве пролекарства. В частности, J. J. Kraiss и соавт. [13] сконструировали штамм *E. coli*, продуцирующий химерный белок, состоящий из гомологичной ПНФазы и человеческого аннексина А5. Этот белок (обозначенный как ПНФаза-аннексин) обладает способностью специфически связываться с фосфатидилсеринем и эффективно отщеплять от пуриновых нуклеозидов азотистые основания. Предлагаемый авторами ферментативный пролекарственный подход был успешно реализован в эксперименте с культурой клеток рака молочной железы человека, который завершился спустя неделю гибелью 80 % раковых клеток. Использованный авторами подход к ферментной пролекарственной терапии рака с целью превращения пролекарства в его активную форму, которая непосредственно и вызывает ингибирование биосинтеза опухолевых ДНК, РНК и белка, предполагает следующую последовательность развития событий (рис. 1):

1) после введения пациенту химерного белка происходит накопление последнего в опухоли в результате таргетирования аннексином А5 раковых клеток и сосудистой сети опухоли;

2) после введения пациенту безопасной дозы флударабин-5'-монофосфата последний под действием фосфатазы крови тут же трансформируется в флударабин [14];

3) на поверхности опухолевых клеток под действием ПНФазы начинается протекать реакция расщепления флударабина с образованием 2-F-Ade;

4) легко диффундирующая молекула 2-F-Ade входит в клетку и ингибирует синтез белка, РНК и ДНК [11].

Здесь важно подчеркнуть следующее. Во-первых, флударабин не является субстратом человеческой ПНФазы [15], поэтому его конверсии в 2-F-Ade в нормальных тканях не происходит. Во-вторых, токсичность 2-F-Ade в отношении раковых клеток проявляется при концентрации на несколько порядков меньше, чем требуется для аналогичного эффекта при использовании флударабина [16], что допускает системное использование флударабин-5'-монофосфата в дозах,

