

УДК 577.113.6

# Современные тенденции в биотехнологии нуклеозидов

И. А. Михайлопуло<sup>1\*</sup>, А. И. Мирошников<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Академика Купревича, 5/2, Беларусь<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Россия

\*E-mail: igor\_mikhailo@yahoo.de

Поступила в редакцию 29.04.2010 г

**РЕФЕРАТ** В настоящем обзоре рассматриваются новые тенденции в биотехнологии нуклеозидов последнего десятилетия. Постоянно растущий интерес в изучении этого класса соединений стимулируется рядом факторов: (i) растущей потребностью в производстве в больших количествах природных 2'-дезоксид-β-D-рибонуклеозидов, а также их модифицированных по гетероциклическому основанию и углеводному фрагменту аналогов для использования их в синтезе и изучении олигонуклеотидов, в том числе коротких интерферирующих РНК (siRNA), микроРНК (miRNA) и т.п.; (ii) необходимостью создания современных технологий производства биологически важных аналогов природных нуклеозидов, включая противоопухолевые и противовирусные препараты; (iii) необходимостью изучения известных и новых ферментативных превращений нуклеозидов и использования их в качестве инструментов эффективного синтеза новых нуклеозидных аналогов и производных, имеющих биомедицинский потенциал. Эти аспекты будут рассмотрены наряду с краткой ретроспективой этой области исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** нуклеозиды, ферменты метаболизма нуклеиновых кислот, химико-ферментативный синтез, биоимитирующий синтез.

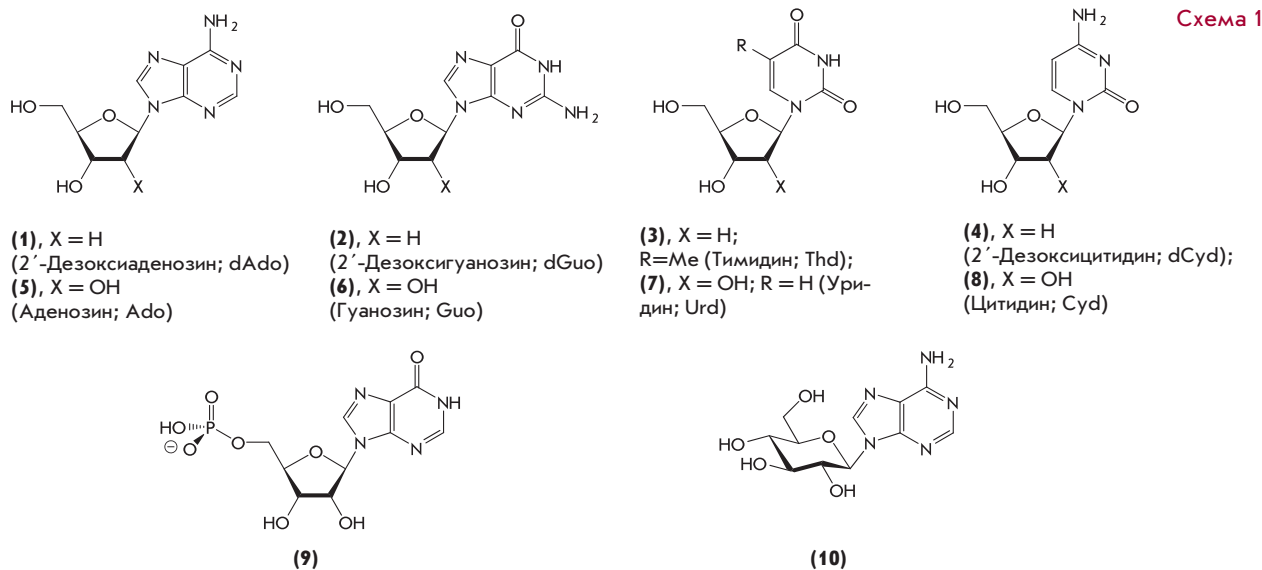
## ВВЕДЕНИЕ

Нуклеозиды представляют собой большое семейство природных и химически модифицированных аналогов, характеризующихся огромным структурным разнообразием. Основные компоненты ДНК и РНК – четыре 2'-дезоксид-β-D-нуклеозида аденина (1), гуанина (2), тимина (3) и цитозина (4) и, соответственно, родственные им четыре β-D-рибонуклеозида (5–8) (схема 1). Природные аналоги этих нуклеозидов, углеводный фрагмент или/и агликон которых изменен(ы) различным образом, были найдены в РНК, а также составляют подгруппу нуклеозидных антибиотиков, которая характеризуется удивительным разнообразием структур. 5'-Фосфорилированные нуклеозиды – нуклеотиды, являются важнейшими метаболитами биосинтеза ДНК и РНК, а также кофакторами огромного числа биохимических превращений.

Первый природный представитель семейства нуклеотидов – инозин-5'-монофосфат ((9); IMP; название инозин происходит от греческого *inos* – мышца) был выделен из экстракта мяса *Либихом* (J.F. von Liebig), который описал его свойства интенсифицировать вкус. Синтез НИМР из инозина и его структура как рибонуклеозид-5'-монофосфата были описаны *Левиным* и *Типсоном* (P.A. Levene & R.S. Tipson) 88 лет спустя (схема 1) (см. [1] и работы, цитированные в этой статье). Интересно отме-

тить, что именно *Левин* (P.A. Levene) дал общее имя «нуклеотид» соединениям, содержащим остаток фосфорной кислоты и образующимся в результате гидролиза нуклеиновых кислот, предложил имя «нуклеозид» для дефосфорилированных нуклеотидов и идентифицировал *D*-рибозу и позднее 2-дезоксид-*D*-рибозу в качестве компонентов соответственно РНК и ДНК [2–7].

Пионерские структурные исследования нуклеозидов и нуклеотидов в течение последней декады XIX и начала XX столетий показали, что ДНК и РНК включают в свой состав пять гетероциклических оснований и две пентозы. Первая химическая конденсация двух компонентов была опубликована *Э. Фишером* и *Хелферихом* (E. Fischer & B. Helferich) в 1914 г. [8]; реакция серебряной соли 2,8-дихлорпурина и 2,3,4,5-тетра-*O*-ацетил-α-*D*-глюкопиранозилбромидом, последующие удаление защитных групп и дегидрогалогенирование приводили к неприродному нуклеозиду *N*<sup>9</sup>-(β-*D*-глюкопиранозил)аденину (10), структура которого была однозначно установлена *Гулландом* и *Стори* (J.M. Gulland & L.F. Story) спустя 24 года (схема 1) [9]. В промежутке между Первой и Второй мировыми войнами был опубликован ряд статей, посвященных химическому синтезу пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов, однако систематические исследования химического синтеза нуклеозидов, нуклеотидов и олигомеров были на-



чаты А. Тоддом (A. Todd) и сотр. в 1942 г. в Университете Кэмбриджа (Англия) и несколько позднее в США. С тех пор опубликовано множество монографий и обзоров, суммирующих огромный прогресс в этой области исследований (см., напр., [10–12]).

Систематические исследования биологических свойств нуклеозидов были начаты во второй половине 1940-х гг. Несколько ранее Филдс и Вудс (P. Fildes & D.D. Woods) сформулировали антиметаболитную теорию и ее положения в применении к дизайну аналогов природных соединений, обладающих биомедицинским потенциалом, стимулировали огромное количество исследований в этой области (см., напр., обзоры [13, 14]). Несмотря на умеренную предсказательную силу этой теории, большой массив синтезированных аналогов природных нуклеозидов и данных об их биологических свойствах (*i*) выявили весьма полезные инструменты изучения биохимических превращений, которые привели к пониманию механизма функционирования ферментов метаболизма нуклеиновых кислот, позволили (*ii*) проанализировать на ряде примеров зависимость структура–активность, что привело к рациональному дизайну новых аналогов с улучшенным соотношением активность–токсичность, и (*iii*) создать ряд противоопухолевых и противовирусных лекарств.

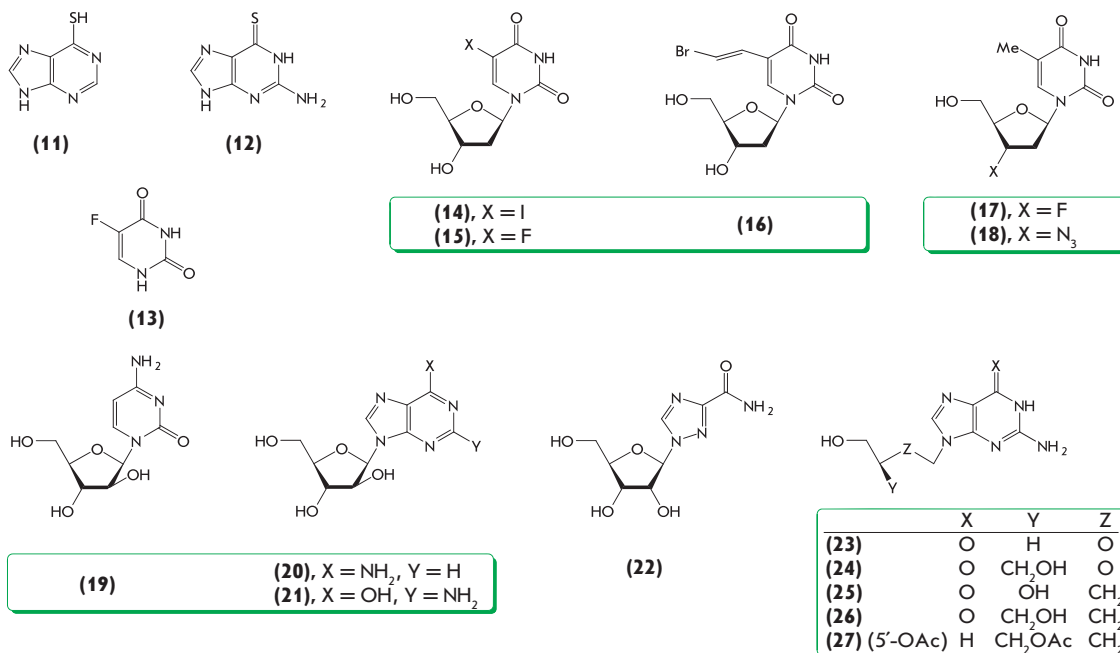
В течение тридцати лет после начала систематических исследований был обнаружен ряд структур-лидеров огромной биологической и медицинской важности, например, гетероциклические основания (6-меркаптопурин (11), тиогуанин (12), 5-фторурацил (13)), аналоги тимидина, модифицированные по С5 агликона (2'-дезоксидеокси-5-йодуридин (14); Idoxuridine; Iduviran, 2'-дезоксидеокси-5-фторуридин (15); FUDR; Floxuridine, (E)-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксидеоксиуридин (16); BVDU; Brivudine) и при С3' углеводного фрагмента (3'-дезоксидеокси-3'-фтортимидин (17); FLT; Alovudine и 3'-дезоксидеокси-3'-азидотимидин (18); AZT; Zidovudine), β-D-арабинофуранозилнуклеозиды (1-(β-D-арабинофуранозил)-цитозин (19); аС, Cytarabine, -аденин (20); аА, Vidarabine, -гуанин (21); аG), 3-карбоксамидо-1-

(β-D-рибофуранозил)-1,2,4-триазол (22); Виразол; Virazole; Ribavirin и гипермодифицированные пуриновые ациклопнуклеозиды, аналоги, у которых углеводный фрагмент нуклеозидов заменен на алифатическую цепь, которая имитирует пентофуранозную часть природных нуклеозидов, а именно, Ацикловир (23); ACV; Zovirax, Ганцикловир (24); DHPG; Cytovene, Буцикловир (25); Buciclovir, Пенцикловир (26); Penciclovir и Фамцикловир (27); 5'-ОАс-производное, согласно нуклеозидной нумерации; «*prodrug*» Пенцикловира; Famciclovir) (схема 2).

Обнаружение большого числа соединений, обладающих высокой противовирусной и/или противоопухолевой активностью, многие из которых были разрешены Агентством по продуктам питания и лекарствам, США (FDA, Food and Drug Administration, USA) к применению в США, а также выделение из природных источников нуклеозидных антибиотиков [15] стимулировали синтез огромного числа модифицированных нуклеозидов. Исследования, направленные на изучение механизмов противовирусной и противоопухолевой активности, дали обширный материал относительно метаболических превращений модифицированных нуклеозидов, об их метаболической активации и дезактивации. Кроме того, эти исследования позволили установить ферментативные реакции, вовлеченные в проявление активности и выяснить роль механизмов утилизации нуклеозидов («salvage»-синтез) и участия вирускодируемых нуклеозидкиназ в осуществлении ключевой стадии активации нуклеозидов – их 5'-монофосфорилирования внутри клетки. Нуклеозидмонофосфаты далее метаболизируют до 5'-дифосфатов и 5'-трифосфатов, и последние включаются в разнообразные метаболические превращения [14, 16–19].

Было установлено, что большинство нуклеозидных аналогов, проявляющих противовирусную и/или противоопухолевую активность в организме, не активны как таковые, но становятся активными после превращения в клетке в нуклеотиды внутриклеточными ферментами. В случае противовирусных агентов, нуклеозид-5'-трифосфаты часто являются настоящими ингибиторами вирусных ДНК-

Схема 2



или РНК-полимераз. В некоторых случаях полимеразы воспринимают аналог природного субстрата и, вводя аналог в растущую цепь, обрывают (терминируют) ее или продолжают рост цепи со значительным замедлением либо приводят к функционально некомпетентному биополимеру [16, 17].

В опухолевых клетках синтез активных соединений инициируется превращением гетероциклических оснований в соответствующие рибонуклеозид-5'-монофосфаты под действием нуклеозид-фосфорилтрансфераз или прямым 5'-фосфорилированием нуклеозидов под действием клеточных нуклеозидкиназ [14, 20–22]. Напротив, в вирусинфицированных клетках, первая, критически важная стадия активации противовирусных нуклеозидов состоит в 5'-монофосфорилировании под действием киназ, кодируемых вирусом [16, 17, 23].

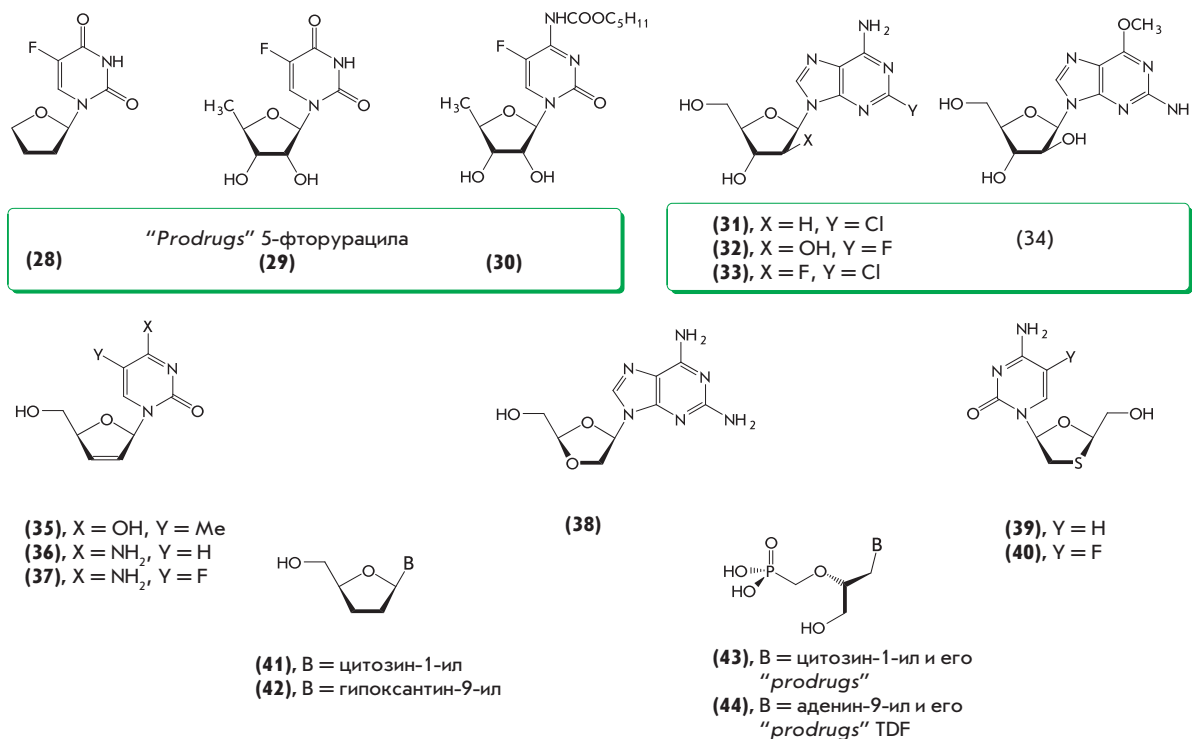
Катаболическая дезактивация биологически активных нуклеозидов часто заключается в дезаминировании цитозиновых и адениновых нуклеозидов под действием соответствующих дезаминаз, приводящем к неактивным производным [14, 24–26], и в фосфоролитическом гидролизе гликозидной связи нуклеозидфосфорилазами с образованием гетероциклических оснований и  $\alpha$ -D-пентофураноза-1-фосфатов (см. [24, 27] и работы, цитированные в [27]).

Новые данные относительно метаболизма нуклеозидов и механизма их действия на мишени позволили увеличить активность первоначально обнаруженных соединений-лидеров путем защиты их от катаболических превращений или улучшив их доставку до целей, а также способствовали обнаружению новых биологически активных лидеров [18, 19, 28]. Примером первого подхода являются противоопухолевые средства Фторафур® (28), 5-фтор-5'-дезоксидеоксиридин (29) и Капецитабин ((30); Capecitabine), родственные арабино-А нуклеозиды Кладрибин ((31); CdA; Cladribine), Флударабин ((32); Fludarabine) и Клофарабин ((33); Clofarabine), которые высокоактивны в отношении различ-

ных форм лейкемии и устойчивы к дезаминированию аденозиндезаминазой [21, 22], и противолейкозное средство Неларабин ((34); Nelarabine), «prodrug» aG, с улучшенной в сравнении с первоначальным средством aG растворимостью и более высокой активностью [29] (схема 3).

Выяснение механизма действия AZT и установление в качестве биохимической мишени лекарств против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), обратной транскриптазы, кодируемой вирусом, стимулировало синтез огромного числа разнообразных 2',3'-дидезоксинуклеозидов, например, 2',3'-дидезоксицитидина ((41); ddC; Zalcitabine; Hivid®), 2',3'-дидезоксицитозина ((42); Didanosine) и родственных нуклеозидов с C2'-C3'-двойной связью, 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокситимидина ((35); d4T; Stavudine; Zeret®) и его цитозиновых аналогов ((36); d4C) и ((37), Reverset™), нуклеозидов с атомами кислорода или серы вместо C3'-атома углерода пентофуранозного кольца, 2-амино-2',3'-дидезокси-3'-оксааденозина ((38); Amdoxovir), 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина ((39); 3TC; Lamivudine; EpiVir®), (-)- $\beta$ -L-3'-тиа-2',3'-дидезокси-5-фторцитидина ((40); (-)FTC; Emtricitabine; Emtriva®), а также большого числа гипермодифицированных ациклических нуклеозидов с фосфонатной функцией и их депо-форм, например, ((43); Cidofovir, В = цитозин-1-ил) и ((44); Tenofovir, В = аденин-9-ил) [30–34] (схема 3).