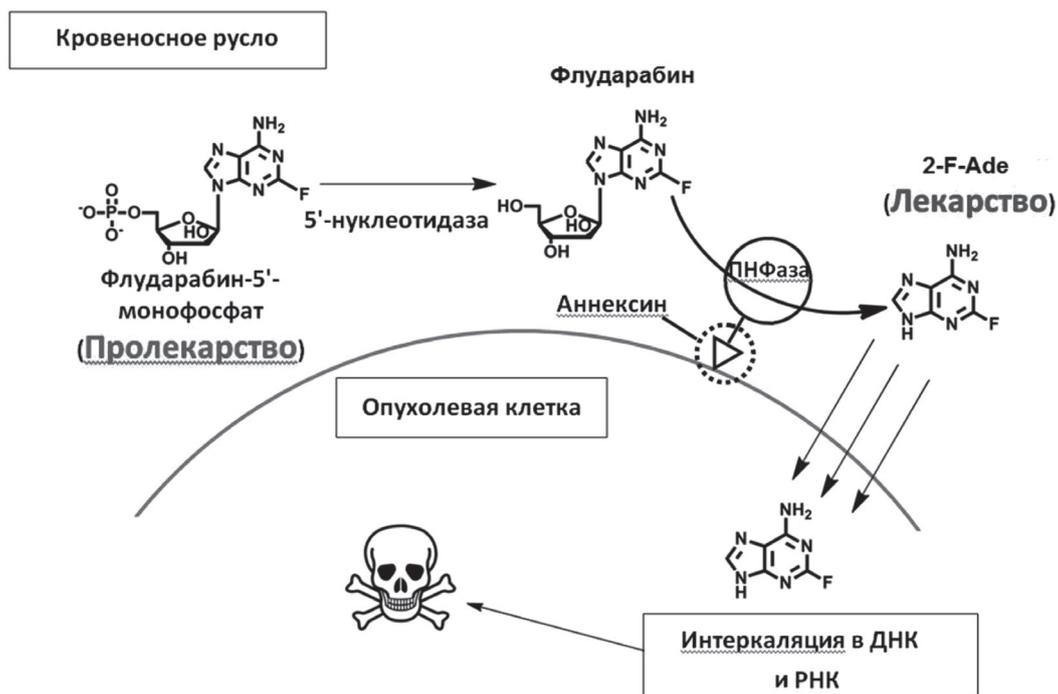


Рис. 1. Схематическое представление ферментной пролекарственной терапии рака

Fig. 1. Schematic presentation of enzymatic prodrug cancer therapy

значительно ниже проблемных уровней. В-третьих, образующийся в результате активации пролекарства 2-F-Ade активен не только против пролиферирующих, но и против неделящихся опухолевых клеток и, таким образом, в отличие от других противоопухолевых агентов, убивает и молчащие (индолентные) опухоли.

Для создания отечественной пролекарственной ферментной технологии, аналогичной описанной выше, необходимо решить проблему доступности пролекарства – флударабин-5'-монофосфата, а также сконструировать штамм-продуцент химерного белка ПНФаза-аннексин А5.

Цель настоящего исследования – экспериментальное обоснование возможности использования отечественных рекомбинантных ферментов для получения флударабин-5'-монофосфата, способного служить пролекарством в разрабатываемом ферментативном пролекарственном подходе к терапии рака.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали ранее полученные в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси рекомбинантные ферменты нуклеинового обмена *E. coli*: цитидиндезаминазу (ЦДазу) [17], уридиндифосфорилазу (УРФазу) [18], ПНФазу [19], ацетаткиназу (АцК) [20], а также дезоксиинуклеозидкиназу (дНК) *Drosophila melanogaster* [21].

Для получения 1-(β-D-арабинофуранозил)-цитозина (ага-С) к 1 л охлажденного до 4 °С 0,5 М раствора 2,2'-ангидро-(1-β-D-арабинофуранозил)-цитозина (сусло-С) фирмы Sigma-Aldrich по каплям приливали 525 мл 2 М КОН в течение 5 ч для поддержания уровня рН раствора в диапазоне 10–10,5. Затем смесь осветляли, пропуская ее через бумажный фильтр.

Для синтеза 1-(β-D-арабинофуранозил)-урацила (ага-У) к полученному на предыдущей стадии фильтрату добавляли 2,2 мл 85 %-ного  $H_3PO_4$  и 30 ед/мл ЦДазы. Смесь инкубировали в течение 24 ч при 40 °С, после чего температуру поднимали до 60 °С и продолжали инкубацию в течение 1 ч. По завершении реакции (протекающей с количественным выходом) реакцию смесь упаривали в роторном испарителе (при 60 °С) до момента начала кристаллизации ага-У и оставляли на ночь при 4 °С. Затем образовавшийся осадок отделяли путем фильтрования и высушивали в суховоздушном шкафу при 70 °С. Получали около 92 г (380 ммоль) ага-У с выходом 75 % в расчете на сусло-С.

При проведении ферментативного синтеза флударабина в реакционную смесь объемом 150 мл, состоящую из 0,1 М 2-F-Ade, 0,2 М ага-U, 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,0), вносили 50 ед/мл УРФазы и 100 ед/мл ПНФазы, после чего ее инкубировали при 50 °С в течение 72 ч при постоянном помешивании. По окончании реакции к смеси добавляли 150 мл дистиллированной воды, нагревали до 90 °С и оставляли охлаждаться при 4 °С для кристаллизации флударабина. Полученный осадок собирали путем фильтрования и растворяли в 250 мл воды, после чего повторно проводили процедуры кристаллизации и фильтрации с последующей сушкой целевого продукта в термостате при 60 °С. Получали 3,74 г (13,1 ммоль) флударабина с 87 %-ным выходом в расчете на 2-F-Ade. Выход в расчете на введенный в реакцию ага-U составлял 43,5 %.

Для получения флударабин-5'-монофосфата реакционную смесь объемом 100 мл, содержащую 0,1 М флударабин, 0,1 М ацетилфосфат (AcP) фирмы Sigma-Aldrich, 50 мМ Трис-HCl-буфер (рН 8,0), 1 ед/мл АцК и 1 ед/мл дНК, инкубировали в течение 4 ч при 30 °С. После окончания реакции полученный флударабин-5'-монофосфат выделяли с использованием ионообменной хроматографии на смоле Dowex 50×4 (Sigma, США). Элюцию флударабин-5'-монофосфата с сорбента осуществляли дистиллированной водой. Элюат упаривали досуха в роторном испарителе при температуре 50 °С. Получали около 4,24 г (12,3 ммоль) флударабин-5'-монофосфата, что соответствует 82 %-ному выходу в расчете на 2-F-Ade и 40,9 %-ному выходу в расчете на введенный в реакцию ага-U.

Накопление целевых продуктов в ходе биокаталитических синтезов контролировали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках Silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck, Германия). Расположение пятен субстратов и продуктов на хроматографической пластине регистрировали в ультрафиолетовом свете, после чего вещества из пятен элюировали в 10 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0). Концентрацию продуктов в элюатах определяли с помощью спектрофотометрии, используя известные коэффициенты молярной экстинкции. Спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрофотометре UV-1202 фирмы Shimadzu (Япония). ЯМР-анализ проводили на спектрометре Avance-500-DRX (Bruker, Германия). Чистоту синтезированного флударабин-5'-монофосфата анализировали на хроматографе Nexera SR (Shimadzu, Япония), используя ВЭЖХ.

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

**Результаты и их обсуждение.** Общая схема получения флударабин-5'-монофосфата с использованием химических и ферментативных процессов представлена на рис. 2.

На начальном этапе работы проводили химическую трансформацию cyclo-C в ага-C в течение 5–6 ч. Синтезированный на первой стадии ага-C способен выступать в качестве субстрата для ЦДазы, которая осуществляет замещение NH<sub>2</sub>-группы в четвертом положении азотистого гетероцикла на кетогруппу с образованием ага-U – донора углеводного компонента в реакциях трансгликозилирования под действием нуклеозидфосфорилаз. Процесс дезаминирования ага-C является необратимым, что обусловлено образованием в ходе протекания реакции газообразного аммиака, который самопроизвольно удаляется из реакционной смеси ввиду его высокой летучести, сдвигая тем самым равновесие реакции в сторону образования целевого продукта. Таким образом, конечный выход ага-U в расчете на внесенный в реакционную среду ага-C оказался близок к 100 %.

Основным этапом предложенной нами схемы получения флударабин-5'-монофосфата является стадия ферментативного трансгликозилирования, которая заключается в фосфоролитическом расщеплении под действием УРФазы ага-U с образованием арабинозо-1-фосфата, который в присутствии ПНФазы переносится на молекулу 2-F-Ade с образованием флударабина. На рис. 3 представлена зависимость накопления флударабина от времени протекания реакции.

Как следует из рис. 3, синтез целевого продукта длится около 80 ч, что связано с крайне низкой растворимостью исходного субстрата – 2-F-Ade. Выход флударабина по окончании реакции в расчете на внесенный 2-F-Ade составляет 96–98 %. Такой высокий выход продукта обратимой реакции обуславливается повышенной стабильностью 9-1'-гликозидной связи ввиду наличия атома фтора во втором положении азотистого гетероцикла и арабино-конфигурации углеводного компонента [22]. Данные особенности молекулы целевого продукта должны значительно замед-