Следует подчеркнуть, что пионерские исследования Шеффера и сотр. (H.J. Schaeffer) по синтезу и изучению биохимических свойств ациклических нуклеозидов привели к открытию 9-[2-гидрокси(этоксиметил)]гуанина ((23); Ацикловир; Acyclovir) в качестве противовирусного средства [35–38] и стимулировали синтез разнообразных ациклических нуклеозидов, модифицированных по аглицону или в ациклическом фрагменте, включая фосфонатные аналоги нуклеозид-5'-фосфатов и их скрытых форм («prodrugs»), которые обнаружили широкий спектр биологической активности [39].



Вплоть до настоящего времени, подавляющее большинство модифицированных нуклеозидов были получены химическими методами. Большое число разработанных с этой целью синтетических подходов можно объединить в три основных направления: (i) конвергентный синтез, в котором используются производные сахаров или имитаторов сахаров в качестве гликозилирующих агентов, (ii) химические превращения природных нуклеозидов и (iii) рациональная комбинация обоих указанных выше подходов. Несмотря на весьма впечатляющий прогресс, достигнутый в развитии химических методов, получение многих противовирусных и противоопухолевых лекарств, а также биологически активных соединений продолжает оставаться серьезной проблемой, что обуславливает высокую стоимость препаратов и, как следствие, ограничивает широкие биологические исследования и терапевтическое применение. Необходимость развития новой стратегии получения рассматриваемых соединений стала очевидна в конце 1970-х гг.

#### ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СТРАТЕГИЯ СИНТЕЗА НУКЛЕОЗИДОВ (БИОТЕХНОЛОГИЯ НУКЛЕОЗИДОВ)

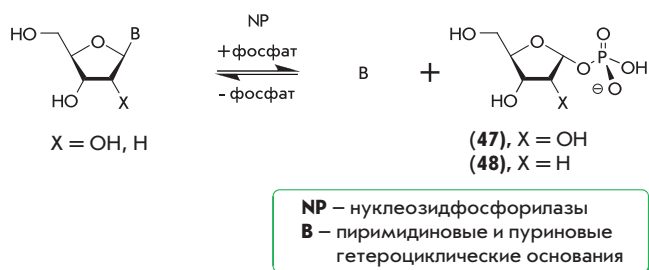
Среди большого числа ферментов обмена нуклеиновых кислот около 20 представляют интерес с точки зрения новых эффективных стратегий получения биологически важных нуклеозидов. Прежде всего, это относится к ферментам, катализирующим конденсацию гетероциклических оснований и сахаров с образованием гликозидной связи, а также к ферментам, катализирующим различные превращения нуклеозидов. Эти ферменты имеют первостепенное значение для изучения и разработки новых подходов к синтезу нуклеозидов.

Параллельно с пионерскими химическими исследованиями и изучением биохимических свойств модифициро-

ванных нуклеозидов были начаты работы по выделению ферментов обмена нуклеиновых кислот из природных источников и изучению механизмов их функционирования (см., напр., обзор [24]). Первые публикации Левина и сотр. [40–44] и Джонса (W. Jones) [45, 46] по активности, гидролизующей нуклеиновые кислоты и расщепляющей нуклеозиды, относятся к 1911 г.; позднее Левин и сотр. описали выделение «нуклеозидазы» из селезенки, почек и поджелудочной железы крупного рогатого скота, которая была способна гидролизовать аденозин и инозин в фосфатном буфере с одинаковой эффективностью, давая соответствующие основания и рибозу (рибозо-1-фосфат не был обнаружен в то время!), и изучили ее свойства [47–49]. Были определены оптимальная температура (37°C) и pH (7.5) реакции и было найдено, что (i) рибоза и аденин оказывают «замедляющее влияние на протекание реакции», (ii) каолин полностью адсорбирует частично очищенный фермент из раствора, при этом комплекс фермент–каолин является стабильным в пределах значений pH 4.0–8.0 при 40°C в течение 15 ч и демонстрирует одинаковый уровень активности и (iii) химически полученный адениновый нуклеозид, содержащий гексозу (структура нуклеозида не была установлена), не являлся субстратом фермента.

Позднее Калкар (H.M. Kalckar) изучил нуклеозидазу из печени крысы и показал, что (i) этот фермент является пурин-нуклеозидфосфорилазой (PNP; КФ 2.4.2.1), которая фосфоролитически гидролизует инозин или гуанозин и при этом образуются рибозо-1-фосфат (позже была доказана структура: α-D-рибофуранозо-1-фосфат; (47); RP) (см. обзоры [24, 50]) и соответствующие пуриновые основания, гипоксантин или гуанин; (ii) инкубация RP с гипоксантином или гуанином в присутствии PNP приводит к быстрому образованию инозина или гуанозина [51, 52]. В статье Калкара

Схема 4



выделение RP в чистой форме было сообщено впервые. Вскоре после этой публикации Мансон и Лампен (*L.A. Manson & J.O. Lampen*) показали, что покоящиеся клетки *Escherichia coli*, а также бесклеточный экстракт содержат ферменты, гидролизующие 2'-дезоксигуанидин и тимидин в присутствии неорганического фосфата до свободных оснований и сложного эфира дезоксирибозы, структура которого была установлена позднее как 2-дезокси- $\alpha$ -D-рибофуранозо-1-фосфат (**48**) [24, 53]. Авторы предположили, что этот экстракт содержит пурин- и пиримидин-нуклеозидфосфорилазы, специфичность которых оказалась подобна таковой ферментам млекопитающих. Более того, было представлено доказательство того, что эти бактериальные ферменты обратимо катализируют синтез нуклеозидов и их фосфоролитический гидролиз (схема 4).

Последующие исследования подтвердили и расширили эти фундаментальные наблюдения и показали, что пурин-нуклеозидфосфорилaza специфична в отношении 9-( $\beta$ -D-пентофуранозил)пуринов, причем PNP из млекопитающих специфична в отношении 6-оксопуринов (ср. с приведенными выше данными Левина и сотр. [47–49]) и их нуклеозидов, а также некоторых аналогов, тогда как PNP из бактериальных источников проявляет очень широкий спектр специфичности, используя в качестве субстратов 6-оксо- и 6-аминопурины и их нуклеозиды наряду с многочисленными аналогами.

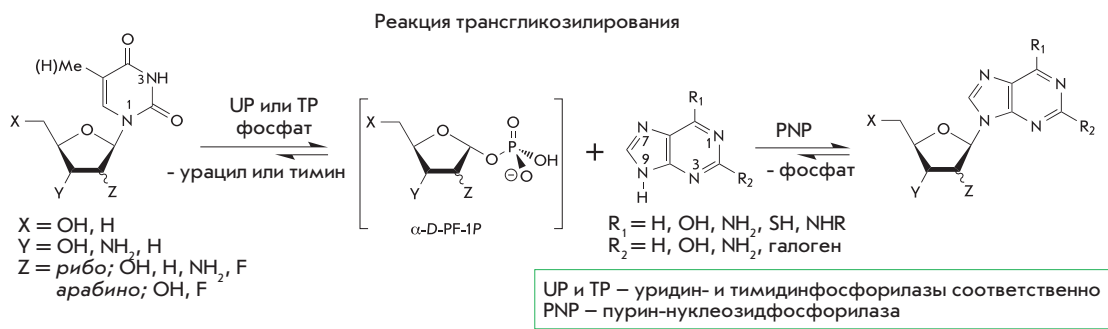
Тимидинфосфорилaza (TP; КФ 2.4.2.4) обратимо катализирует фосфоролитический гидролиз тимидина (**3**) и 2'-дезоксидиридина, но не уридина (**7**) и 1-( $\beta$ -D-арабинофуранозил)тимидина и -урацила, тогда как уридинфосфорилaza (UP; КФ 2.4.2.3) не различает  $\beta$ -D-рибофуранозу и 2'-дезокси- $\beta$ -D-рибофуранозу в пиримидиновых нуклеозидных акцептирует в качестве субстратов 1-( $\beta$ -D-арабинофуранозил)-пиримидины. Цитозин и его нуклеозиды не являются

субстратами TP и UP, однако следует отметить два неожиданных наблюдения. Так, PNP в некоторых экспериментах обнаружила цитозинфосфорилазную активность [54]. Было также показано, что человеческая дезоксицитидинкиназа – цитозольный фермент, который играет ключевую роль в активации терапевтически важных нуклеозидных аналогов посредством их 5'-монофосфорилирования, фосфоролитически расщепляет природные 2'-дезоксинуклеозиды, включая 2'-дезоксцитидин, до свободных гетероциклических оснований и 2-дезокси- $\alpha$ -D-рибофуранозо-1-фосфата [55].

Результаты пионерских исследований однозначно указывали на возможность ферментативного синтеза нуклеозидов исходя из пуриновых или пиримидиновых гетерооснований, используя или  $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфат, или другой нуклеозид в качестве донора углеводного фрагмента (см. обзоры [24, 56]). Первые попытки использовать ферменты для синтеза пиримидиновых нуклеозидов были предприняты Фридкин и Робертсом (*M. Friedkin & D. Roberts*) на примере синтеза тимидина и родственных нуклеозидов [57, 58] и Душинским и Хайдельбергером (*R. Duschinsky & C. Heidelberger*) при синтезе 5-фтор-2'-дезоксидиридина (FUDR, **15**) и 2'-дезокси- $\beta$ -D-рибофуранозил-5-трифторметилурацила ( $\text{CF}_3$ -dUrd) [59–64]. Интересно отметить, что первое сообщение о синтезе FUDR ферментативным переносом остатка 2-дезоксидиридинового тимидина на 5-фторурацил (**13**) появилось в 1957 г. [59], затем препаративный ферментативный процесс был запатентован [60]. Эта же группа исследователей описала химический метод синтеза 5-фтор-2'-дезоксидиридина (**15**), а также ферментативный синтез с низким выходом другого противоопухолевого нуклеозида –  $\text{CF}_3$ -dUrd, используя бесклеточный экстракт клеток *E. coli* в качестве источника тимидинфосфорилазы [36] (см. также обзоры [24, 56, 65–68]). Позднее ряд 5-замещенных нуклеозидов урацила, включая 2'-дезоксидиридин (**14**); 55%), 5-фтор-2'-дезоксидиридин (**15**); 65%) и E-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксидиридин (**16**); 61%), был получен с использованием тимидина (**3**) или 2'-дезоксигуанидина (**2**) в качестве доноров 2-дезоксидиридинового, соответствующих гетерооснований в качестве акцепторов и селекционированных клеток *E. coli* VM-11 в качестве биокатализатора [69].

Перенос пентофуранозного фрагмента пиримидиновых нуклеозидов на пуриновые гетерооснования и наоборот (реакция трансгликозилирования), катализируемый бактериальными нуклеозидфосфорилазами (NP), был продемонстрирован как очень эффективная методология синтеза

Схема 5



большого числа аналогов природных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов высокой биологической и фармацевтической важности. Наиболее используемый путь заключается в переносе пентофуранозного фрагмента пиримидиновых нуклеозидов на пуриновые гетерооснования (схема 5).

Этот путь трансгликозилирования основывается на большом числе эффективных химических превращений легкодоступных природных пиримидиновых нуклеозидов в разнообразные, модифицированные по углеводному остатку аналоги через промежуточное образование *O*<sup>2</sup>,2'(3';5')-ангидро-производных и последующее раскрытие ангидро-кольца под действием нуклеофильных агентов. Подобный подход к получению родственных пуриновых нуклеозидов не имеет, к сожалению, практического значения. Более того, различия в субстратной специфичности ТР и УР обуславливают возможность использования в реакциях трансгликозилирования большого числа доноров пентофуранозного остатка с оптимальной эффективностью. Так, например, 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор-β-D-рибофуранозил)-урацил (схема 5, X = Y = OH; Z = *рибо*-F) и 1-(2-дезоксидеокси-2-фтор-β-D-арабинофуранозил)тимин (схема 5, X = Y = OH; Z = *арабино*-F) не обнаружили субстратной активности в отношении УР, и по этой причине УР не может быть использована в качестве биокатализатора; напротив, оба нуклеозида оказались низкоактивными, но все же субстратами ТР, что позволило использовать этот фермент в трансгликозилировании пуриновых оснований [70, 71].

Успешное использование нуклеозидфосфорилаз в качестве биокатализаторов для синтеза пуриновых арабинозидов и многочисленных нуклеозидов, модифицированных по гетерооснованию и углеводному фрагменту, описаны в большом числе публикаций (см. обзоры [24, 56]).

В реакции трансгликозилирования с успехом были использованы три типа биокатализаторов: (i) селекционированные целые бактериальные клетки, проявляющие УР- и/или ТР- и РNP-активности; (ii) целые бактериальные клетки-продуценты, экспрессирующие в большом количестве рекомбинантные нуклеозидфосфорилазы, и (iii) очищенные рекомбинантные ферменты.

Целые бактериальные клетки в качестве биокатализаторов представляют собой, по сути, иммобилизованные природой ферменты, обеспечивающие рассматриваемые превращения. Использование биокатализаторов этого типа имеет определенные преимущества (относительно низкая стоимость) по сравнению с применением очищенных или иммобилизованных (инкапсулированных) ферментов. Следует, однако, учитывать, что целые бактериальные клетки могут обладать активностями, которые будут катализировать превращение субстрата и желаемого продукта реакции трансгликозилирования в производное, не представляющее интереса (см. ниже). С другой стороны, огромный прогресс, достигнутый в получении рекомбинантных ферментов на практическом уровне, делает эти биокатализаторы доступными для широкого применения, включая разработку биотехнологических процессов производства лекарств. В случае очень низкой субстратной активности донора пентофуранозного остатка или гетероциклического основания-акцептора применение очищенных рекомбинантных ферментов в качестве биокатализаторов представляет разумную альтернативу целым бактериальным клеткам.

Следует отметить, что побочные активности целых бактериальных клеток в ряде случаев могут быть рационально использованы для синтеза желаемого нуклеозида. Так, например, селекционированные клетки *E. coli* ВМ-11, обнаружившие наряду с УР- и РNP-активностями также высокую активность цитидиндезаминазы, были применены для синтеза аG (21) (15 мМ К-фосфатный буфер (рН 6.75), 60°C, 45 ч; выход в расчете на выделенный продукт 48–53%), с использованием арабинозида цитозина (19) и 2'-дезоксигуанозина (2) в качестве доноров соответственно *D*-арабино-фуранозного остатка и гуанина (51), образующегося *in situ* из dG-uo (схема 6) [72]. Деаминарование аС до арабинозида урацила (49) цитидиндезаминазой предшествует образованию α-*D*-арабинофуранозо-1-фосфата (50) из аU под действием УР.

Подобный подход был использован для синтеза 2'-дезоксидеокси-2'-фторгуанозина с 2'-дезоксидеокси-2'-фторцитидином в качестве донора 2-дезоксидеокси-2-фтор-

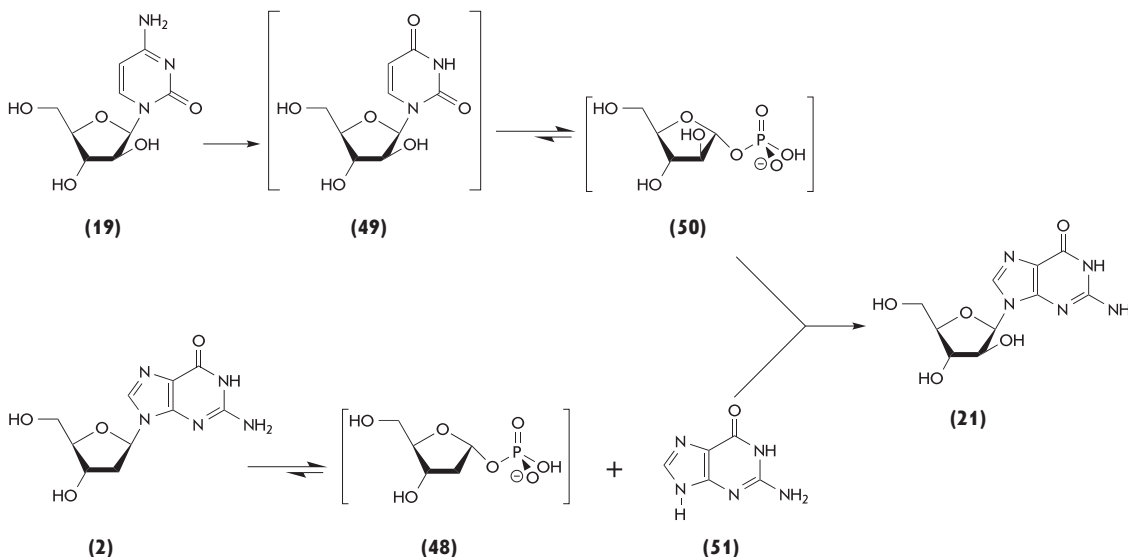
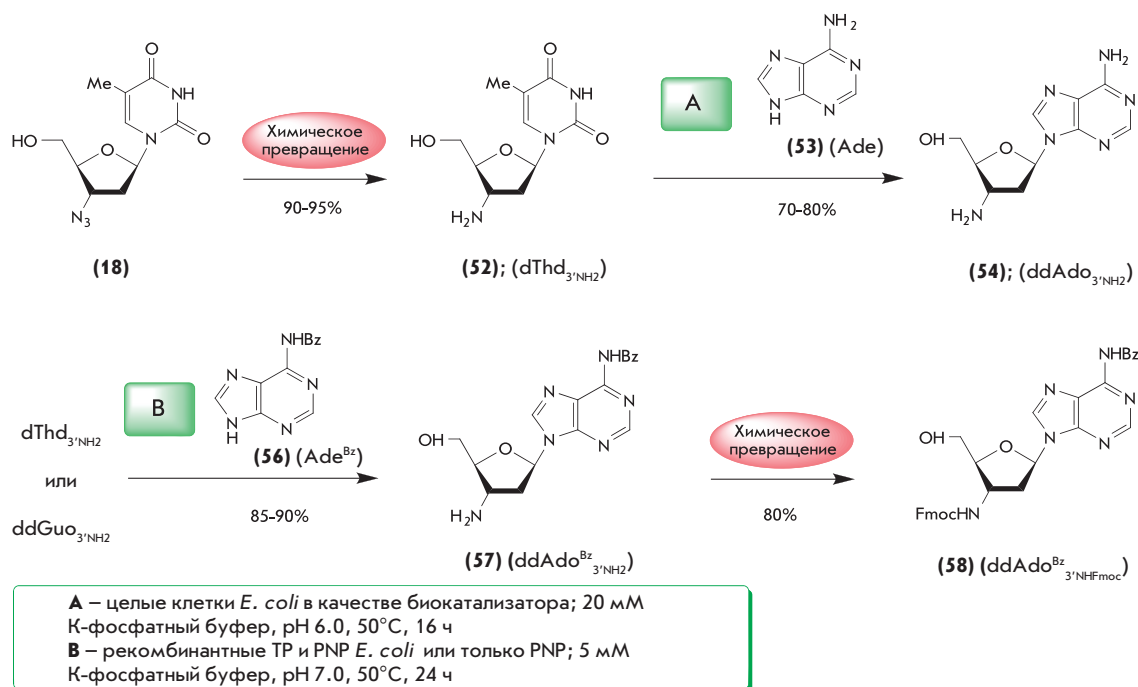


Схема 7



$\alpha$ -D-рибофуранозо-1-фосфата [73]; следует отметить, что селекционированные клетки *E. coli* ВМТ-4D/1А в качестве катализатора синтеза 2'-дезоксидезокси-2'-фторгуанозина [73] представляются предпочтительными в сравнении с очищенными UP и PNP [70, 71].