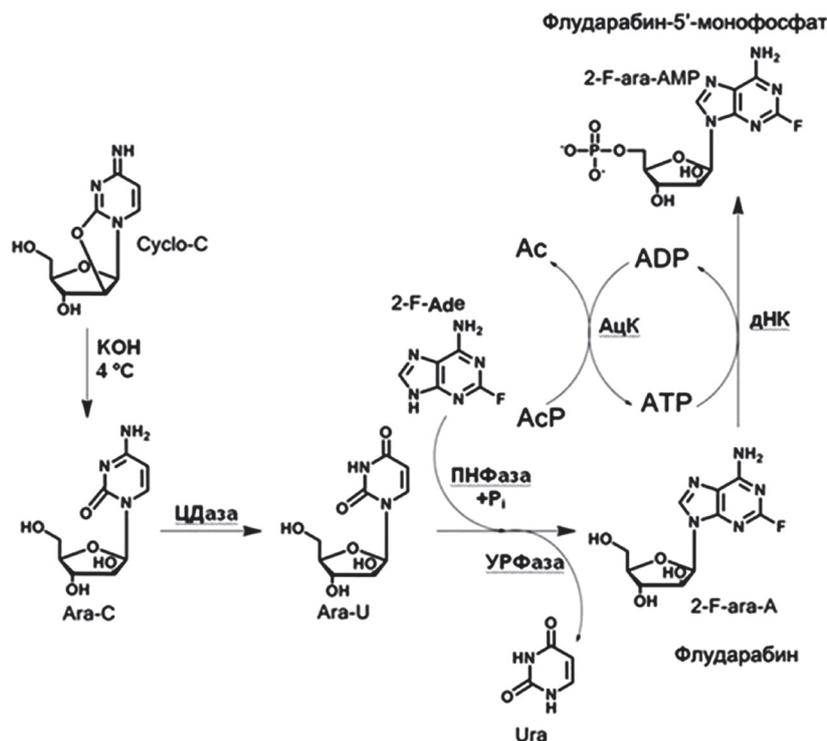


Рис. 2. Схема синтеза флударабин-5'-монофосфата с использованием бактериальных рекомбинантных ферментов  
 Fig. 2. Scheme of synthesis of fludarabine-5'-monophosphate using bacterial recombinant enzymes

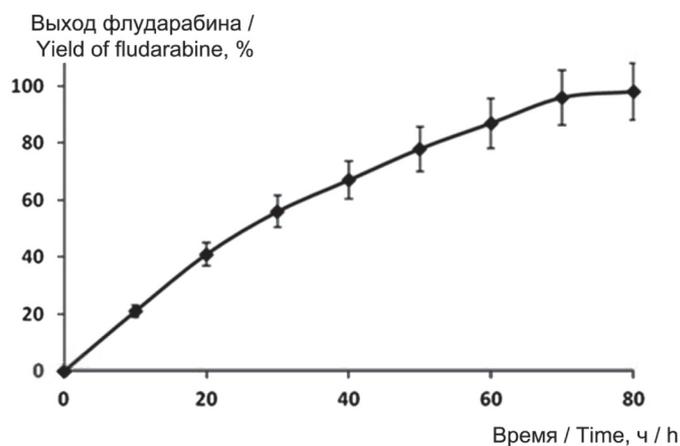


Рис. 3. Динамика накопления флударабина в реакционной смеси  
 Fig. 3. Dynamics of fludarabine accumulation in reaction mixture

лять обратный процесс ее фосфолиза. Кроме того, образующийся в процессе синтеза флударабин обладает низкой растворимостью и в ходе реакции выпадает в осадок, что дополнительно приводит к смещению равновесия реакции в сторону образования целевого продукта.

Образовавшийся осадок флударабина собирали путем фильтрования и подвергали 5'-монофосфорилированию с помощью дНК *D. melanogaster*. В качестве источника фосфатной группы использовали АТФ, который в ходе реакции превращался в АДФ.

В связи с тем, что АТФ является сравнительно дорогостоящим соединением и его использование в препаративном синтезе дезоксирибонуклеотидов экономически нецелесообразно [20], возникла необходимость введения дополнительной ферментативной системы регенерации АТФ. Примененная нами система основана на использовании АцК и сравнительно доступного донора фосфатной группы – АсР.

Из рис. 4 видно, что предложенный в настоящем исследовании метод 5'-монофосфорилирования флударабина с помощью рекомбинантной киназы позволяет достигать более 99 % выхода целевого продукта в ходе 4-часовой реакции. Относительные затраты донора фосфатной (АсР) группы при этом составляют около 110 %.

Чистоту полученного после хроматографической очистки флударабин-5'-монофосфата контролировали с использованием обращенно-фазной ВЭЖХ (рис. 5). Как видно из данных хроматограммы, синтезированный целевой продукт после очистки имеет степень чистоты более 99 %.

Следует отметить, что в литературе описано несколько способов химического получения флударабин-5'-монофосфата. Все они включают трудновыполнимые технологические стадии с использованием токсичных фосфорилирующих агентов и органических растворителей.