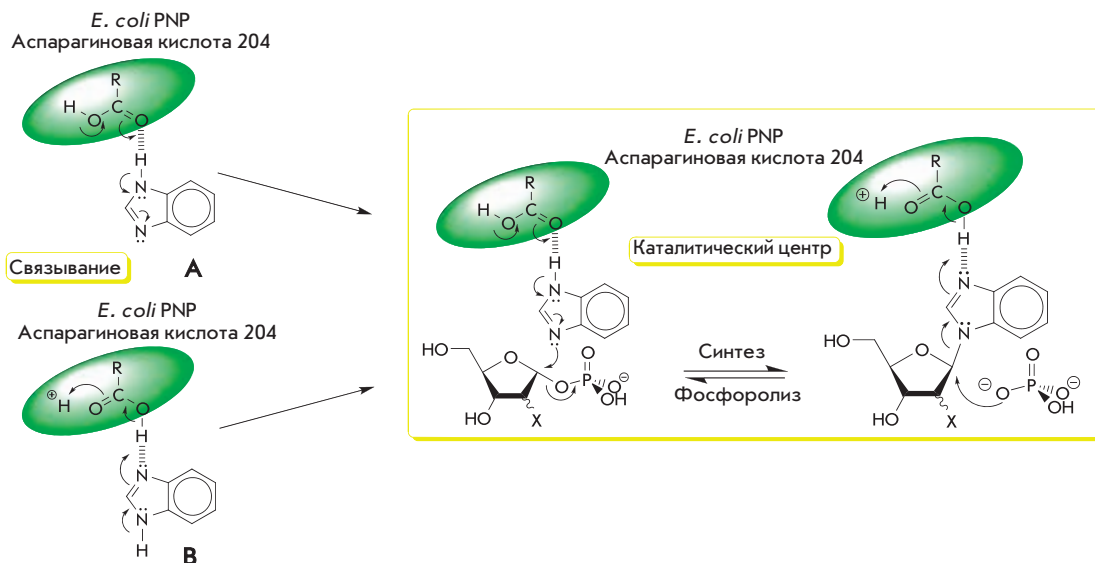
Использование селекционированных клеток *E. coli* оказалось весьма эффективным в химико-ферментативном синтезе пуриновых 3'-амино-2',3'-дидезокси- $\beta$ -D-рибонуклеозидов (схема 7) [74]. Следует отметить, что AZT (18) не является субстратом ни TP, ни UP и по этой причине не может быть использован в качестве донора пентофуранозного остатка. Восстановление азидогруппы AZT дает 3'-амино-2',3'-дидезокситимидин ((52); dThd<sub>3'NH<sub>2</sub></sub>), который оказался удовлетворительным субстратом TP, что позволило его использовать в качестве донора углеводного остатка. Перенос пентофуранозного остатка от dThd<sub>3'NH<sub>2</sub></sub> к аденину, катализируемый целыми клетками *E. coli* (20 мМ К-фосфатный буфер (pH 6.0), 50°C, 16 ч), протекал удовлетворительно, и желаемый 3'-амино-2',3'-дидезоксиаденозин ((54); ddAdo<sub>3'NH<sub>2</sub></sub>) был получен с хорошим выходом. Однако замена аденина (53) на N<sup>6</sup>-бензоиладенин (56) в аналогичной реакции трансгликозилирования приводила к получению ddAdo<sub>3'NH<sub>2</sub></sub> (54) вместо ожидаемого N<sup>6</sup>-бензоильного производного ddAdo<sub>3'NH<sub>2</sub></sub> (57) вследствие побочной активности целых клеток.

Принимая во внимание, что ddAdo<sub>3'NH<sub>2</sub></sub> с ортогонально защищенными аминогруппами (58) представляет интерес для синтеза олигонуклеотидов, мы недавно изучили реакцию трансгликозилирования с использованием очищенных рекомбинантных TP и PNP из *E. coli* [75]. Было найдено, что использование Thd<sub>3'NH<sub>2</sub></sub> в качестве донора остатка пентофуранозы и TP и PNP в качестве биоката-

лизаторов или комбинации донора ddGuo<sub>3'NH<sub>2</sub></sub> и биокатализатора PNP (5 мМ К-фосфатный буфер (pH 7.0), 50°C, 24 ч) приводит к получению желаемого N<sup>6</sup>-бензоильного производного ddAdo<sub>3'NH<sub>2</sub></sub> (57) с высоким выходом (схема 7) [76]. Стандартная обработка последнего Fmoc-OSU дает ddAdo<sub>3'NH<sub>2</sub></sub><sup>Bz</sup> (58) с ортогонально защищенными аминогруппами.

Возможные области применения нуклеозидфосфорилата для синтеза нуклеозидов, а также ограничения этой методологии были изучены в деталях, однако некоторые очень интересные ферментативные реакции заслуживают рассмотрения, так как они дают ключ к пониманию механизма преобразований, катализируемых этими ферментами, и расширяют возможные области их применения.

Известно много публикаций, показывающих, что N<sup>7</sup>-атом пуринов играет очень важную роль в процессе фосфоролитического разрыва гликозидной связи пуриновых нуклеозидов (см. [77, 78] и работы, цитированные в [77]) и, по-видимому, также в обратной, синтетической реакции, катализируемой PNP *E. coli*, хотя механизм этой реакции до сих пор адекватно не изучен. Обнаружение высокой субстратной активности 3-дезазапуринов [79–81], 1-дезаза-, 3-дезаза- и 1,3-дидезазапуринов (бензимидазолов, включая фтор-, хлор- и бромзамещенные) [82–84] в отношении PNP *E. coli* дает основание предположить ключевую роль двух атомов азота имидазольного кольца в рассматриваемой реакции, а именно один из них участвует в связывании гетерооснования в активном центре фермента, что приводит по всей вероятности к повышению нуклеофильности второго атома азота. Последнее обстоятельство способствует атаке этого атома азота на электрофильный C1-атом углерода  $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-



фосфата и, в конечном итоге, приводит к образованию гликозидной связи (схема 8).

Примечательно, что механизм синтетической реакции, катализируемой нуклеозидфосфорилазами, не привлек достаточного внимания исследователей, и многие важные детали остаются невыясненными. Так, например, тип первоначального связывания субстрата или ингибитора с PNP *E. coli* (ср. типы связывания **A** и **B** на схеме 8) мог бы пролить свет на механизм функционирования фермента и дать ключ к пониманию некоторых необычных наблюдений. Участие двух атомов азота в этой реакции представляется очевидным, если принять во внимание, что 7-дезазагипоксантин ((**61**); 7-ДАН) является очень мощным ингибитором PNP (схема 8) [50, 85]. Туберцидин (**59**) и 7-дезазаинозин (**60**) не являются субстратами PNP и обнаружили очень

низкое сродство к активному центру фермента. Напротив, свободное основание, 7-дезазагипоксантин (**61**), узнается ферментом и образует очень прочный комплекс PNP-фосфат-7-ДАН, что приводит к полному ингибированию фермента [85].

Тип связывания 7-ДАН в активном центре PNP *E. coli* не выяснен; в принципе, можно предположить два разных типа связывания – **A** и **B**. Первый из них, тип **A**, подобен одному из двух возможных способов связывания природного субстрата в активном центре PNP посредством водородной связи карбоксила остатка аспарагиновой кислоты-204 (ср. тип **A** на схеме 8 и тип **A** на схеме 9). Очевидно, что тип **A** связывания 7-ДАН в активном центре PNP *E. coli* не может приводить к образованию нуклеозида ввиду отсутствия  $N^9$ -атома азота (пуриновая нумерация). Тип свя-

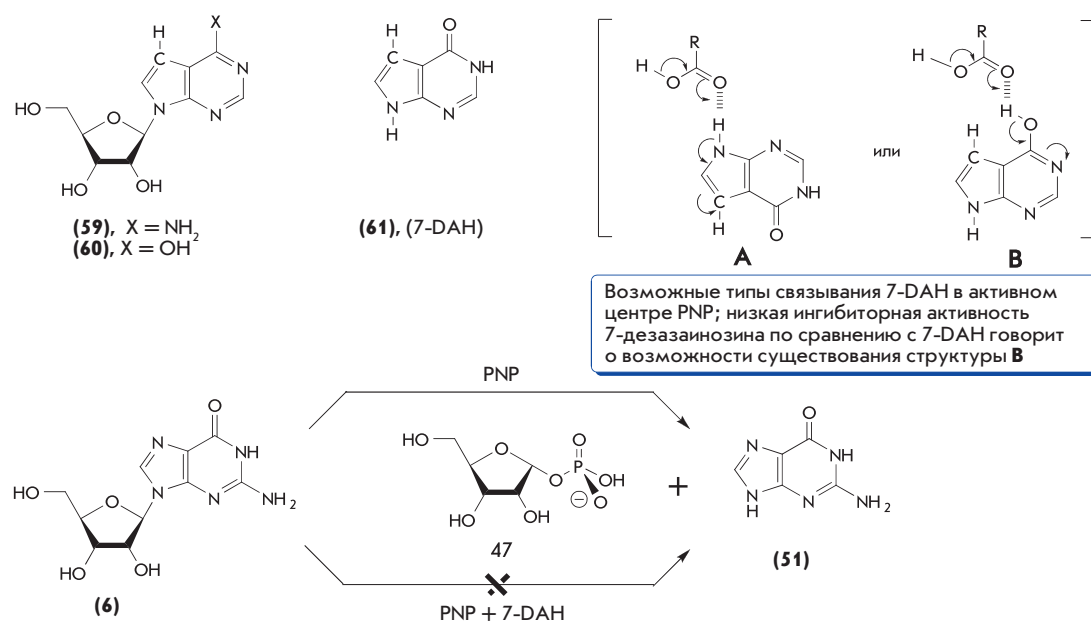
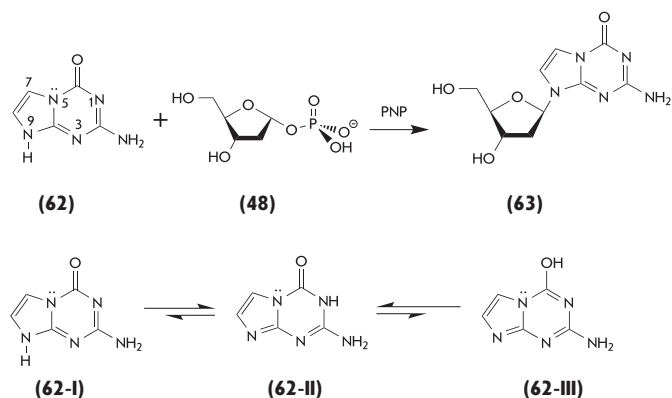




Схема 10



зывания **В** состоит в образовании необычной водородной связи между ОН-группой таутомерной формы циклического амида, что может, по-видимому, приводить также к стабилизации комплекса PNP-фосфат-7-ДАН ( $N^9$ -H-структура), электронная или пространственная структура которого затрудняет или предотвращает нуклеофильную атаку на C1-атом  $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфата (**47**) (схема 9).

Гипотетическая возможность образования структуры типа **В** неожиданно находит поддержку в удовлетворительной акцепторной активности 5-аза-7-дезаагуанина (**62**) в реакции гликозилирования с использованием 2-деокси- $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфата (**48**) в качестве углеводного донора и PNP (из селезенки быка; Sigma) (см. [86] и работы, цитированные в этой статье). Действительно, гетерооснование может существовать в трех таутомерных формах (**62-I-III**), и одна из них, структура (**62-III**), может узнаваться PNP и тем самым приводить к образованию нуклеозида в результате нуклеофильной атаки свободного  $N^9$ -атома азота на C1-атом углерода углеводного субстрата (схема 10). Следует, однако, отметить, что расчеты методами *ab initio* (6-31G\*\*) и полуэмпирическими (PM3, в воде) (HyperChem 8.1) таутомерных структур показали, что структура **II** является термодинамически наиболее стабильной, тогда как структуры **III** и **I** менее стабильны (И.А. Михайлопуло, не опубликовано).

Представляется очевидным, что тип связывания 7-ДАН и 5-аза-7-дезаагуанина (**62**) в активном центре PNP и возможные пути использования этих данных для получения некоторых нуклеозидов 7-дезаагуанина заслуживают более детального изучения.

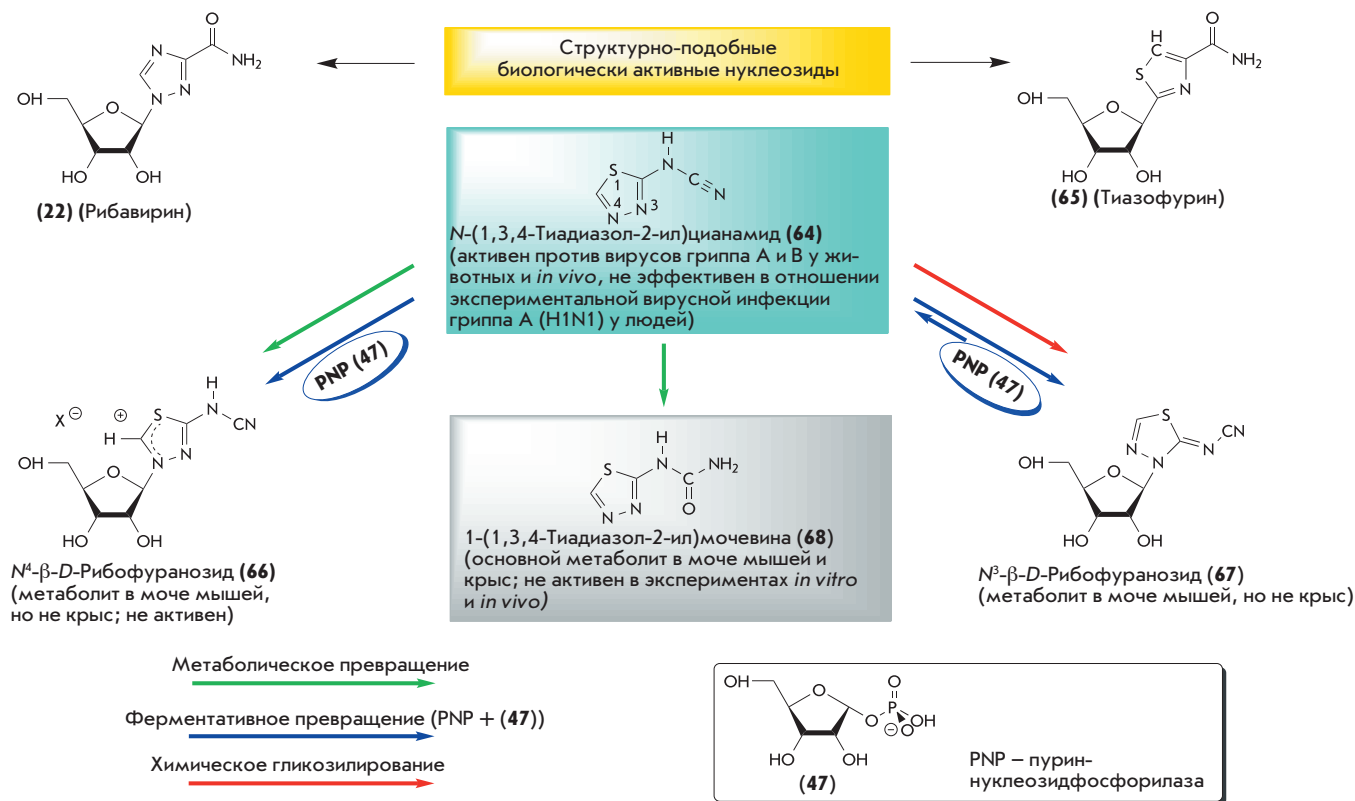
Метаболические и ферментативные превращения противовирусного соединения  $N$ -(1,3,4-тиадиазол-2-ил)цианамид (LY217896; (**64**)) (схема 11) представляют собой другой пример совершенно необычных биотрансформаций [87, 88]. Это соединение обнаруживает некоторое структурное сходство с гетероциклическими основаниями противовирусного нуклеозида Виразол ((**22**); Ribavirin) и противоопухолевого  $C$ -нуклеозида тиазофурина (**65**). Оно проявило активность против вирусов гриппа типа А и В *in vitro* и на моделях животных, но оказалось неэффективным в клинических тестах против экспериментальной инфекции вируса А (H1N1). Несколько метаболитов этого ге-

тероцикла были обнаружены в экспериментах на клетках млекопитающих, а также животных, и структура трех метаболитов была установлена (схема 11). Следует отметить, что 1-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)мочевина (**68**), которая является главным метаболитом у мышей и крыс, не обнаружила активности в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Было найдено, что пурин-нуклеозидфосфорилазы из селезенки теленка и эритроцитов человека, а также бактериальный фермент (Sigma, N-8265) катализируют превращение тиадиазольного гетероцикла в присутствии  $\alpha$ -D-рибофуранозо-1-фосфата (**47**) в  $N^4$ - и  $N^3$ -рибозиды (**66**) и (**67**) (37°C, 20–70 ч, 2–200 ед. PNP; соотношение  $N^4$ - и  $N^3$ -рибозидов  $\approx 1 : 3$  (60–65% суммарный выход) при высоких концентрациях PNP и  $\approx 3 : 1$  (12–14% суммарный выход) при низких концентрациях PNP) [89]. Интересно, что образование мезоионного [88] или ионного (как показано на схеме 11)  $N^4$ -рибозида (**66**) протекает, по-видимому, необратимо, тогда как  $N^3$ -рибозид (**67**) оказался субстратом PNP.

Нельзя не отметить некоторые удивительные находки этого блестящего исследования. Во-первых, тиадиазольное основание проявляет широкий спектр противовирусной активности *in vitro* и в моделях на животных против ортомиксо- и парамиксовирусов; при оральном или внутривенном введении, а также в качестве аэрозоля защищает мышей против летальных вирусных инфекций гриппа А или В, однако не проявляет токсичности и активности против гриппа в фазе I изучения на здоровых волонтерах [89]. Во-вторых, результаты по фармакокинетике тиадиазольного основания также отличаются большим разнообразием. В-третьих, в отличие от изложенного выше, PNP млекопитающих и бактериальной природы проявляют близкое каталитическое подобие в реакции рибозилирования основания, несмотря на хорошо известные различия субстратных свойств двух указанных типов PNP в отношении природных субстратов. Эти данные указывают на то, что  $N$ -(1,3,4-тиадиазол-2-ил)цианамид (**64**), не имеющий общих с природными субстратами структурных особенностей, обладает функциональностью, которая достаточна для реализации синтетической реакции, катализируемой двумя различными типами пурин-нуклеозидфосфорилаз. Тестирование новых гетероциклических оснований в качестве субстратов PNP может привести к обнаружению этой функциональности, что, в свою очередь, расширит представления о механизме функционирования и синтетических возможностях фермента.