Наиболее близким к предложенному нами по эффективности является химико-ферментативный способ получения флударабин-5'-монофосфата [23], предусматривающий:

реакцию 2-F-Ade с Ara-U в присутствии целых клеток *Enterobacter aerogenes* в течение 24–26 ч при 50–70 °С;

обработку образовавшегося продукта уксусным ангидридом (90–100 °С, 10–12 ч) с получением 2',3',5'-три-О-ацетилфлударабина;

гидролиз интермедиата (метанол с аммиаком, 20 ч) с получением после кристаллизации флударабина с выходом 23,1 % в расчете на 2-F-Ade;

5'-фосфорилирование флударабина смесью  $\text{POCl}_3$  и триэтилфосфата (–10 °С, 24 ч) с получением после кристаллизации флударабин-5'-монофосфата с выходом 14,1 % в расчете на введенный в реакцию 2-F-Ade.

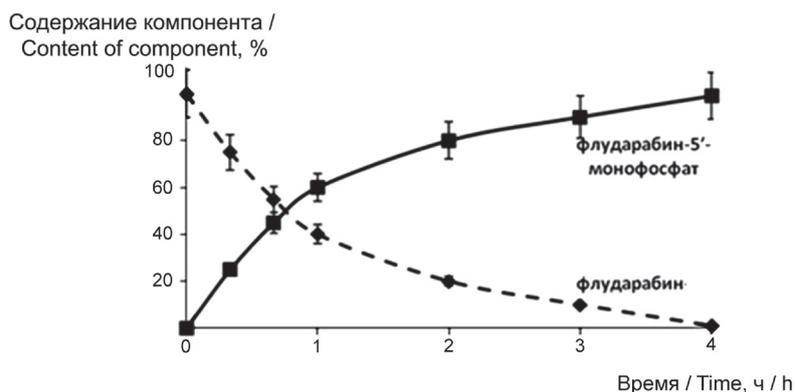


Рис. 4. Динамика убывания флударабина и накопления флударабин-5'-монофосфата в реакционной смеси

Fig. 4. Dynamics of fludarabine-5'-monophosphate decreasing in reaction mixture

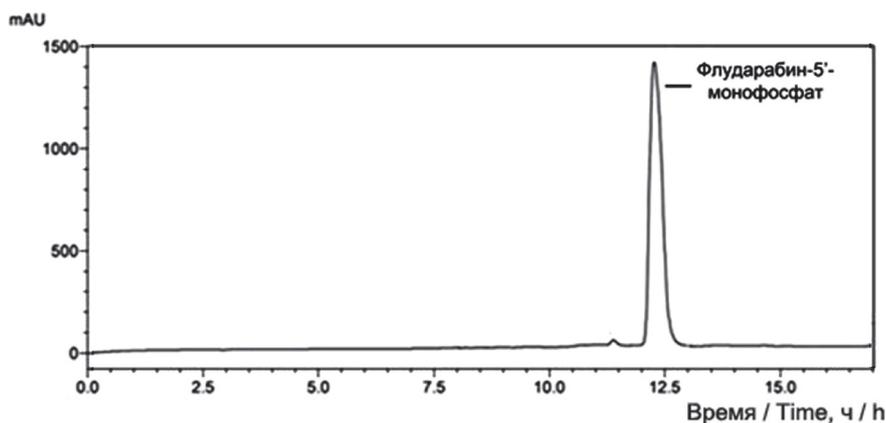


Рис. 5. Хроматограмма флударабин-5'-монофосфата, полученная с помощью ВЭЖХ

Fig. 5. HPLC chromatogram of fludarabine-5'-monophosphate

Недостатками этого способа являются низкий выход целевого продукта, а также использование экологически небезопасных реагентов и растворителей, таких как ацетон, метанол, метилхлорид, хлорокись фосфора и триэтилфосфат. Предложенный в настоящем исследовании метод превосходит описанный аналог по выходу целевого продукта в расчете на затраченный 2-F-Ade (80–82 % вместо 14,1 %), осуществляется в мягких экспериментальных условиях и без применения токсичных реагентов и органических растворителей.