Использование целых бактериальных клеток в качестве биокатализатора реакции трансгликозилирования (схема 5) предполагает, что клетки содержат UP, TP и PNP. У бактерий помимо указанных нуклеозидфосфорилаз были обнаружены некоторые другие фосфорилазы, представляющие интерес для ферментативного синтеза нуклеозидов. Например, нуклеозидфосфорилаза, выделенная из *Klebsiella* sp. штамм LF1202, обнаружила очень интересные свойства [90]. Она состоит из пяти идентичных субъединиц с молекулярной массой 25 000 Да, согласно SDS-ПААГ-электрофорезу, и проявляет активность пиримидин- и пурин-нуклеозидфосфорилаз. Инозин, аденозин (**5**), 2'-дезоксаденозин (**1**), гуанозин (**6**) и 2'-дезоксигуанозин (**2**) обнаружили одинаковые субстратные свойства (отн.



активность ≈100%) в фосфоролизе (величины  $K_m$  для инозина и неорганического фосфата ( $P_i$ ) равны соответственно 0.66 и 0.56 мМ); 2'-дезоксинозин оказался в 2.5 раза более активным субстратом; ксантозин и его 2'-дезоксипроизводное не обнаружили субстратных свойств. В реакции синтеза субстратные свойства гипоксантина и аденина были схожи (величины  $K_m$  для гипоксантина и α-D-рибофуранозо-1-фосфата (47) равны 0.45 и 0.14 мкМ соответственно); гуанин оказался несколько менее активным в синтетической реакции. Что касается пиримидиновых нуклеозидов, уридин оказался лучшим субстратом (отн. активность 368%) в сравнении с 2'-дезоксинуридином (95%) и тимидином (29%); близкие по величине константы Михаэлиса  $K_m$  были найдены для уридина (0.38 мМ) в реакции фосфоролиза и для урацила в синтетической реакции (0.44 мМ). Субстратная активность урацила в синтетической реакции с α-D-RF-1P и 2-деокси-α-D-рибофуранозо-1-фосфатом (48) равна соответственно 82 и 39%; тимин проявил несколько меньшую активность в реакции с 1-фосфатом (48) (17%); цитидин и 2'-дезоксцитидин, а также цитозин не обнаружили субстратной активности в ферментативных реакциях.

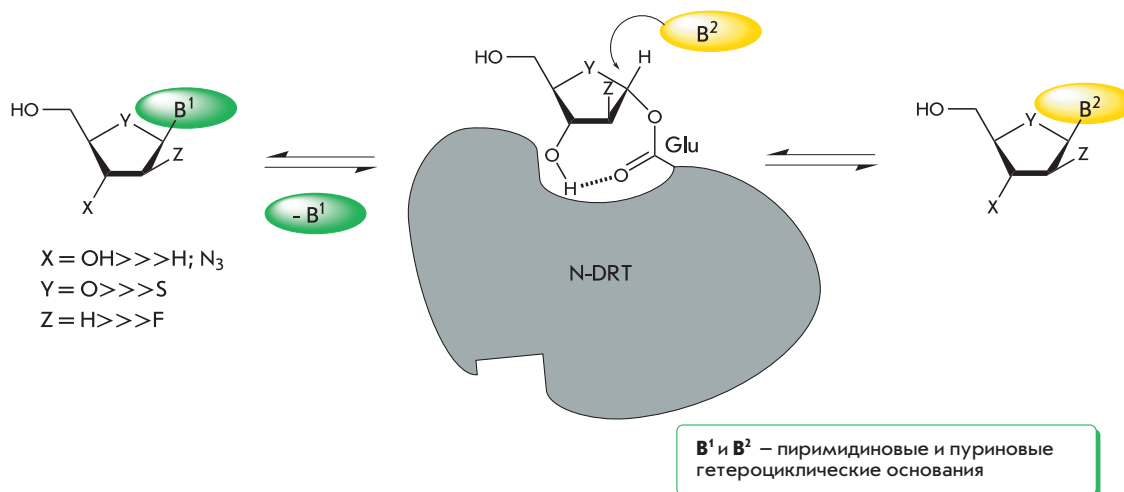
Нуклеозидфосфорилаза *Klebsiella* sp. была использована для синтеза аА из аU и аденина (молярное соотношение 3 : 1). По данным ТСХ, в оптимизированных условиях реакции (0.1 М К-фосфатный буфер, рН 8.0; в 1 мл реакционной смеси: концентрация аденина 6.7 мМ и 0.86 ед. фермента; 50°C, 30 ч) ≈90% аденина превращается в аА [90].

Ширае и Екозэки (H. Shirae & K. Yokozeki) выделили из *Erwinia carotovora* AJ 2992 фермент, катализирующий

фосфоролиз оротидина (OrP), и изучили его свойства [91]. Оротидин подвергался необратимому фосфоролизу до оротовой кислоты и 1-фосфата (47), и фермент не обнаружил строгой специфичности. Действительно, уридин оказался на два порядка более активным субстратом в сравнении с оротидином (отн. активность соответственно 100 и 1%); более того, 5-метилуридин (10%), аU (11%), 2'-дезоксинуридин (22%), 3'-дезоксинуридин (11%) и 2',3'-дидезоксинуридин (1%) оказались субстратами препарата OrP. Уридинфосфорилаза присутствовала в препаратах OrP на каждой стадии очистки OrP, и авторам не удалось разделить два типа активности. Обе активности проявлялись в виде одной полосы при SDS-ПААГ-электрофорезе, что позволяет предположить идентичность двух белков. Очищенный фермент имел молекулярную массу 68000 ± 2000 Да, что предполагает димерную структуру. Наиболее интересное наблюдение состоит в том, что оптимальные температуры и значения рН фосфатного буфера составляют 60°C и 6.0 для оротидинфосфорилазной активности и 70°C и 7.0 для уридинфосфорилазной. В целом, несмотря на различия в оптимальных условиях проявления двух активностей, можно предположить, что препарат фермента из *E. carotovora* AJ 2992 представляет собой UP с широким спектром субстратной специфичности.

N-Дезоксирибозилтрансферазы [DRT; нуклеозид:пури-(пиримидин)-дезоксирибозилтрансферазы; КФ 2.4.2.6] представляют собой другой тип ферментов, которые имеют большое значение как биокатализаторы синтеза нуклеозидов (обзор пионерских работ см. [92]). В отличие

Схема 12



от нуклеозидфосфорилаз, DRT катализируют прямой перенос фрагмента дезоксирибозы между нуклеозидом и гетерооснованием-акцептором без промежуточного образования фосфата 2-дезоксид-*D*-рибофуранозы. Реакция протекает через промежуточное образование ковалентно связанного остатка 2-дезоксид- $\alpha$ -*D*-рибофуранозы, гликозидный гидроксил которой и карбоксил глутаминовой кислоты активного центра фермента образуют сложноэфирную связь (схема 12) (см. [93] и работы, цитированные в этой статье).

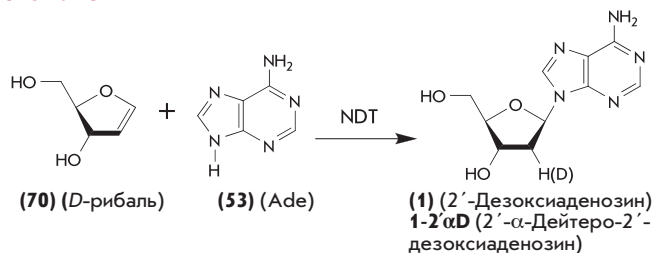
DRT присутствуют главным образом в некоторых видах бактерий семейства *Lactobacillus* и были первоначально обнаружены МакНаттом (*W.S. MacNutt*) [94] в *Lactobacillus helveticus* и выделены Рущем и Бетцом (*A.H. Roush & R.F. Betz*) [95]; позднее DRT была очищена из *L. leichmanii* Бекком и Левиным (*W.S. Beck & M. Levin*), и ее свойства были изучены [96]. Бактерии *Lactobacillus* содержат белки с двумя типами ферментативной активности, которые были первоначально выделены Холгиным и Кардино (*L. Holguin & R. Cardinaud*) аффинной хроматографией из *L. helveticus*: DRT класса I (другое название пурин-дезоксидрибозилтрансфераза, PDT), которые специфично переносят остаток 2-дезоксид-*D*-рибофуранозы от пуринового нуклеозида к пуриновому основанию, и DRT класса II (другое название нуклеозид-дезоксидрибозилтрансфераза, NDT), катализирующие перенос 2-дезоксид-*D*-рибофуранозы между пурин-пуринами, пиримидин-пиримидинами и пурин-пиримидинами [97]. В ранних работах по субстратной специфичности DRT были обнаружены (i) строгая специфичность в отношении 2-дезоксид-*D*-рибофуранозы и отсутствие субстратных свойств у  $\beta$ -*D*-рибонуклеозидов [92], (ii) весьма широкая толерантность DRT в отношении различных модификаций природных пуринов [96, 98, 99], (iii) субстратная активность цитозина в качестве акцептора 2-дезоксид- и 2,3-дидезоксирибозидных фрагментов и соответствующих пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов в качестве доноров углеводных остатков [100] (см. обзор [24]).

Несколько очень интересных наблюдений с точки зрения возможного практического использования DRT было сде-

лано в течение двух последних десятилетий. Так, Д.А. Карсон и Д.Б. Вассон (*D.A. Carson & D.B. Wasson*) изучили субстратную специфичность NDT *L. helveticus* (ATCC, #8018), очищенной согласно [96], и нашли, что фермент обладает широкой специфичностью как в отношении доноров углеводного фрагмента, так и пуриновых и пиримидиновых акцепторов [100]. Тестируя 2',3'-дидезокси- $\beta$ -*D*-нуклеозиды (ddN) в качестве доноров углеводного фрагмента (ацетатный буфер, pH 6.0, эквимолярное соотношение донора и акцептора, 37°C), авторы обнаружили исключительно высокую активность цитозина в качестве акцептора (16–60 нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> фермента; донорскую активность в ряду dT > ddG > ddC > ddA > ddI); а также определили донорскую активность 2',3'-дидезоксицитидина (ddC) и 3'-дезокситимидина (dT) в пределах 2.2–11.6 нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> фермента для аденина, гуанина и гипоксантина в качестве акцепторов.

Первая рекомбинантная NDT из *L. leichmanii* (DRTII) была получена Куком и сотр. (*W.J. Cook et al.*) [101], которые изучили также биохимические свойства фермента [102–104] и архитектуру его активного центра [105]. В нативном состоянии фермент представляет собой гексамер и состоит из идентичных субъединиц, и две субъединицы образуют полный каталитический центр. Вольфенден и сотр. (*R. Wolfenden et al.*) обнаружили лиазную активность у NDT *L. leichmanii* и нашли, что промежуточное 1-*O*-глутамилпроизводное 2-дезоксид- $\alpha$ -*D*-рибофуранозы распадается в отсутствие гетероциклического основания с образованием *D*-рибала. Последний стереоспецифически реагирует с аденином под действием NDT *L. leichmanii*, давая 2'-дезоксидаденозин в водном растворе и его 2'- $\alpha$ -дейтериевое производное в D<sub>2</sub>O (схема 13) [102]. Подобным же образом синтезировались тимидин и 2'-дезоксидуридин из *D*-рибала и соответствующих гетерооснований. Практическое использование результатов этого исследования для химико-ферментативного синтеза 2'- $\beta$ -*D*-дезоксинуклеозидов не было до сих пор изучено, однако развитие работ в этом направлении представляется важным в свете доступности *D*-рибала посредством химических методов (см., напр., [106, 107]) и рекомбинантного фермента.

Схема 13



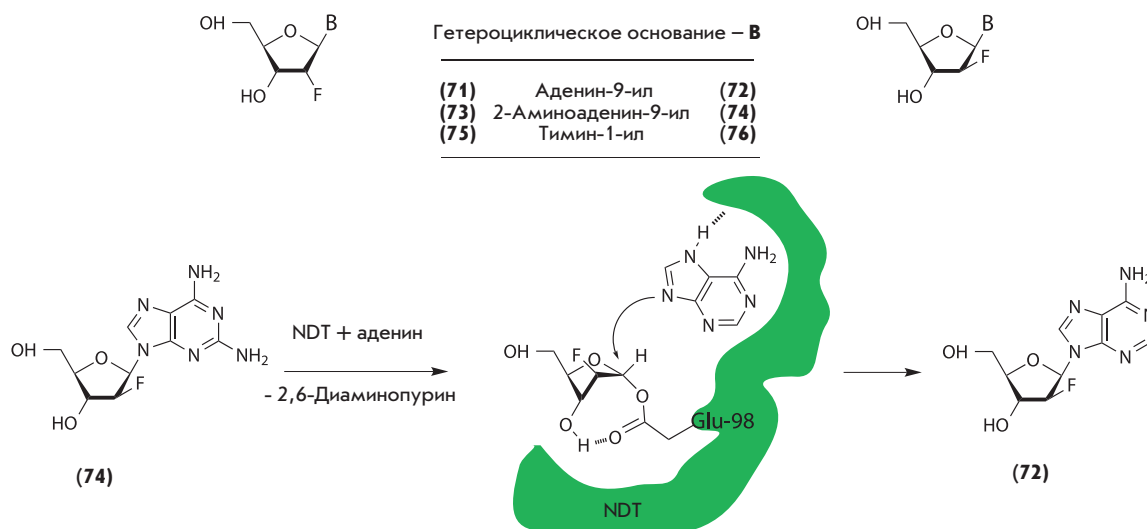
**NDT** — нуклеозиддеоксирибозилтрансфераза, выделенная из *Lactobacillus leichmanii*; D-рибаль (0.155 ммоль) + аденин (0.093 ммоль) + фермент (2.84 мг) в 0.1 М К-фосфатном буфере (2.9 мл, pH 5.7); 37°C. H<sub>2</sub>O — 3 ч; D<sub>2</sub>O — 32 ч

Следует отметить, что рекомбинантная NDT *L. leichmanii* катализирует стерео- и региоспецифичный перенос 3-азидо-2,3-дидезокси-β-D-рибофуранозы от AZT на 2-амино-6-замещенные пуриновые основания (50 мМ Na-цитратный буфер, pH 6.0; 50°C, 21–28 сут) с образованием соответствующих пуриновых N<sup>9</sup>-β-D-нуклеозидов с умеренным выходом. Тот же фермент был использован в качестве биокатализатора для синтеза пуриновых 4'-тионуклеозидов [104]. 2'-Дезокси-4'-тиоуридин (в виде смеси с α-аномером, полученной химическим гликозилированием урацила) был использован в качестве донора углеводного фрагмента в реакции трансгликозилирования ряда пуриновых оснований под действием NDT (50 мМ цитратный буфер, pH 6.0; 50°C, 5 сут). Индивидуальные 9-(2'-дезоксид-4'-тио-β-D-рибофуранозил)пурины были получены с выходом 5–58% после трудоемкой обработки реакционной смеси и хроматографии. Следует отметить, что тимидин- и пури-нуклеозидфосфорилазы в качестве катализаторов реакции трансгликозилирования дали негативный результат.

Идентификация глутаминовой кислоты-98 (Glu-98) в качестве нуклеофила активного центра рекомбинантной

NDT *L. leichmanii* была осуществлена Портером и сотр. (D.J.T. Porter et al.) [108]. Авторы детально изучили взаимодействие четырех пар изомерных нуклеозидов, а именно 9-(2-дезоксид-2-фтор-β-D-рибо(арабино)-фуранозил) аденинов (71) и (72), 2-амино-9-(2-дезоксид-2-фтор-β-D-рибо(арабино)фуранозил)аденинов (73) и (74), 1-(2-дезоксид-2-фтор-β-D-рибо(арабино)фуранозил)тиминов (75) и (76) и 9-(β-D-арабинофуранозил)гуанина ((21); aG). Инкубация фермента (2 мкМ) с арабинозилнуклеозидами (72), (74) или aG (каждый в концентрации 100 М) при 25°C в течение 20 мин приводила к ингибированию трансферазной активности соответственно на 91, 72 и 21%; тиминовые нуклеозиды не ингибировали фермент. Ферменты, активность которых была подавлена, содержали стехиометрическое количество ковалентно связанной 2-дезоксид-2-фтор-D-арабинозы, и их активность восстанавливалась при обработке аденином, при этом одновременно образовывался арабинозид аденина (72). Результаты протеолиза ингибированного фермента позволили предположить, что γ-карбоксильная группа глутаминовой кислоты-98 этерифицируется в процессе катализа (схема 14). Наконец, рекомбинантный фермент, Glu-98-остаток которого заменен на аланиновый, оказался на три порядка менее активным в сравнении с рекомбинантным ферментом нативной структуры.

Позднее Камински (P.A. Kaminski) получил рекомбинантные PDT и NDT *L. helveticus* и установил, что полипептиды обнаруживают 25.6% идентичности в области связывания субстрата с Glu-98 активного центра фермента [109]. Оба фермента катализировали превращение 2-аминопурина и 2,6-диаминопурина в соответствующие 2-дезоксид-β-D-рибонуклеозиды со скоростью, сравнимой с таковой для природных пуриновых оснований. 4-Аминоимидазол-5-карбоксамид (AICA) и имидазол-5-карбоксамид (ICA) оказались плохими субстратами, и их 2-деоксирибозилирование требовало больших количеств фермента и продолжительного времени инкубации. Следует отметить, что специфичная активность PDT была выше таковой



**NDT** — рекомбинантный фермент *L. leichmanii*

Схема 14

для NDT во всех четырех изученных реакциях трансгликозилирования (экспериментальные детали не были приведены).

Структура рекомбинантной 2'-дезоксирибозилтрансферазы *L. helveticus* (PDT) была определена рентгеноструктурным анализом [93], при этом было найдено некоторое ее подобие со структурой NDT *L. leichmanii* [105]. Было установлено, что в случае PDT *L. helveticus* нуклеофилом активного центра фермента является остаток Glu-101, который атакует гликозидный атом углерода нуклеозида, при этом атом кислорода при C3' фуранозного фрагмента участвует в образовании водородной связи с одним из атомов кислорода карбоксильной группы Glu-101 (схема 12). Гликозилированная структура PDT, образующаяся в результате инкубации фермента с арабинозидом аденина (72), содержит остаток 2-дезоксидефтор- $\alpha$ -D-арабинофуранозы, ковалентно связанный с другим из атомов кислорода остатка Glu-101. Сравнение структур комплексов PDT-2'-дезоксидефтор- $\alpha$ -D-арабинофуранозы и NDT-6-селеноинозин (в той же работе [105]) позволило объяснить специфичность PDT в отношении 2'-дезоксинуклеозидов, а именно атомы кислорода при C2' и C3' рибонуклеозида участвуют в образовании водородной связи с Glu-101, делая невозможным формирование промежуточной структуры с ковалентно связанным углеводным остатком (ср., схема 12).

Недавно Каминским и сотр. было проведено очень интересное исследование, направленное на поиск NDT с улучшенной активностью в отношении синтеза пуриновых 2',3'-дидезоксинуклеозидов [110]. Авторы сконструировали библиотеку случайных мутантов *ndt*-генов *L. leichmanii* (*Ll*) и *L. fermentum* (*Lf*) с вариабельной частотностью нуклеотидных замен (между 1 и 10 на 1 последовательность). Кроме того, авторы разработали метод функционального скрининга и провели селекцию мутантов, пригодных для синтеза 2',3'-дидезоксинуклеозидов. Оказалось, что нуклеотидная последовательность соответствующих генов содержит единичную замену (G3A), которая приводит к замене алифатической аминокислоты на кислоту, содержащую гидроксильную группу, а именно Ala15 на Thr (*L. fermentum*) или Gly9 на Ser (*L. leichmanii*). Единственная замена оказалась достаточной для усиления активности в отношении дидезоксинуклеозидных субстратов. Авторы заключили, что активность, отвечающая за перенос 2,3-дидезоксирибозильного остатка, предполагает наличие дополнительной гидроксильной группы у остатка в положении 9 (*Ll*) или 15 (*Lf*) с тем, чтобы компенсировать отсутствие такой группы в молекуле субстрата. Оба мутантных фермента обнаружили также более высокий уровень трансферазной активности в отношении 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезокси- $\beta$ -D-рибофуранозилнуклеозидов. Было установлено (без экспериментальных деталей), что *Lf*-NDT-A15T-фермент катализирует на уровне миллимоль и с хорошим выходом (до 70%) синтез 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиаденозина и 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиинозина при использовании 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиуридина (d4U) в качестве донора пентофуранозного остатка [110].

Сравнение реакций трансгликозилирования, катализируемых частично очищенным ферментом NDT *L. helveticus* [111] или пуридиннуклеозидфосфорилазой *E. coli* (Sigma),

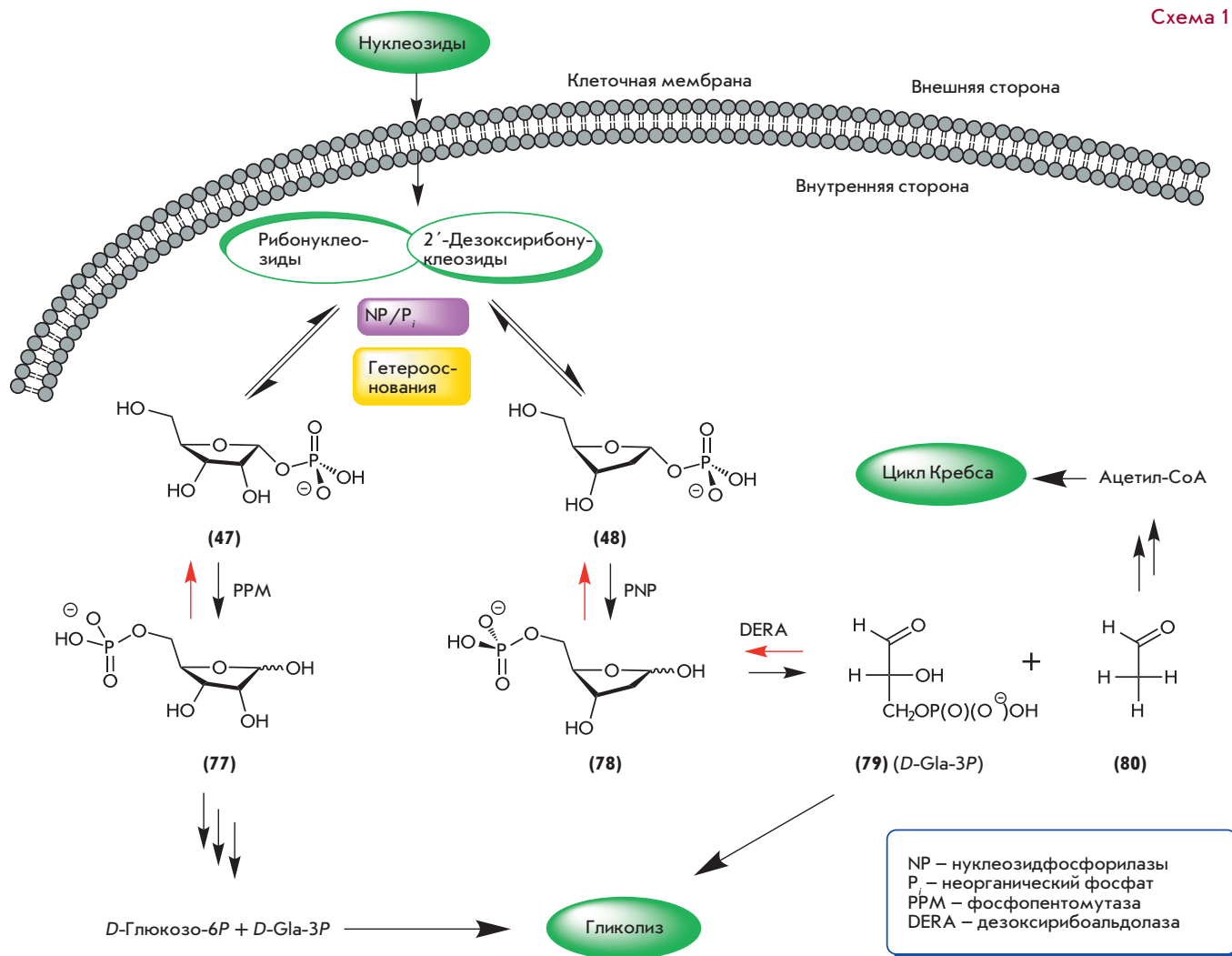
дало неожиданный результат [112, 113]. Не вдаваясь в подробности, авторы показали, что реакции, катализируемые NDT, протекают с большей региоселективностью, чем катализируемые PNP, и этот результат сильно зависит от структуры гетерооснования-акцептора (см. также [24]).

Помимо *Lactobacilli*, *N*-дезоксирибозилтрансферазы были выделены из простейших одноклеточных паразитов *Critinia lucilliae* (см., напр., [109]) и *Trypanosoma brucei* (см. [114, 115] и работы, цитированные в [114]). Фермент из *T. b. brucei* был очищен в 400 раз до >95% гомогенности из формы, паразитирующей в крови, и его свойства были изучены [79]; позднее был получен также рекомбинантный фермент [80]. В отличие от ферментов *Lactobacilli*, фермент *T. b. brucei* оказался *N*-рибо-гидролазой с рибонуклеозидгидролазной активностью преимущественно в отношении инозина, аденозина и гуанозина в качестве субстратов. Величины  $k_{cat}/K_m$  для рекомбинантного фермента и инозина, аденозина и гуанозина в качестве субстратов были определены равными соответственно ( $\times 10^6$   $M^{-1} \cdot c^{-1}$ ) 1.6, 1.4 и 0.7. Пиримидины и 2'-дезоксинуклеозиды оказались плохими субстратами со значениями  $k_{cat}/K_m$  порядка  $10^3$   $M^{-1} \cdot c^{-1}$  и  $10^2$   $M^{-1} \cdot c^{-1}$  соответственно. 3-Дезазааденозин, 7-дезазааденозин (Туберцидин) и формицин В ингибировали фермент с константами ингибирования  $K_i$ , равными соответственно 1.8, 59 и 13 мкМ. Насколько нам известно, фермент не был использован до сих пор для синтеза нуклеозидов.

Суммируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что химико-ферментативная (биотехнологическая) стратегия вытесняет многостадийные химические процессы, позволяет осуществлять ключевые превращения с высокой эффективностью, регио- и стереоселективностью. Значительный прогресс в получении биологически важных аналогов природных нуклеозидов достигнут благодаря рациональной комбинации химических методов и биохимических превращений. Использование рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз и *N*-дезоксирибозилтрансфераз в качестве биокатализаторов синтеза природных нуклеозидов и их модифицированных аналогов представляет значительный интерес для создания современных технологических процессов. Следует подчеркнуть, что обе группы ферментов удачно дополняют друг друга и позволяют найти более рациональный путь синтеза желаемого продукта. Несомненно, что использование химико-ферментативной методологии позволяет улучшить соотношение цена-качество в производстве ряда лекарств.

#### НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В BIOTEKHOLOGIIH NUKLEOZIDOV

В течение последнего десятилетия был опубликован ряд работ, которые дают новый импульс развитию биотехнологии нуклеозидов. Большое внимание уделено использованию  $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфатов в качестве субстратов ферментативного синтеза нуклеозидов. Следует подчеркнуть, что ферментативный и химический синтезы *D*-пентофуранозо-1-фосфатов имеют богатую историю (см. [24]). Однако только в последнее время было опубликовано несколько интересных с точки зрения потенциального практического использования сообщений. В этой области следуют в первую очередь отметить два направления исследований, а именно: (i) биохимический (микробиологи-



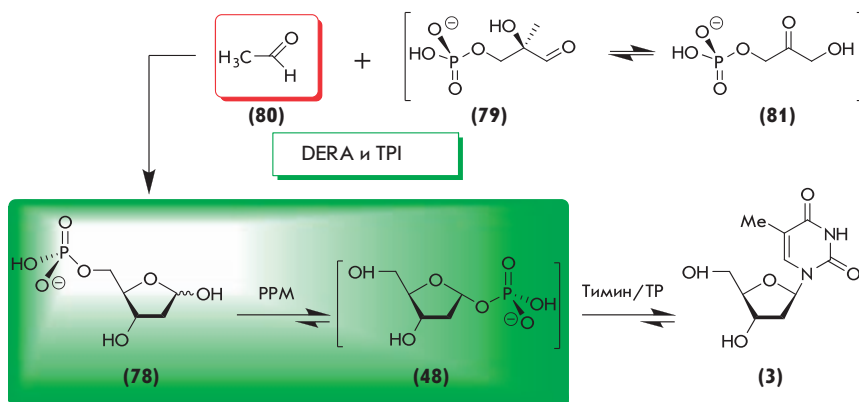
ческий, ферментативный) *ретро*-синтез 2'-дезоксирибонуклеозидов и (ii) химический синтез *D*-пентофуранозо-1-фосфатов и их последующая ферментативная конденсация с гетероциклическими основаниями.

Метаболические превращения пентоз изучены довольно обстоятельно (см., напр., обзор [116]). Нуклеозиды рассматриваются и для бактерий, и для клеток эукариот как носители углеводов, которые служат источником углерода и энергии.  $\alpha$ -*D*-Рибофуранозо-1-фосфат (47) получается главным образом из пуриновых нуклеозидов под действием PNP; далее фосфат (47) включается в (i) гликолиз, (ii) метаболическую активацию пиримидиновых гетерооснований с образованием рибонуклеозидов (например, превращение 5-фторурацила в 5-фторуридин, катализируемое УФ) и (iii) ферментативное равновесное превращение под действием фосфопентомутазы (PPM) в *D*-рибофуранозо-5-фосфат (77), который, помимо участия в гликолизе и пентозофосфатном цикле, является предшественником 5-фосфо- $\alpha$ -*D*-рибофуранозил-1-пирофосфата (PRPP). Последний служит донором остатка 5-фосфо-*D*-рибофуранозы в син-

тезе нуклеозидов *de novo* и используется 5-фосфорибозил-трансферазами в «утилизации» пуриновых и пиримидиновых гетерооснований («salvage»-синтез). Катаболические превращения 2'-дезоксинуклеозидов протекают также под действием нуклеозидфосфорилазы и PPM, при этом образующийся 2-деокси-*D*-рибофуранозо-5-фосфат (78) необратимо метаболизирует далее в *D*-глицеральдегид-3-фосфат ((79); Gla-3P) и ацетальдегид (80) под действием бактериальных и эукариотических дезоксирибоальдоз (схема 15).

Возможность реверсивного *ретро*-пути синтеза нуклеозидов, исходя из Gla-3P и ацетальдегида, была изучена Раапом и сотр. (J. Raap et al.) [117, 118]. Авторы описали двухстадийное ферментативное гликозилирование в одной колбе тимина и урацила (меченные  $^{13}\text{C}$ - и  $^{15}\text{N}$ -атомами) с помощью 2-деокси- $\alpha$ -*D*-рибофуранозо-1-фосфата ((48)); также меченного  $^{13}\text{C}$  в различных положениях) с использованием коммерческой ТР. Синтез 1-фосфата (48) был осуществлен из 2-деокси-*D*-рибофуранозо-5-фосфата (78) посредством стереоспецифичной C5  $\rightarrow$  C1-транслокации

Схема 16



**DERA** – D-2-дезоксидезоксирибоза-5-О-фосфата альдозаза была выделена из суперпродуцирующего штамма *E. coli* DH5a (ATCC 89963)

**TPI** – триозофосфатизомераза из пекарских дрожжей (Sigma); (81) (2.5 ммоль), ацетальдегид (200 ммоль), DERA (300 ед.) и TPI (700 ед.); инкубация при 20°C в течение 2 ч приводила к образованию (78) (2.0 ммоль)

**PPM** – выделена из суперпродуцирующих клеток *E. coli* и частично очищена (12 000 ед. на 84 мг белка; 1 ед. превращает 1 ммоль 5-фосфата (78) в 1-фосфат (48) за 1 мин); оптимальная активность PPM достигалась в присутствии  $\text{Mn}^{2+}$  и D-глюкозо-1,6-дифосфата

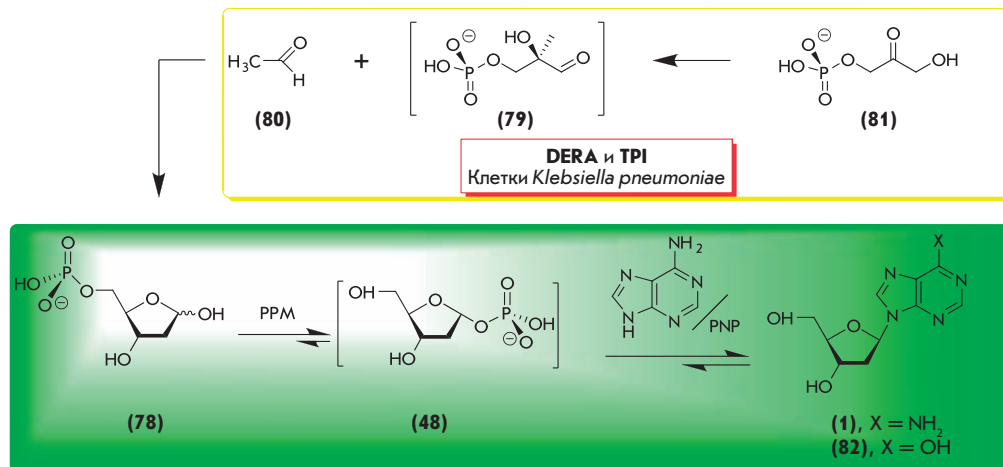
**TP** – тимидинфосфорилза *E. coli* (Sigma); инкубация 5-фосфата (78) (0.1 моль) и тимина (0.4 моль) в присутствии PPM (100 ед.) и ТФ (25 ед.) при 43°C в течение 1.5 ч приводила к образованию тимидина (3) (61 ммоль; 61%)

фосфата, катализируемой частично очищенной рекомбинантной PPM. В свою очередь,  $^{13}\text{C}$ -меченные 5-фосфаты были получены из дигидроксиацетонмонофосфата (81) в присутствии избытка ацетальдегида под действием дезоксирибозальдозазы (DERA) и коммерческой триозофосфатизомеразы (TPI, из пекарских дрожжей). Дигидроксиацетонмонофосфат был получен химическим способом. Превращение (78) → (48) и конденсацию с тиминном или ура-

цилом проводили в одной колбе и соответствующие 2'-дезоксирибонуклеозиды были получены в индивидуальном виде с выходом 50–60% (схема 16). Следует подчеркнуть, что огромный избыток ацетальдегида был использован для того, чтобы сместить метаболическую реакцию в обратном, синтетическом направлении.

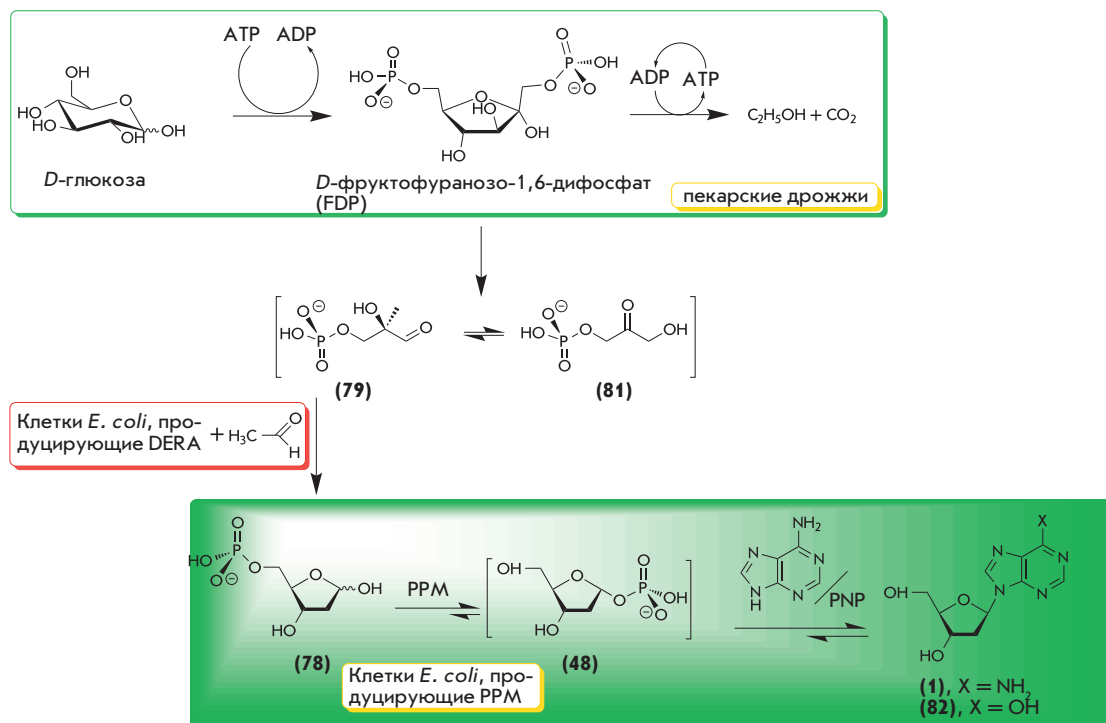
Подобный подход был использован Огавой и сотр. (*J. Ogawa et al.*) для синтеза 2'-дезоксинуклеозидов из ди-

Схема 17



**TPI и DERA** – триозофосфатизомераза и D-2-дезоксидезоксирибоза-5-О-фосфатаза клеток *Klebsiella pneumoniae* B-4-4; инкубация (81) (117 ммоль) и (80) (200 ммоль) в присутствии отцентрифугированных клеток (16.6% по весу) при 30°C в течение 2 ч давала 5-фосфат (78) (84.3% на взятый в реакцию (81))

**PPM и PNP** – рекомбинантные фосфопентомутаза генетически модифицированных суперпродуцирующих клеток *E. coli* pTS17/BL21 + пуридин-нуклеозидфосфорилза (Sigma) (инкубация 5-фосфата (78) (25 ммоль) и аденина при 30°C в течение 3 ч приводила к образованию (ВЭЖХ) 2'-дезоксидезоксиаденозина ((1), 0.6 ммоль) и 2'-дезоксидезоксиаденозина ((2), 9.7 ммоль) и 2'-дезоксидезоксиаденозина ((1), 0.6 ммоль); 2'-дезоксидезоксиаденозин (2) образовывался из первоначального продукта реакции 2'-дезоксидезоксиаденозина (1) под действием аденозиндезаминазы (ADA), присутствующей в клетках *E. coli*)



гидроксиацетонмонофосфата и ацетальдегида через промежуточное образование 5-фосфата (78) [119, 120]. Авторы отселектировали *Klebsiella pneumoniae* B-4-4 для эффективного синтеза 5-фосфата (78), который был превращен в 1-фосфат (48) в присутствии трансформированных клеток *E. coli*, *E. coli* pTS17/BL21, продуцирующих PPM *E. coli*. Без выделения в индивидуальном виде 1-фосфат (48) вводили в конденсацию с аденином в присутствии коммерческой PNP, и в результате были получены 2'-дезоксиаденозин (1) и 2'-дезоксиинозин (82) в соотношении  $\approx 1 : 16$ . Образование последнего в качестве основного продукта реакции объясняется присутствием в клетках *E. coli* pTS17/BL21 аденозиндезаминазы (ADA), которая дезаминирует первоначально образующийся 2'-дезоксиаденозин (1). Следует отметить, что штамм *K. pneumoniae* B-4-4 оказался толерантным к высокой концентрации ацетальдегида, смещающего обратимую реакцию, катализируемую DERA, в сторону синтеза 5-фосфата (78).