**Заключение.** Впервые экспериментально обоснована схема ферментативного получения флу-дарабин-5'-монофосфата из 2-F-Ade, суcло-С как донора арабинозного фрагмента и АсР в качестве донора фосфатной группы. В разрабатываемом нами подходе к терапии рака, предусматривающем ферментативную трансформацию его в ткани-мишени в противоопухолевый 2-F-Ade, полученный препарат планируется использовать в качестве пролекарства.

### Список использованных источников

1. Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation / J. Connor [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 3184–3188.
2. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human bloodmonocytes / T. Utsugi [et al.] // Cancer Res. – 1991. – Vol. 51. – P. 3062–3066.
3. Ran, S. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels / S. Ran, A. Downes, P. E. Thorpe // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62. – P. 6132–6140.
4. In search of a novel target – Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy / S. Riedl [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1808. – P. 2638–2645.
5. Schick, P. K. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane / P. K. Schick, K. B. Kurica, G. K. Chacko // J. Clin. Invest. – 1976. – Vol. 57. – P. 1221–1226.
6. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers / H. A. Andree [et al.] // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265. – P. 4923–4928.
7. In search of new targets – the membrane lipid phosphatidylserine – the underestimated Achilles' Heel of cancer cells / D. Zweytick [et al.] // Ann. Oncol. – 2011. – Vol. 22, suppl. 3. – P. 43.
8. Boogaerts, M. A. Oral fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukemia-increased convenience / M. A. Boogaerts // Hematol. J. – 2004. – Vol. 5, suppl. 1. – P. S31–S37.
9. Ocular toxicity of fludarabine: a purine analog / X. Ding [et al.] // Expert Rev. Ophthalmol. – 2008. – Vol. 3. – P. 97–109.
10. Portsmouth, D. Suicide genes for cancer therapy / D. Portsmouth, J. Hlavaty, M. Renner // Mol. Asp. Med. – 2007. – Vol. 28. – P. 4–41.
11. In vivo gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase / W. B. Parker [et al.] // Hum. Gene Ther. – 1997. – Vol. 8. – P. 1637–1644.
12. Karjoo, Z. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy / Z. Karjoo, X. Chen, A. Hatefi // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2016. – Vol. 99 (pt A). – P. 113–128.
13. Kraiss, J. J. Purine nucleoside phosphorylase targeted by Annexin V to breast cancer vasculature for enzyme prodrug therapy / J. J. Kraiss, O. De Crescenzo, R. G. Harrison // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – e76403.
14. Old and new insights into the mechanisms of action of two nucleoside analogs active in lymphoid malignancies: fludarabine and cladribine (review) / E. Van den Neste [et al.] // Int. J. Oncol. – 2005. – Vol. 27. – P. 1113–1124.
15. Expression, purification, and characterization of recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* / J. Lee [et al.] // Protein Expr. Purif. – 2001. – Vol. 22. – P. 180–188.
16. Montgomery, J. A. Nucleosides of 2-fluoroadenine / J. A. Montgomery, K. Hewson // J. Med. Chem. – 1969. – Vol. 12. – P. 498–504.
17. Береснев, А. И. Биотехнологический синтез модифицированных нуклеозидов с использованием рекомбинантных ферментов нуклеинового обмена *Thermus thermophilus* и *Escherichia coli*: автореф. ... дис. канд. биол. наук: 03.01.06 / А. И. Береснев; Ин-т микробиол. Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2015. – 23 с.
18. Штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий уридинфосфорилазу: пат. 15563 Респ. Беларусь, МПК7 C12N1/21 / С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко, А. В. Шахбазов, Н. А. Картель; заявитель ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». – № a20100585; заявл. 19.04.2010; опубл. 28.02.2012 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2012. – № 1. – С. 116
19. Штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент пуриннуклеозидфосфорилазы: пат. 13127 Респ. Беларусь, МПК7 C12N1/21 / С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко, А. В. Шахбазов, Н. А. Картель; заявитель ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». – № a20080951; заявл. 17.07.2008; опубл. 30.04.2010 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2010. – № 2. – С. 103.
20. Рымко, А. Н. Разработка биотехнологического способа получения 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов: автореф. ... дис. канд. биол. наук: 03.01.06 / А. Н. Рымко; Ин-т микробиол. Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2014. – 22 с.

21. Штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий дезоксирибонуклеозидкиназу *Drosophila melanogaster*: пат. 19750 Респ. Беларусь, МПК7 C12N1/21 / А. Н. Рымко, С. В. Квач, А. И. Зинченко; заявитель ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». – № а20121660; заявл. 30.11.2012; опубл. 30.12.2015 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2015. – № 6. – С. 61
22. Dolbier, W. R. Fluorine chemistry at the millennium / W. R. Dolbier // *J. Fluor. Chem.* – 2005. – Vol. 126. – P. 157–163.
23. A process for the preparation of fludarabine phosphate from 2-fluoroadenine: pat. 1464708 EP, C12P 19/32 / P. Farina, L. Petrucciani, P. Colombo, G. Caprioli. – N 03007679.8; appl. 03.04.2003; publ. 06.10.2004.

## References

- Connor, J., Bucana, C., Fidler, I. J. and Schroit, A. J. (1989), “Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 86, pp. 3184–3188.
- Utsugi, T., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D. and Fidler, I. J. (1991), “Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human bloodmonocytes”, *Cancer Research*, vol. 51, pp. 3062–3066.
- Ran, S., Downes, A. and Thorpe, P. E. (2002) “Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels”, *Cancer Research*, vol. 62, pp. 6132–6140.
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K. and Zwegtlick, D. (2011), “In search of a novel target – Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1808, pp. 2638–2645.
- Schick, P. K., Kurica, K. B. and Chacko, G. K. (1976), “Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane”, *Journal of Clinical Investigation*, vol. 57, pp. 1221–1226.
- Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T. and Willems, G. M. (1990), “Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, pp. 4923–4928.
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K. and Zwegtlick, D. (2011), “In search of new targets – the membrane lipid phosphatidylserine – the underestimated Achilles’ Heel of cancer cells”, *Annals of Oncology*, vol. 22, suppl. 3, p. 43.
- Boogaerts, M. A. (2004) “Oral fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukemia-increased convenience”, *Hematology journal*, vol. 5, suppl. 1, pp. 31–37.
- Ding, X., Herzlich, A. A., Bishop, R., Tuo, J. and Chan, C. C. (2008), “Ocular toxicity of fludarabine: a purine analog”, *Expert Review of Ophthalmology*, vol. 3, pp. 97–109.
- Portsmouth, D., Hlavaty, J. and Renner, M. (1997), “Suicide genes for cancer therapy”, *Human Gene Therapy*, vol. 8, pp. 1637–1644.
- Parker, W. B., King, S. A., Allan, P. W., Bennett, L. L. Jr., Secrist, J. A., Montgomery, J. A., Gilbert, K. S., Waud, W. R., Wells, A. H., Gillespie, G. Y. and Sorscher, E. J. (1997), “*In vivo* gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase”, *Human Gene Therapy*, vol. 8, pp. 1637–1644.
- Karjoo, Z., Chen, X. and Hatefi, A. (2016), “Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 99 (pt A), pp. 113–128.
- Krais, J. J., De Crescenzo, O. and Harrison, R. G. (2013), “Purine nucleoside phosphorylase targeted by Annexin V to breast cancer vasculature for enzyme prodrug therapy”, *PLoS ONE*, vol. 8, e76403.
- Van den Neste, E., Cardoen, S., Offner, F., Bontemps, F. (2005), “Old and new insights into the mechanisms of action of two nucleoside analogs active in lymphoid malignancies: fludarabine and cladribine (review)”, *International Journal of Oncology*, vol. 27, pp. 1113–1124.
- Lee, J., Filosa, S., Bonvin, J., Guyon, S., Aponte, R. A. and Turnbull, J. L. (2001), “Expression, purification, and characterization of recombinant purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli*”, *Protein Expression and Purification*, vol. 22, pp. 180–188.
- Montgomery, J. A. and Hewson, K. (1969), “Nucleosides of 2-fluoroadenine”, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 12, pp. 498–504.
- Beresnev, A. I. (2015) “Biotechnological synthesis of modified nucleosides using recombinant enzymes of nucleic acid metabolism of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli*”, Abstract of Ph. D. dissertation, Biotechnology, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, BY.
- Kvach S. V., Eroshevskaya, L. A., Zinchenko, A. I., Shakhbazov, A. V. and Kartel’, N. A., Institut mikrobiologii Natsional’noi akademii nauk Belarusi, Institut genetiki i tsitologii Natsional’noi akademii nauk Belarusi (2012), *Shtamm bakterii Escherichia coli, produtsiruyushchii uridinforilazu* [Bacterial strain of *Escherichia coli* producing uridine phosphorylase], BY, Pat. 15563.
- Kvach, S. V., Eroshevskaya, L. A., Zinchenko, A. I., Shakhbazov, A. V. and Kartel’, N. A., Institut mikrobiologii Natsional’noi akademii nauk Belarusi, Institut genetiki i tsitologii Natsional’noi akademii nauk Belarusi (2010), *Shtamm bakterii Escherichia coli – produtsent purinnukleozidfosforilazy* [Bacterial strain of *Escherichia coli* producing purine nucleoside phosphorylase], BY, Pat. 13127.
- Rymko, A. N. (2014), “Development of biotechnological approach for producing of 2'-deoxynucleoside-5'-triphosphates”, Abstract of Ph. D. dissertation, Biotechnology, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, BY.