Позднее *Ogawa* и сопр. (*J. Ogawa et al.*) объединили алкогольную ферментацию пекарских дрожжей и DERA-продуцирующие клетки *E. coli* для синтеза 5-фосфата (78) [121–124]. Процедура синтеза 2'-дезоксирибонуклеозидов включала 4 стадии: 1 – в результате алкогольной ферментации дрожжей синтезируется фруктозо-1,6-дифосфат (FDP); 2 – DERA-продуцирующие клетки *E. coli* 10B5/pTS8 превращали FDP в равновесную смесь дигидроксиацетонмонофосфата (81) и *D*-глицеральдегид-3-фосфата (79); ферментативная конденсация (79) и ацетальдегида (высокая концентрация ацетальдегида необходима для предотвращения обратной реакции!) приводила к образованию 5-фосфата (78); 3 – последний превращался в 1-фосфат (48) под действием PPM-продуцирующих клеток *E. coli*

pTS17/BL21, и, наконец, стадия 4, которая проводилась в одной колбе в присутствии гетероциклического основания и при этом к реакционной смеси добавляли коммерческие препараты PNP или TP, так как активность этих ферментов в используемых клетках *E. coli* была недостаточной.

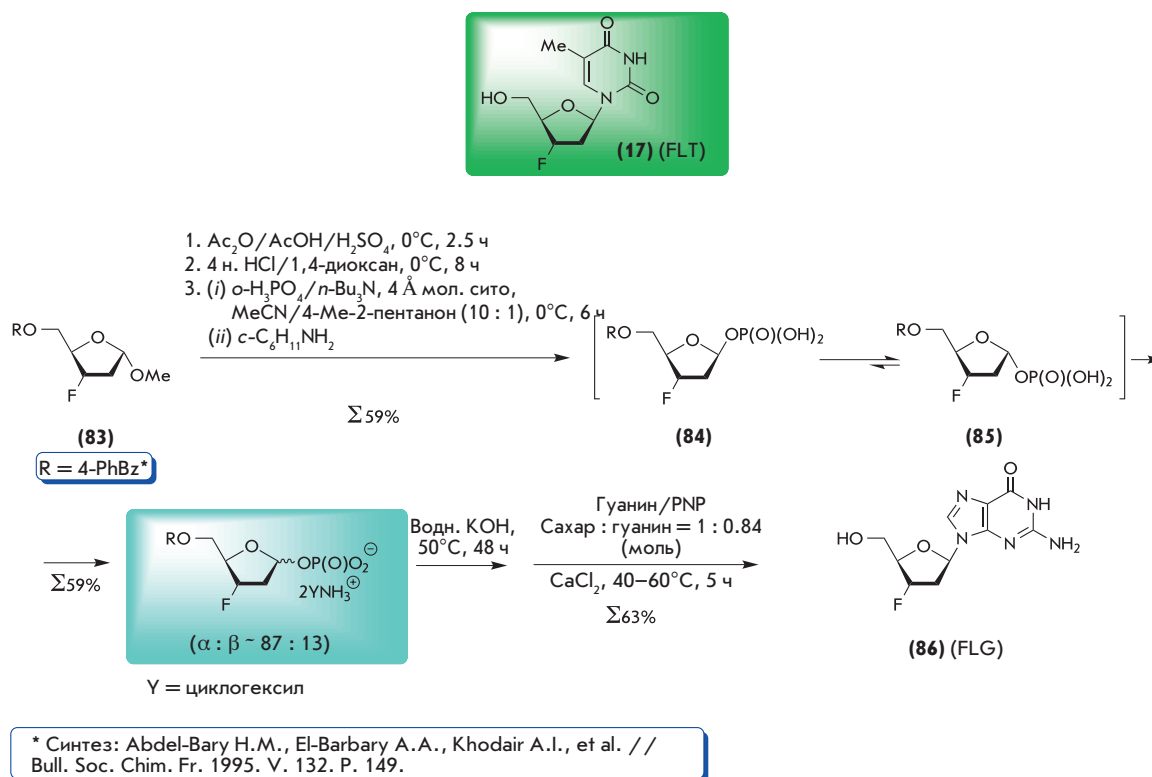
В случае синтеза 2'-дезоксиаденозина (1) также наблюдалось образование 2'-дезоксиинозина (82) в результате дезаминирования первого под действием аденозиндезаминазы использованных клеток *E. coli*. Ксилитол и полиоксипропиленлауриллин использовали для улучшения проницаемости клеток *E. coli*, что приводило к повышению выхода 5-фосфата (78).

Следует отметить, что микробный синтез [119–124] ограничен получением 2'-деокси- $\beta$ -*D*-рибонуклеозидов (выделение индивидуальных продуктов пока не описано). Кроме того, удовлетворительная растворимость гетероциклического основания в реакционной смеси является важной предпосылкой успешного синтеза нуклеозидов; так, например, очень низкая растворимость гуанина делает маловероятным синтез 2'-дезоксигуанозина. Следует также иметь в виду, что побочная ферментативная активность, присутствующая в используемых клетках, может препятствовать получению желаемого нуклеозида.

Второе направление исследований, химико-ферментативный синтез, заключается в химическом синтезе  $\alpha$ -*D*-пентофуранозо-1-фосфатов и их последующим использованием в ферментативной конденсации с гетероциклическими основаниями. Это направление представляется более разноплановым и привлекательным для синтеза биологически важных нуклеозидов, модифицированных по углеводному фрагменту и основанию. Действительно,  $\alpha$ -*D*-пентофуранозо-1-фосфаты являются универсаль-



Схема 19



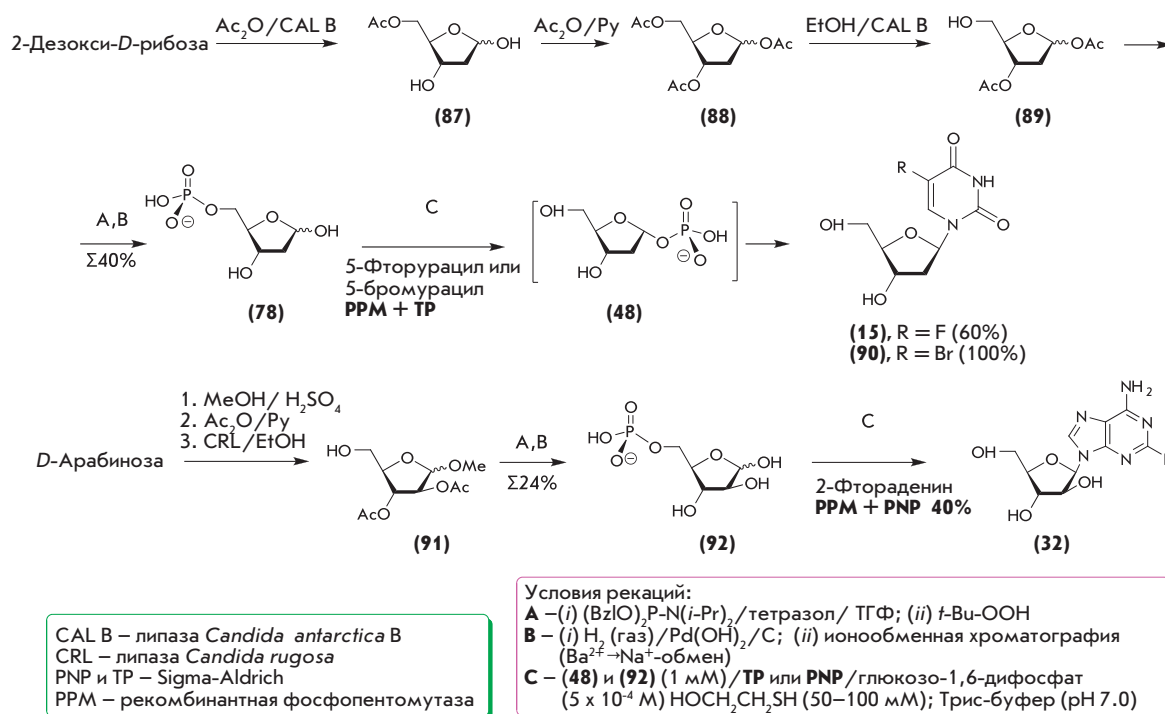
ными гликозилирующими агентами и могут быть использованы как для синтеза пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов, так и в реакции с любыми другими гетероциклическими основаниями, которые обнаружат субстратные свойства в отношении нуклеозидфосфорилата.

Возможность реализации этой стратегии была убедительно продемонстрирована практически одновременно с обнаружением нуклеозидфосфорилата и *N*-деоксирибозилтрансфераз. В этом контексте нельзя не упомянуть пионерские исследования по фосфорилизу и ресинтезу пуриновых 2'-деоксирибозидов под действием нуклеозидфосфорилата млекопитающих [40–49], выделение 2-деокси- $\alpha$ -*D*-рибофуранозо-1-фосфата (48) в виде кристаллической циклогексиламмониевой соли [24, 53] и синтез тимидина и ряда 5-замещенных пиримидиновых 2'-деоксирибонуклеозидов [57, 58]. Позднее был осуществлен химический синтез  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров *D*-рибофуранозо-1-фосфата и 2-деокси-*D*-рибофуранозо-1-фосфата (см., напр., [24]).

Группа исследователей изучила синтез нуклеозидов конденсацией  $\alpha$ -*D*-пентофуранозо-1-фосфатов с гетерооснованиями под действием нуклеозидфосфорилата [125–127]. Прежде всего, была разработана «индуцированная кристаллизацией асимметрическая трансформация» для стереоселективного синтеза 2-деокси- $\alpha$ -*D*-рибофуранозо-1-фосфата (48) и его  $\beta$ -*D*-аномера [125, 126]. Оба аномера были выделены в индивидуальном состоянии в виде стабильных бис(циклогексиламмониевых) солей, и однозначно было доказано, что первый является субстратом PNP, тогда как  $\beta$ -*D*-аномер, как и ожидалось, не обнаружил субстратной активности. 2-Дезокси- $\alpha$ -*D*-рибофуранозо-1-фосфат (48) был использован для синтеза 2'-деокси-2-

хлораденозина (Кладрибин) в одну стадию конденсацией с 2-хлораденином или в две стадии через промежуточное образование 9-(2-деокси- $\beta$ -*D*-рибофуранозил)-2,6-дихлораденина [128]. Этот метод был затем успешно распространен на синтез 2,3-дидезокси-3-фтор-5-*O*-(4-фенил)-бензоил-*D*-рибофуранозо-1-фосфата (в виде смеси  $\approx$ 87 : 13  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров (85) и (84)) из метил-2-деокси-*D*-рибофуранозида (83), и  $\alpha$ -аномер этой смеси был использован после удаления 5-*O*-защитной группы в качестве ключевого субстрата PNP для синтеза 2',3'-дидезокси-3'-фторгуанозина (86) путем ферментативного гликозилирования гуанина (схема 19) [127, 129].

Данная работа имеет огромное значение для дальнейшего развития этого направления исследований, так как она дает ясный ответ на вопрос: если потенциальный нуклеозид-донор, модифицированный в углеводном фрагменте, обнаружил исключительно низкую субстратную активность в отношении нуклеозидфосфорилата и не может служить донором (например, FLT (17) в отношении TP и UP), означает ли это, что соответствующий  $\alpha$ -*D*-пентофуранозо-1-фосфат (например, 1-фосфат 2,3-дидезокси-3-фтор- $\alpha$ -*D*-рибофуранозы) также будет лишен субстратных свойств в отношении нуклеозидфосфорилата. Известно, что ряд пиримидиновых нуклеозидов, легкодоступных химическими методами, не являются субстратами TP и/или UP и по этой причине не могут служить донорами пентоз. Химический синтез соответствующих  $\alpha$ -*D*-пентофуранозо-1-фосфатов и тестирование их субстратных свойств представляет значительный интерес. Работа Komatsu и сотр. (H. Komatsu et al.) [127] дает мощный импульс развитию исследований в этом направлении.



Недавно *Монтсеррат* и сотр. (*J.M. Montserrat et al.*) описали химико-ферментативный синтез нуклеозидов из *D*-рибозы, 2-дезоксид-*D*-рибозы и *D*-арабинозы [130]. Пентозы были превращены в 5-фосфаты (в виде натриевых солей) химическими методами с использованием в некоторых случаях липаз для введения/удаления защитных групп. Совместное действие PPM, которая катализирует превращение 5-фосфатов в 1-фосфаты, и конденсация последних с гетерооснованиями в присутствии PNP или TP приводили к образованию соответствующих нуклеозидов (схема 20).

Работа *Монтсеррат* и сотр. представляет значительный интерес как пример рационального химико-ферментативного синтеза *D*-пентофуранозо-5-фосфатов (ср., например, с данными работ [118, 119, 121–123]). В первую очередь следует отметить универсальность подхода

к синтезу *D*-пентофуранозо-5-фосфатов, так как использование липаз для региоселективного введения и удаления ацетильных защитных групп не лимитируется, по-видимому, изученными пентозами.

Значительный интерес представляет синтез 9-(2-дезоксид-2-фтор-β-*D*-арабинофуранозил)пуринов, описанный в работе *Ямада* и сотр. (*K. Yamada et al.*) [131, 132]. В этом случае отсутствуют простые и надежные методы синтеза потенциального донора углеводного фрагмента, и поэтому химический синтез 2-дезоксид-2-фтор-α-*D*-арабинофуранозо-1-фосфата (96) и его использование в качестве универсального гликозилирующего агента представляет резонную альтернативу химическому гликозилированию гетерооснований (схема 21). Исходным соединением служила коммерчески доступная

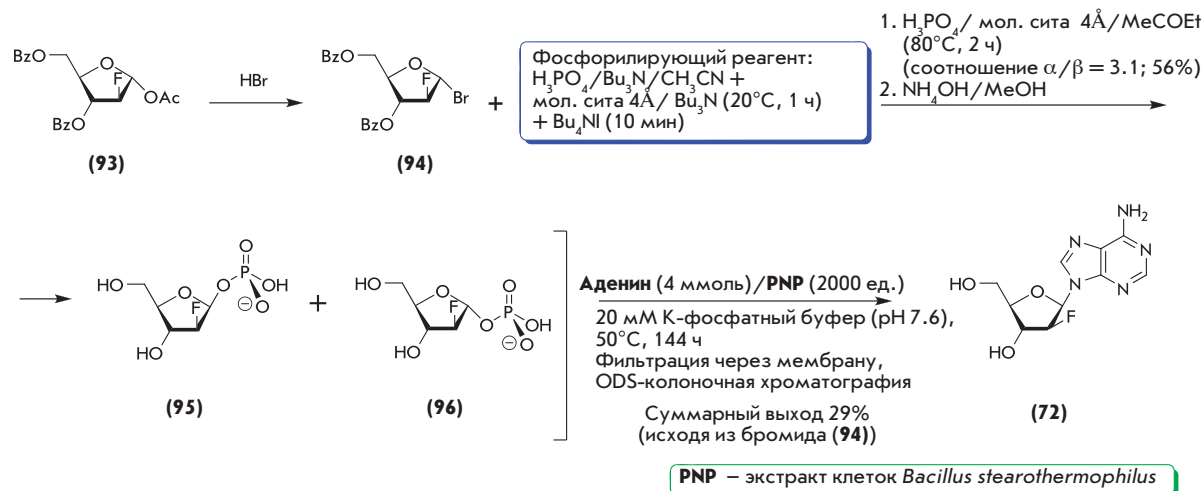
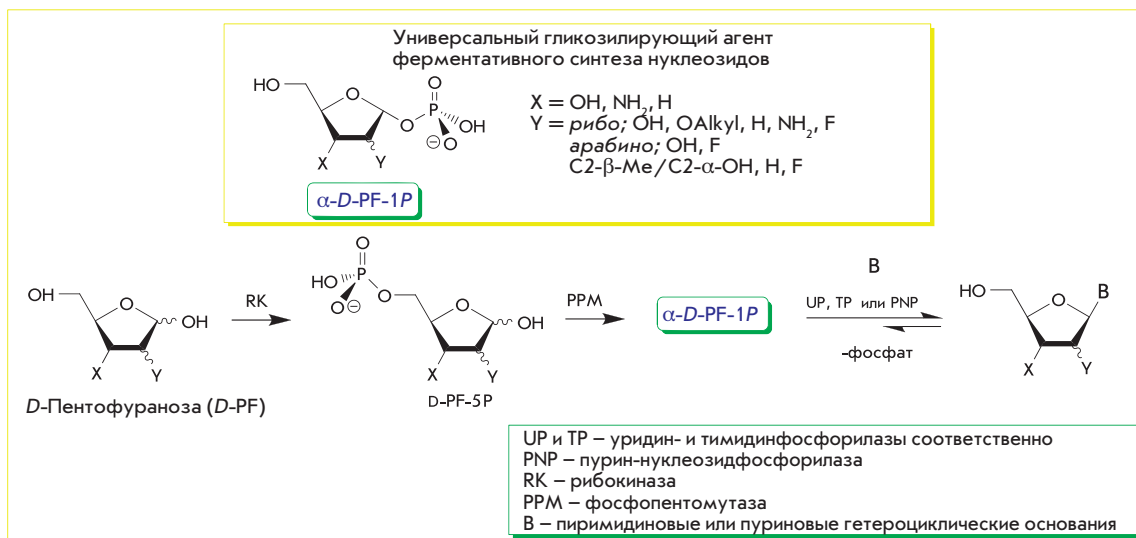


Схема 22



1-О-ацетил-3,5-ди-О-бензоил-2-дезоксид-2-фтор- $\alpha$ -D-арабинофураноза (93), которая была превращена в бромид (94) и далее в смесь  $\approx 3 : 1$   $\alpha$ - и  $\beta$ -фосфатов (96) и (95). Эта смесь без выделения в индивидуальном виде  $\alpha$ -аномера (96), который является субстратом PNP, была использована в синтезе N<sup>9</sup>-пуриновых 2-дезоксид-2-фтор- $\beta$ -D-арабинофуранозилнуклеозидов с удовлетворительным выходом. Следует иметь в виду, что химическое гликозилирование приводит в ряде случаев к образованию смесей аномеров (пурины и пиримидины) и региоизомеров (пурины) [11, 12].

Анализ приведенных выше результатов приводит к выводу, что узким местом этой стратегии получения нуклеозидов является трудоемкий и малоэффективный синтез  $\alpha$ -D-пентофуранозилфосфатов. Однако, несмотря на это, данная стратегия получения биологически важных нуклеозидов представляет несомненный интерес и может служить ценным дополнением к рассмотренным выше химико-ферментативным методам.