21. Rymko A. N., Kvach, S. N. and Zinchenko, A. I., Institut mikrobiologii Natsional'noi akademii nauk Belarusi (2015), *Shtamm bakterii Escherichia coli, produtsiruyushchii dezoksinukleozidkinazu Drosophila melanogaster* [Bacterial strain of *Escherichia coli* producing deoxy nucleoside kinase], BY, Pat. 19750.
22. Dolbier, W. R. (2005), "Fluorine chemistry at the millennium", *Journal of Fluorine Chemistry*, vol. 126, pp. 157–163.
23. Farina, P., Petrucciani, L., Colombo, P., Caprioli, G., Pro. Bio. Sint. S.p.A. (2004), *A process for the preparation of fludarabine phosphate from 2-fluoroadenine*, IT, Pat. EP1464708.

### Информация об авторах

Береснев Андрей Игоревич – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrey\_beresnev@mbio.bas-net.by

Рымко Александр Николаевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ingecate@mail.ru

Ерошевская Людмила Анатольевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ljarosha@yandex.com

Квач Сергей Вячеславович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Sergkvach@mbio.bas-net.by

Квасюк Евгений Иванович – д-р хим. наук, профессор. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23, 220009, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ekvasyuk@inbox.ru

Зинченко Анатолий Иванович – чл.-кор., д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.be

### Для цитирования

Синтез флударабин-5'-монофосфата с использованием бактериальных рекомбинантных ферментов / А. И. Береснев [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 7–15.

### Information about the authors

*Beresnev Andrey* – Ph. D. (Biol.), Senior scientific researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrey\_beresnev@mbio.bas-net.by

*Rymko Alexander* – Ph. D. (Biol.), Senior scientific researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ingecate@mail.ru

*Jeroshevskaya Ludmila* – Ph. D. (Biol.), Lead scientific researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ljarosha@yandex.com

*Kvach Sergey* – Ph. D. (Biol.), Lead scientific researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Sergkvach@mbio.bas-net.by

*Kvasyuk Evgeniy* – D. Sc. (Chem.), Professor. International State Ecological Institute named after A. D. Sakharov of the Belarusian State University (23, Dolgobrodskaya Str., 220009, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ekvasyuk@inbox.ru

*Zinchenko Anatoliy* – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

### For citation

Beresnev, A. I., Rymko, A. N., Eroshevskaya, L. A., Kvach, S. V., Kvasyuk, E. I. and Zinchenko, A. I. (2017), "Synthesis of fludarabine 5'-monophosphate using bacterial recombinant enzymes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, no. 1, pp. 7–15.