Недавно нами была предложена новая стратегия синтеза нуклеозидов, которая состоит в последовательном превращении пентоз в нуклеозиды в присутствии гетерооснований под действием рекомбинантных ферментов *E. coli*, а именно рибозиназы (RK) (D-пентоза  $\rightarrow$  D-пентозо-5-фосфат (D-PF-5P)), фосфопентомутаза (PPM) (D-PF-5P  $\rightarrow$   $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфат (D-PF-1P)) и нуклеозидфосфорилазы (NP) (D-PF-1P + гетерооснование  $\rightarrow$  нуклеозиды) (схема 22) [133].

Получение рекомбинантной RK, а также уридин- (UP), тимидин- (TP) и пурин-нуклеозидфосфорилаз (PNP) было описано нами ранее [134]. Было найдено, что RK катализирует в оптимальных условиях фосфорилирование первичной гидроксильной группы не только D-рибозы и 2-дезоксид-D-рибозы, но и D-арабинозы и D-ксилозы. Эти данные говорят о возможности использования RK в качестве биокатализатора первой стадии каскадного превращения пентоз в нуклеозиды. Стереоспецифичная C5  $\rightarrow$  C1-транслокация фосфата под действием PPM является резонным мостом в предложенной нами стратегии превра-

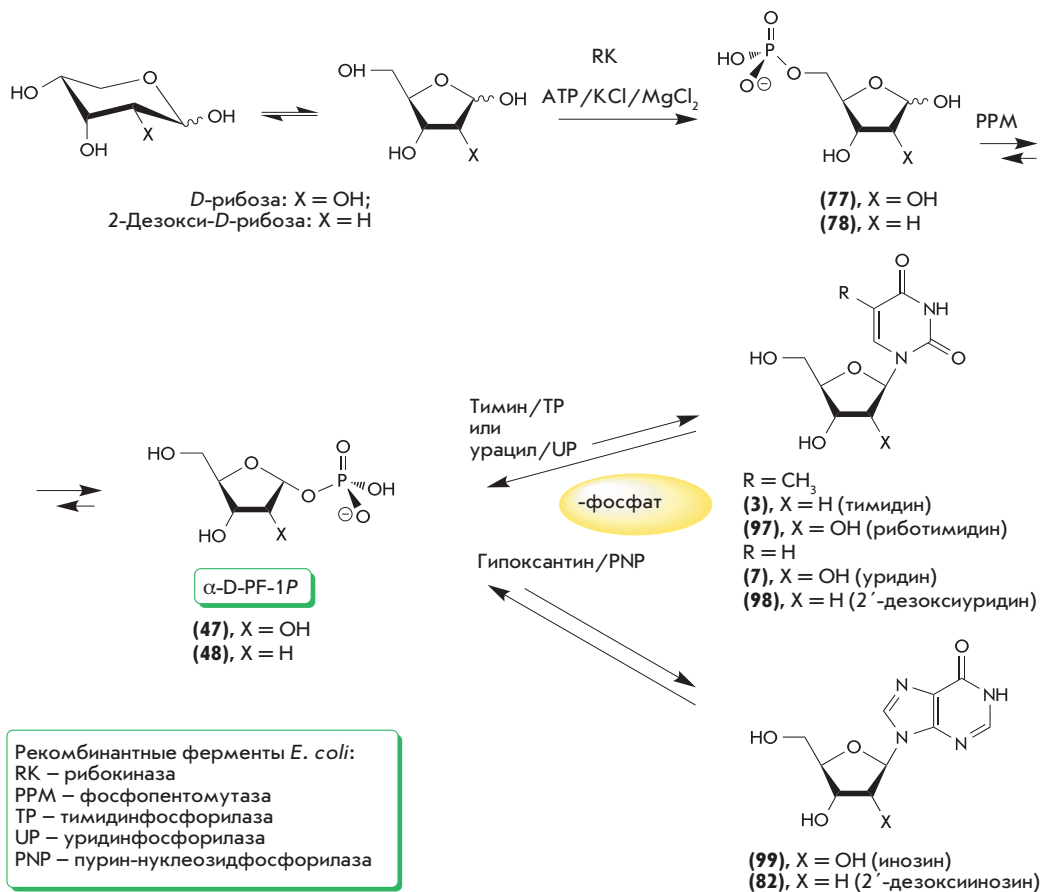
щения пентоз в нуклеозиды, и это обстоятельство побудило нас получить рекомбинантную PPM и тестировать возможность практической реализации идеи. Предварительные результаты превращения D-рибозы или 2-дезоксид-D-рибозы в пиримидиновые и пуриновые нуклеозиды под действием очищенных рекомбинантных *E. coli* RK, PPM и нуклеозидфосфорилаз были недавно опубликованы (схема 23) [135].

Анализ оптимальных условий реакции с участием RK [133], PPM и NP [134] обнаружил существенные различия. Принимая это во внимание, были выбраны компромиссные условия каскадного превращения пентоз в нуклеозиды в одной колбе, которые позволяют удовлетворительно функционировать всем используемым ферментам, а именно: общий объем реакционной смеси 2 мл; состав буферного раствора: 2 мМ ATP, 50 мМ KCl, 3 мМ MnCl<sub>2</sub>, 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 2 мМ пентоза, 2 мМ гетерооснование; температура реакции 20°C; ферменты (в соответствующих единицах): RK 7.65; PPM 3.9; TP 4.5; UP 5.4; PNP 4.68. Результаты превращения D-рибозы и 2-дезоксид-D-рибозы в пиримидиновые и пуриновые нуклеозиды представлены на схеме 23 и в табл. 1.

Таблица 1. Образование нуклеозидов в каскадном ферментативном синтезе в одной колбе при 20°C (содержание соответствующего нуклеозида (%)) в реакционной смеси в определенный отрезок времени)

Время реакции, ч	Инозин (99)	2'-Дезокси-инозин (82)	Тимидин (3)/2'-дезоксид-уридин (98)*	1-( $\beta$ -D-Рибофуранозил)-тимин (97) / уридин (7)*
0.5	45.9	18.8	14.5/0.9	4.7/27.6
1	46.1	27.3	17.6/1.1	8.5/26.6
24	38.4	38.3	-	-
44	-	-	34.7/33.2	19.9/17.5
96	29.4	34.4	-	-

\*Тимидинфосфорилаза (TP) и уридинфосфорилаза (UP) были использованы в синтезе нуклеозидов тимина и урацила соответственно.



Примечательно, что образование инозина происходит быстрее в сравнении с образованием  $2'$ -дезоксинузина и достигает максимального выхода через 30 мин. Следует отметить, что синтез  $2'$ -дезоксирибонуклеозидов пуринов и их аналогов протекал со значительно большей эффективностью в условиях реакции трансгликозилирования в сравнении с синтезом рибонуклеозидов [82–84]. Очевидно, что изученные условия каскадного превращения пентоз в нуклеозиды требуют тщательной оптимизации с тем, чтобы добиться высоких выходов желаемых продуктов. На примере синтеза Кладрибина (**31**) нами было показано, что при соотношении субстратов  $2$ -дезоксид- $D$ -рибозы и  $2$ -хлораденина (**100**) 1.5 : 1 (моль/моль) желаемый про-

дукт образовывался с выходом более 90% (схема 24) [136].

Как уже отмечалось выше, химический синтез  $\alpha$ - $D$ -пентофуранозо-1-фосфатов достаточно сложен для того, чтобы эти соединения нашли широкое применение для получения препаративных количеств нуклеозидов. Предварительные результаты каскадного превращения пентоз в нуклеозиды под действием трех ферментов говорят о целесообразности более детального изучения этой стратегии с целью определения области возможного применения и ограничений.

Анализ химических методов получения пенто(гексо)-фуранозо-1-фосфатов [125–132, 137–147], а также различные методы активации аномерного атома углерода (см.

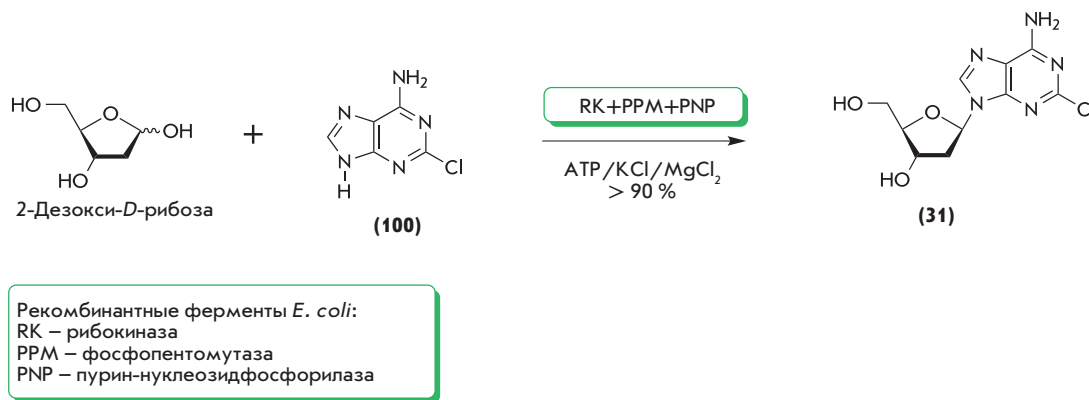
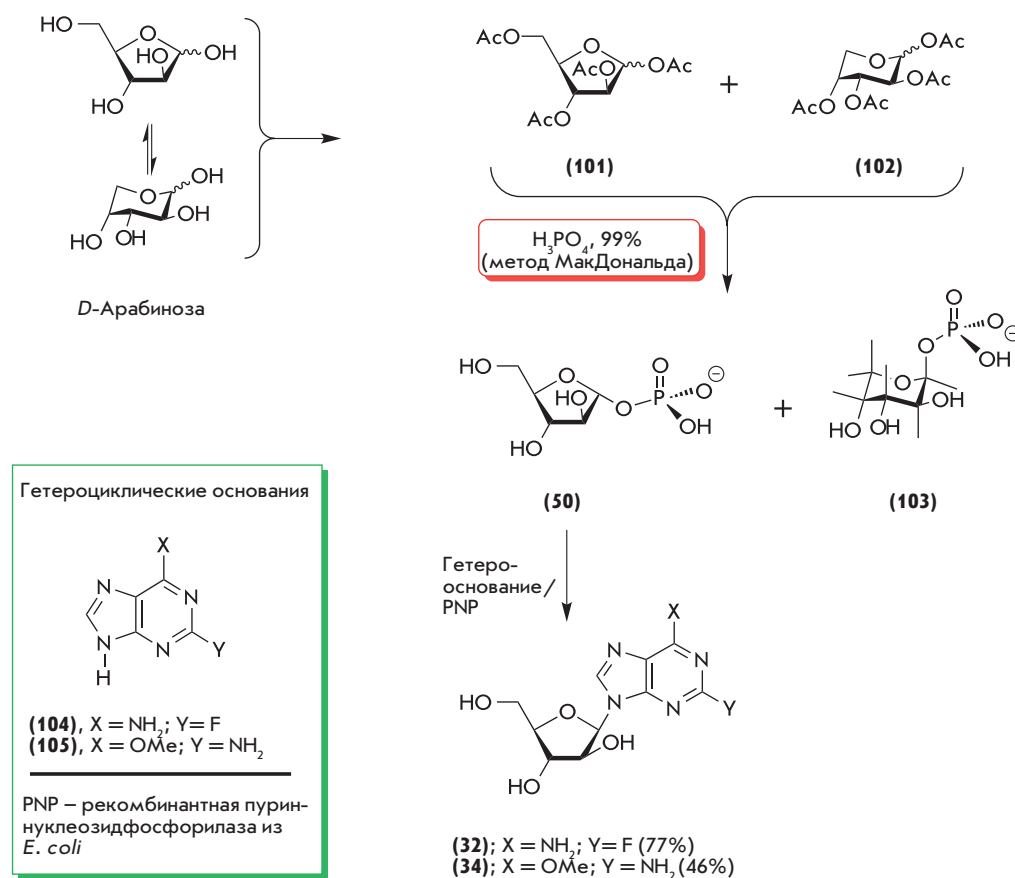


Схема 25



обзор [139]) показывает, что большинство из них трудоемки и приводят к получению желаемых фосфатов с низкими выходами. Как можно было ожидать, в основном наблюдалось образование смесей аномеров, и только, по-видимому, уникальная «асимметрическая трансформация, индуцированная кристаллизацией» приводит к преимущественному образованию желаемых 2-деокси- $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфатов [85].

Будучи относительно простым, метод, предложенный МакДональдом (*D.L. MacDonald*) [140–144], представляется наиболее эффективным и побудил нас применить его для синтеза  $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфатов. Следует отметить, что метод МакДональда показал свою эффективность в синтезе гексопиранозо-1-фосфатов и только в работе Аспиналла и сотр. (*G.O. Aspinall et al.*) он был использован для получения  $\alpha$ -L-арабинофуранозо-1-фосфата: выдерживание перацетилпроизводного L-арабинофуранозы (смесь  $\alpha, \beta$ -аномеров) в безводной фосфорной кислоте и безводном THF при 50°C в течение 2 ч давало после обработки реакционной смеси смесь L-арабинофуранозо-1-фосфата (преимущественно  $\alpha$ -L-аномер) и L-арабинопиранозо-1-фосфата (оба в виде циклогексилламмониевых солей) с суммарным выходом 19% [147]. Следует отметить, что убедительных физико-химических данных в пользу указанных структур не было представлено.

Принимая во внимание, что большое число пуриновых и пиримидиновых  $\beta$ -D-арабинофуранозидов проявляют

высокую противовирусную и противоопухолевую активность (см. выше, а также [18, 19, 148–150]), мы обратились к синтезу D-арабинофуранозо-1-фосфата по МакДональду и использовали его для синтеза пуриновых нуклеозидов. Свежеполученный тетраацетат D-арабинозы представлял смесь  $\alpha, \beta$ -аномеров фуранозной (101) и пиранозной (102) форм (ср., [151]), и его обработка по МакДональду приводила к образованию аморфной смеси  $\alpha$ -D-арабинофуранозо-1-фосфата (50) и  $\beta$ -D-арабинопиранозо-1-фосфата (103) ( $\approx 50\%$  суммарный выход; соотношение изомеров от 1.5 : 8 до 1 : 2, согласно <sup>1</sup>H-ЯМР). Эта смесь была протестирована в реакции с 2-фтораденином (104) и 2-амино-6-метоксипурином (105), катализируемой рекомбинантной PNP *E. coli*.

Было найдено, что 1-фосфат пиранозной формы (102) не ингибирует в оптимальных условиях (водный раствор, pH 7.0, 55°C; 1 ч) синтез 9-( $\beta$ -D-арабинофуранозил)-2-фтораденина ((32); Флударабин), который был выделен с 77% выходом (схема 25) [152]. Неожиданным представляется тот факт, что скорость образования Флударабина была подобна скорости синтеза 2-фторадеозина из  $\alpha$ -D-рибофуранозо-1-фосфата (Sigma) и 2-фтораденина (104) в присутствии рекомбинантной PNP *E. coli*.

Высокая скорость образования Флударабина оказалась неожиданной (ср., [130]). С химической точки зрения, конденсация  $\alpha$ -D-пентофуранозо-1-фосфатов с гетерооснованиями происходит в результате нуклеофильной атаки ато-

**Таблица 2.** Результаты оптимизации пространственной структуры  $\alpha(\beta)$ -D-пентофураноза(пираноза)-1-фосфатов (в виде моновалентных солей методом *ab initio* (HyperChem, 8.1; *in vacuo*, 6-31G\* уровень)

Соединение	Положительный парциальный заряд на C1-атоме	Полная энергия образования, ккал/моль	Конформация пентофуранозного (пиранозного) кольца
(47); Ribf- $\alpha$ 1P	0.425	-808 850.3	C1- <i>exo</i>
(48); dRibf- $\alpha$ 1P	0.454	-762 140.7	C3- <i>endo</i>
(50); Araf- $\alpha$ 1P	0.464	-808 841.6	O4- <i>exo</i>
	0.410	-808 868.5	${}^4C_1$ (более стабильна)
(103); Araf- $\beta$ 1P	0.451	-808 856.8	${}^4C_1$ (менее стабильна)

ма азота гетерооснования на электрофильный аномерный атом углерода 1-фосфата. Для того чтобы оценить электрофильные свойства C1-атома, мы использовали метод *ab initio* для оптимизации структуры ряда близких по строению фосфатов, а именно 1-фосфатов  $\alpha$ -D-рибофуранозы ((47); Ribf- $\alpha$ 1P),  $\alpha$ -D-2-дезоксирибофуранозы ((48); dRibf- $\alpha$ 1P) и ((50); Araf- $\alpha$ 1P) (табл. 2). Из данных табл. 2 следует, что положительные заряды C1-атомов 2-дезоксирибо- и арабино-фосфатов близки по величине и выше, чем заряд рибо-изомера. Последний, у которого *цис*-расположение фосфатной функции и C2-гидроксильной группы, является более стабильным в сравнении арабино-фосфатом. Пространственные структуры рибо- и 2-дезоксирибо-фосфатов предпочтительны для нуклеофильной атаки, и C2-гидроксильная группа арабино-изомера создает незначительные стерические препятствия подходу основания к C1-атому [152].

Различия в положительном парциальном заряде C1-атомов рибо- и 2-дезоксирибо-фосфатов согласуются с более эффективным транс-дезоксирибо-зилированием в сравнении с транс-рибо-зилированием дезазагуринов [24, 82] и бензимидазолов [24, 83, 84]. Подобная субстратная активность Ribf- $\alpha$ 1P и Araf- $\alpha$ 1P в реакции с 2-фтораде-нином объясняется, по-видимому, взаимодействием двух факторов: большим парциальным положительным зарядом C1-атома Araf- $\alpha$ 1P, с одной стороны, и негативным стерическим влиянием C2-гидроксильной группы, с другой (ср. с данными работы [130]).

Следует отметить, что расчеты говорят о более высокой термодинамической стабильности обоих конформеров  $\beta$ -D-арабинопиранозо-1-фосфата, а именно  ${}^4C_1$  и  ${}^4C_1$ , в сравнении с Araf- $\alpha$ 1P. Эти различия, по-видимому, объясняют преимущественное образование пиранозного фосфата в реакции МакДональда.

В отличие от 2-фторадеина, реакция 2-амино-6-метоксипурина (105) и Araf- $\alpha$ 1P (в виде смеси с Araf- $\beta$ 1P) в присутствии рекомбинантной PNP *E. coli* в описанных выше условиях достигала равновесия при эквимолярном соотношении исходного гетерооснования и продукта реакции, 2-амино-9-( $\beta$ -D-арабинофуранозил)-6-метоксипурина ((34); Неларабин), который был выделен с выходом 44%.

Этот результат согласуется с ранее описанным синтезом Неларабина с выходом 53% трансарабинозилацией 2-амино-6-метоксипурина (105), использующим 1-( $\beta$ -D-арабинофуранозил)урацил (49) в качестве донора углеводного фрагмента и UP и PNP *E. coli* в качестве биокатализаторов [153].

Ранее нами было найдено, что транс-2-дезоксирибозил-ирование  $N^2$ -ацетилгуанина с тимидином или 2'-дезоксигуанином в качестве доноров углеводного остатка и соответственно TP/PNP или PNP в качестве биокатализаторов первоначально приводит к образованию  $N^2$ -ацетил-7-(2-дезоксидеокси- $\beta$ -D-рибофуранозил)гуанина, который постепенно перегруппировывается в термодинамически более стабильный  $N^2$ -ацетил-9-(2-дезоксидеокси- $\beta$ -D-рибофуранозил)гуанин [76]. В описанных выше синтезах Флударабина и Неларабина мы не наблюдали подобного течения реакции. Этот результат позволяет предположить, что электронная структура гетероциклического основания определяет тип связывания гетерооснования в активном центре PNP, что обуславливает региоселективность ферментативной реакции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов химико-ферментативного синтеза нуклеозидов убедительно показывает высокую эффективность этой методологии, которая представляет интерес для создания биотехнологических процессов получения биологически важных соединений. Гликозил-ирование гетероциклических оснований катализируется двумя типами ферментов: нуклеозидфосфорилазами и  $N$ -дезоксирибозилтрансферазами; указанные ферменты проявляют различную субстратную специфичность и поэтому взаимно дополняют друг друга с точки зрения их использования в качестве биокатализаторов.

В целом, изложенные выше результаты демонстрируют очевидные преимущества химико-ферментативных методов синтеза нуклеозидов в сравнении с химическими. Во-первых, ферментативные методы полностью отвечают принципам «зеленой химии», так как, как правило, не используют агрессивных реагентов (ацетальдегид – исключение) и органических растворителей. Во-вторых, высокая эффективность ферментативных превращений и стерео- (только  $\beta$ -D-нуклеозиды!) и региоселективность (исключение – отдельные специфические случаи) упрощают процессы выделения желаемых соединений и повышают их качество. Все это вместе взятое приводит к снижению затрат на производство биологически важных соединений, делает их доступными для широкого изучения, а лекарственные средства – для широкого применения. ●

Авторы выражают благодарность Международному научному и технологическому центру (МНТЦ, проект № В-1640) за финансовую поддержку настоящего исследования. И.А. Михайлопуло глубоко признателен Фонду Александра фон Гумбольдта (Бонн – Бад-Годесберг, Германия) за постоянное внимание и частичную финансовую поддержку.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Levene P.A., Tipson R.S. // *J. Biol. Chem.* 1935. V. 111 (2). P. 313–323.
2. Levene P.A., Mandel H. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1908. V. 41 (2). P. 1905–1909.
3. Levene P.A., Jacobs W.A. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1909. V. 42 (2). P. 2469–2473.
4. Levene P.A., Jacobs W.A. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1909. V. 42 (2). P. 2474–2478.
5. Levene P.A., Jacobs W.A. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1911. V. 44 (1). P. 746–753.
6. Levene P.A., London E.S. // *J. Biol. Chem.* 1929. V. 83 (2). P. 793–802.
7. Levene P.A., Mori T. // *J. Biol. Chem.* 1929. V. 83 (2). P. 803–816.
8. Fischer E., Helferich B. // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1914. V. 47 (1). P. 210–235.
9. Gulland J.M., Story L.F. // *J. Chem. Soc.* 1938. P. 259–261.
10. Michelson A.M. *The chemistry of nucleosides and nucleotides.* London: Acad. Press, 1963. 600 p.
11. Lukevics E., Zablocka A. *Nucleoside Synthesis: Organosilicon Methods.* Chichester: Ellis Horwood, 1991. 496 p.
12. Vorbrüggen H., Ruh-Pohlenz C. // *Organic reactions* / Eds Paquette L.A. et al. New York: Wiley, 2000. V. 55. P. 1–630.
13. Bardos Th.J. // *Topics Curr. Chem.* 1974. V. 52. P. 63–98.
14. Langen P. *Antimetabolites of nucleic acid metabolism.* New York: Gordon and Breach, 1975. 273 p.
15. Suhadolnik R.J. // *Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 1979. V. 22. P. 193–291.
16. De Clercq E. // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53 (4). P. 1438–1450.
17. De Clercq E. // *Med. Res. Rev.* 2009. V. 29 (4). P. 611–645.
18. *Modified nucleosides in biochemistry, biotechnology and medicine* / Ed. Herdewijn Piet. Wiley-VCH, 2008. 900 p.
19. Famulok M., Hartig J.S., Mayer G. // *Chem Rev.* 2007. V. 107. P. 3715–3743.
20. Elion G.B. // *Science.* 1989. V. 244. P. 41–46.
21. Gandhi V., Plunkett W. // *Curr. Opin. Oncol.* 2006. V. 18. P. 584–590.
22. Bonate P.L., Arthaud L., Cantrell, Jr., W.R., et al. // *Nature Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. P. 855–863.
23. De Clercq E. // *Intern. J. Antimicrob. Agents.* 2009. V. 33. P. 307–320.
24. Mikhailopulo I.A. // *Current Org. Chem.* 2007. V. 11. P. 317–335.
25. Montgomery J.A. // *J. Med. Chem.* 1980. V. 23 (10). P. 1063–1067.
26. Montgomery J.A. // *Heterocycles.* 1984. V. 21 (1). P. 137–150.
27. De Clercq E. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002. V. 1. P. 13–25.
28. Ftorafur. An anticancer drug. (Pamphlet) / Compiled by Germane S., et al. Riga: Zinatne, 1979. 358 p.
29. Buie L.B., Epstein S.S., Lindley C.M. // *Clin. Therapeutics.* 2007. V. 29 (9). P. 1887–1899.
30. De Clercq E. // *Nature Rev. Drug Discovery.* 2007. V. 6. P. 1001–1018.
31. De Clercq E. // *Antiviral Res.* 2010. V. 85 (1). P. 19–24.
32. De Clercq E. // *Adv. Virus Res.* 2009. V. 73. P. 1–53.
33. Ferir G., Kaptein S., Neyts J., De Clercq E. // *Rev. Med. Virol.* 2008. V. 18. P. 19–34.
34. Vivet-Boudou V., Didierjean J., Isel C., Marquet R. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 163–186.
35. Schaeffer H.J., Bhargava P.S. // *Biochemistry.* 1965. V. 4 (1). P. 71–76.
36. Schaeffer H.J., Vince R. // *J. Med. Chem.* 1965. V. 8 (1). P. 33–35.
37. Schaeffer H.J., Gurwara S., Vince R., Bittner S. // *J. Med. Chem.* 1971. V. 14 (4). P. 367–369.
38. Schaeffer H. J., Beauchamp L., de Miranda P., et al. // *Nature.* 1978. V. 272. P. 583–585.
39. De Clercq E., Holy A. // *Nature Rev. Drug Discovery.* 2005. V. 4. P. 928–940.
40. Levene P.A., Medigreceanu F. // *J. Biol. Chem.* 1911. V. 9 (3). P. 375–387.
41. Levene P.A., Medigreceanu F. // *J. Biol. Chem.* 1911. V. 9 (3). P. 389–402.
42. Levene P.A., Yamagawa M., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 693–706.
43. Levene P.A., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 707–715.
44. Levene P.A., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 717–720.
45. Jones W. // *J. Biol. Chem.* 1911. V. 9 (2). P. 129–137.
46. Jones W. // *J. Biol. Chem.* 1911. V. 9 (2). P. 169–180.
47. Levene P.A., Yamagawa M., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 693–706.
48. Levene P.A., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 707–715.
49. Levene P.A., Weber I. // *J. Biol. Chem.* 1924. V. 60 (3). P. 717–720.
50. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. // *Pharm. Ther.* 2000. V. 88. P. 349–425.
51. Kalckar H.M. // *Federation Proc.* 1945. V. 4. P. 248–250.
52. Kalckar H.M. // *J. Biol. Chem.* 1947. V. 167 (2). P. 477–486.
53. Manson L.A., Lampen J.O. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193 (2). P. 539–547.
54. Araki T., Ikeda I., Matoishi K., et al. *Eur. Pat. Appl.* 2002, 32 p. CODEN: EPXXDW EP 1254959 A2 20021106 CAN 137:348820 AN 2002:847552 CAPLUS
55. Usowa E., Maltseva T., Földesi A., et al. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 344. P. 1347–1358.
56. Lewkowics E.S., Iribarren A.M. // *Curr. Org. Chem.* 2006. V. 10 (11). P. 1197–1215.
57. Friedkin M., Roberts D. // *J. Biol. Chem.* 1954. V. 207 (1). P. 245–256.
58. Friedkin M., Roberts D. // *J. Biol. Chem.* 1954. V. 207 (1). P. 257–266.
59. Duschinsky R., Plevan E., Rlalbica J., Heidelberger C. // *Abstracts, 132<sup>nd</sup> National Meeting of the American Chemical Society.* New York, 1957. P. 19–C.
60. Duschinsky R. *US Patent* 3,168,513 (1965).
61. Hoffer M., Duschinsky R., Fox J.J., Yung N. // *J. Am. Chem. Soc.* 1959. V. 81 (15). P. 4112–4113.
62. Hoffer M. // *Chem. Ber.* 1960. V. 93. P. 2777–2781.
63. Heidelberger C., Parsons D.G., Remy D.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1962. V. 84 (18). P. 3597–3598.
64. Heidelberger C., Parsons D.G., Remy D.C. // *J. Med. Chem.* 1964. V. 7. P. 1–5.
65. Friedkin M., Kalckar H.M. // *The Enzymes, 2<sup>nd</sup> ed.* / Eds Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K. New York: Acad. Press, 1961. V. 5. P. 237–255.
66. Heidelberger C., Ansfield F.J. // *Cancer Res.* 1963. V. 23. P. 1226–1243.
67. Heidelberger C. // *Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 1965. V. 4. P. 1–50.
68. Heidelberger C. // *Annu. Rev. Biochem.* 1975. V. 44. P. 79–121.
69. Kalinichenko E.N., Barai V.N., Bokut S.B., et al. // *Biotechnol. Lett.* 1989. V. 11. P. 621–626.
70. Tuttle J.V., Tisdale M., Krenitsky T.A. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 119–125.
71. Tuttle J.V., Krenitsky T.A. *EP 0285432 B1* (Wellcome Found, GB), *Publ.* 1988–10–05.
72. Zinchenko A.I., Barai V.N., Bokut S.B., et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990. V. 32. P. 658–661.
73. Zaitseva G.V., Zinchenko A.I., Barai V.N., et al. // *Nucleosides Nucleotides.* 1999. V. 18. P. 687–688.
74. Zaitseva G.V., Kvasnyuk E.I., Vaaks E.V., et al. // *Nucleosides Nucleotides.* 1994. V. 13. P. 819–834.
75. Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovskiy D.V., et al. // *Protein Expes. Purif.* 2002. V. 24. P. 56–60.
76. Roivainen J., Elizarova T., Lapinjoki S., et al. // *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids.* 2007. V. 26. P. 905–909.
77. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. // *Z. Naturforsch.* 1990. V. 45c. P. 59–70.
78. Koellner G., Bzowska A., Wielgus-Kutrowska B., et al. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 315. P. 351–371.
79. Krenitsky T.A., Rideout J.L., Koszalka G.W., et al. // *J. Med. Chem.* 1982. V. 25. P. 32–35.
80. Krenitsky T.A., Rideout J.L., Chao E.Y., et al. // *J. Med. Chem.* 1986. V. 29. P. 138–143.
81. Hennen W.J., Wong C.-H. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. P. 4692–4695.
82. Mikhailopulo I.A., Zinchenko A.I., Bokut S.B., et al. // *Biotechnol. Lett.* 1992. V. 14 (10). P. 885–890.
83. Mikhailopulo I.A., Kazimierzczuk Z., Zinchenko A.I., et al. // *Nucleosides Nucleotides.* 1995. V. 14 (3–5). P. 477–480.
84. Mikhailopulo I.A., Kazimierzczuk Z., Zinchenko A.I., et al. // *Nucl. Acids Symp. Ser. № 31.* 1994. P. 83–84.
85. Doskocil J., Holy A. // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1977. V. 42. P. 370–383.

86. Rosemeyer H., Seela F. // *J. Org. Chem.* 1987. V. 52. P. 5136–5143.
87. Colacino J. M., DeLong D. C., Nelson J. R., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990. V. 34. P. 2156–2163.
88. Ehlhardt W.J., Wheeler W.J., Breau A.P., et al. // *Drug Metabolism Disposition.* 1993. V. 21. P. 162–170.
89. Hayden F.G., Tunkel A.R., Treanor J.J., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. V. 38. P. 1178–1181.
90. Ling F., Inoue Y., Kimura A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56 (12). P. 3830–3834.
91. Shirae H., Yokozeki K. // *Agric. Biol. Chem.* 1991. V. 55 (7). P. 1849–1857.
92. Cardinaud R. // *Methods Enzymol.* 1978. V. 51. P. 446–455.
93. Anand R., Kaminski P.A., Ealick S.E. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 2384–2393.
94. McNutt W.S. // *Biochem. J.* 1952. V. 50. P. 384–397.
95. Roush A.H., Betz R.F. // *J. Biol. Chem.* 1958. V. 233. P. 261–266.
96. Beck W.S., Levin M. // *J. Biol. Chem.* 1963. V. 238. P. 702–709.
97. Holguin L., Cardinaud R. // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 54. P. 505–514.
98. Huang M.-C., Hatfield K., Roetker A.W., et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1981. V. 30. P. 2663–2671.
99. Holguin L., Cardinaud R., Salemink C.A. // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 54. P. 515–520.
100. Carson D.A., Wasson D.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 155. P. 829–834.
101. Cook W.J., Short S.A., Ealick S.E. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 2682–2683.
102. Smar M., Short S.A., Wolfenden R. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 7908–7912.
103. Freeman G.A., Shaver S.R., Rideout J.L., Short S.A. // *Bioorg. Med. Chem.* 1995. V. 3. P. 447–458.
104. van Draanen N.A., Freeman G.A., Short S.A., et al. // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 538–542.
105. Armstrong S.R., Cook W.J., Short S.A., Ealick S.E. // *Structure.* 1996. V. 4. P. 97–107.
106. Cheng J.C.-Y., Hacksell U., Daves G.D., Jr. // *J. Org. Chem.* 1985. V. 50 (15). P. 2778–2780.
107. Walker J.A., II, Chen J.J., Wise D.S., Townsend L.B. // *J. Org. Chem.* 1996. V. 61 (6). P. 2219–2221.
108. Porter D.J.T., Merrill B.M., Short S.A. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270 (26). P. 15551–15556.
109. Kaminski P.A. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 14400–14407.
110. Kaminski P.A., Dacher P., Dugue L., Pochet S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 20053–20059.
111. Uerkvitz W. // *Eur. J. Biochem.* 1971. V. 23. P. 387–395.
112. Chapeau M.-C., Marnett L.J. // *Chem. Res. Toxicol.* 1991. V. 4. P. 636–638.
113. Müller M., Hutchinson L.K., Guengerich F.P. // *Chem. Res. Toxicol.* 1996. V. 9. P. 1140–1144.
114. Parkin D.W. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271 (6). P. 21713–21719.
115. Pelle R., Schramm V.L., Parkin D.W. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273 (4). P. 2118–2126.
116. Tozzi M.G., Camici M., Mascia L., et al. // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 1089–1101.
117. Ouwerkerk N., van Boom J.H., Lugtenburg J., Raap J. // *Eur. J. Org. Chem.* 2000. V. 5. P. 861–866.
118. Ouwerkerk N., Steenweg M., De Ruijter M., et al. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 1480–1489.
119. Ogawa J., Saito K., Sakai T., et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003. V. 67. P. 933–936.
120. Ishige T., Honda K., Shimizu S. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005. V. 9. P. 174–180.
121. Horinouchi N., Ogawa J., Kawano T., et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 71. P. 615–621.
122. Horinouchi N., Ogawa J., Kawano T., et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006. V. 70. P. 1371–1378.
123. Horinouchi N., Ogawa J., Kawano T., et al. // *Biotechnol. Letters.* 2006. V. 28. P. 877–881.
124. Horinouchi N., Kawano T., Sakai T., et al. // *New Biotechnol.* 2009. V. 26 (1/2). P. 75–82.
125. Komatsu H., Awano H., Tanikawa H., et al. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2001. V. 20. P. 1291–1293.
126. Komatsu H., Awano H. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 5419–5421.
127. Komatsu H., Awano H., Ishibashi H., et al. // *Nucl. Acids Res. Suppl.* № 3. 2003. P. 101–102.
128. Komatsu H., Araki T. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2005. V. 24 (5–7). P. 1127–1130.
129. Komatsu H., Araki T. // *Tetrahedron Lett.* 2003. V. 44. P. 2899–2901.
130. Taverna-Porro M., Bouvier L.A., Pereira C.A., et al. // *Tetrahedron Lett.* 2008. V. 49. P. 2642–2645.
131. Yamada K., Matsumoto N., Hayakawa H. // *Nucl. Acids Symp. Ser. No. 48.* 2004. P. 45–46.
132. Yamada K., Matsumoto N., Hayakawa H. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2009. V. 28. P. 1117–1130.
133. Chuvikovskiy D.V., Esipov R.S., Skoblov Y.S., et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. V. 14. P. 6327–6332.
134. Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovskiy D.V., et al. // *Protein Expres. Purif.* 2002. V. 24. P. 56–60.
135. Mikhailopulo I.A., Konstantinova I.D., Fateev I.V., et al. // *The 2<sup>nd</sup> International Conference on Drug Discovery & Therapy: Abstracts.* Dubai, 2010. P. 123. (ICDDT\_AbstractBook.pdf, p. 123).
136. Miroschnikov A.I., Esipov R.S., Konstantinova I.D., et al. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2010. In press.
137. de Lederkremer R.M., Nahmad V.B., Varela O. // *J. Org. Chem.* 1994. V. 59. P. 690–692.
138. Euzen R., Ferrieres V., Plusquellec D. // *J. Org. Chem.* 2005. V. 70. P. 847–855.
139. Hanessian S., Lou B. // *Chem. Rev.* 2000. V. 100. P. 4443–4463.
140. MacDonald D.L. // *J. Org. Chem.* 1962. V. 27. P. 1107–1109.
141. MacDonald D.L. // *Carbohydr. Res.* 1966. V. 3. P. 117–120.
142. MacDonald D.L. // *Carbohydr. Res.* 1968. V. 6. P. 376–381.
143. Mendicino J., Hanna R. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. P. 6113–6124.
144. Chittenden G.J.F. // *Carbohydr. Res.* 1972. V. 25. P. 35–41.
145. Wright R.S., Khorana H.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 1994–1998.
146. Maryanoff B.E., Reitz A.B., Nortey S.O. // *Tetrahedron.* 1988. V. 44. P. 3093–3106.
147. Aspinall G.O., Cottrell I.W., Matheson N.K. // *Can. J. Biochem.* 1972. V. 50. P. 574–580.
148. Larson R.A. // *Seminars Oncol.* 2007. V. 34 (Suppl. 5). P. S13–S20.
149. Gandhi V., Plunkett W. // *Curr. Opin. Oncol.* 2006. V. 18. P. 584–590.
150. Bonate P.L., Arthaud L., Cantrell, Jr., W.R., et al. // *Nature Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. P. 855–863.
151. Kobayashi M. // *Tetrahedron.* 2002. V. 58. P. 9365–9371.
152. Konstantinova I.D., Antonov K.V., Fateev I.V., et al. // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 2010. In press.
153. Averett D.R., Koszalka G.W., Fyfe J.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991. V. 35. P. 851–857.