



УДК 577.123.35; 577.152.242

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ 5-ЗАМЕЩЕННЫХ АНАЛОГОВ 2'-ДЕЗОКСИУРИДИНА С ПОМОЩЬЮ НУКЛЕОЗИДДЕЗОКСИРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ВТОРОГО ТИПА *Lactobacillus leichmannii*

© 2025 г. К. С. Алексеев*, #, А. М. Сергиевская**, Д. А. Платов*, **, М. С. Дреничев*

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

** Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова,
“МИРЭА – Российский технологический университет”,
Россия, 119571 Москва, проспект Вернадского, 86

Поступила в редакцию 19.09.2024 г.

После доработки 11.10.2024 г.

Принята к публикации 12.10.2024 г.

Изучены реакции ферментативного трансгликозилирования, катализируемые нуклеозиддезоксирибозилтрансферазой второго типа *Lactobacillus leichmannii* в присутствии 7-метил-2'-дезоксигуанозина и модифицированных гетероциклических оснований пиримидинового ряда. Выбор 7-метил-2'-дезоксигуанозина в качестве нуклеозида-донора углеводного остатка позволил провести с высокими выходами ферментативный синтез 5-замещенных производных 2'-дезоксиуридина. Получены биологически активные производные 2'-дезоксиуридина, три из которых используются в настоящее время в клинической практике в противовирусной и противоопухолевой терапии. Выбранный фермент-катализатор, начальные соотношения молярных концентраций субстратов и выбранный нуклеозид-донор в качестве источника углеводного остатка могут использоваться в дальнейшей разработке экологически чистых биохимических методов получения практически важных модифицированных нуклеозидов.

Ключевые слова: ферментативное трансгликозилирование, 7-метил-2'-дезоксигуанозин, нуклеозиддезоксирибозилтрансфераза второго типа, 2'-дезоксиуридин, нуклеозиды, противовирусные средства, 5-трифторметил-2'-дезоксиуридин, флоксуродин, идоксуродин

DOI: 10.31857/S0132342325020095, **EDN:** LBTYGL

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеиновые основания, природные нуклеозиды и нуклеотиды – это эндогенные метаболиты, выступающие в качестве строительных блоков нуклеиновых кислот и участвующие в ряде клеточных процессов, например, в регуляции ферментативных реакций, синтезе ДНК и РНК, пуринергической системе передачи сигнала. Химически модифицированные аналоги нуклеино-

вых оснований, природных нуклеозидов и нуклеотидов часто выступают биологически активными соединениями, что позволяет использовать их в качестве противовирусных и противоопухолевых средств, антибиотиков и исходных реагентов для получения антисмысловых олигонуклеотидов [1]. В настоящее время в клинической практике применяются ~100 препаратов на основе нуклеозидов и нуклеиновых оснований с широким спектром

Сокращения: NDT – нуклеозиддезоксирибозилтрансфераза; NP – нуклеозидфосфорилаза, PNP – пуриннуклеозидфосфорилаза; UP – уридинфосфорилаза, TP – тимидинфосфорилаза.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-97-33; эл. почта: micelle@mail.ru, cyril.alex@eimb.ru).

биологической активности – противоопухолевой, противовирусной, иммуносупрессивной и т.д.

Например, нуклеозид, имеющий в своей структуре 5-фторурацил, – это известный антиметаболит 5-фтор-2'-дезоксиуридин (**I**) (5-F-dUrd, флоксуродин, рис. 1), широко использующийся в противоопухолевой терапии при раке желудка, почек и толстой кишки ингибирующий тимидилатсингазу [2]. 5-Бром-2'-дезоксиуридин (**II**) (5-Br-dUrd) легко встраивается в ДНК во время ее репликации или репарации [3], что позволяет использовать его для изучения пролиферации клеток в живых тканях и в качестве диагностического инструмента при опухолевых заболеваниях. 5-Иод-2'-дезоксиуридин (**III**) (5-I-dUrd, идоксуродин), известный под торговыми названиями Stoxil и Herplex Liquifilm в США и Канаде, применяется в противовирусной терапии при инфицировании вирусом кошачьего герпеса FHV-1, а также в терапии вирусного кератита, вызванного вирусом простого герпеса HSV. Зидовудин (**IV**), селективный ингибитор обратной транскриптазы HIV, допущенный к применению в конце 80-х гг. XX века в отношении вируса иммунодефицита человека HIV, особенно эффективен при использовании в комбинированной терапии с другим ингибитором обратной транскриптазы ламивудином и ингибитором вирусной протеазы индинавиром [4]. 5-Этил-2'-дезоксиуридин (**V**) применяется в противовирусной терапии вируса простого герпеса HSV [5]. Совместное использование 5-трифторметил-

2'-дезоксиуридина (Viroptic, 5-CF₃-dUrd) (**VI**), эффективного против вируса простого герпеса (HSV-1 и HSV-2) [6], и типирацила (**VII**), ингибитора тимидинфосфорилазы [7], привело к появлению на рынке комбинированного препарата Lonsurf (одобрен FDA в 2015 г.), который успешно применяется для терапии метастатического колоректального рака (рака толстой или прямой кишки), распространившегося на другие части тела, у пациентов, которые приобрели резистентность к другим методам лечения [8]. 5-Этил-2'-дезоксиуридин (**VIII**), как и 5-Br-dUrd, может легко встраиваться в ДНК делящихся клеток, что позволяет использовать его в качестве удобного маркера в живых клетках, в которых происходит синтез ДНК.

В современной биотехнологической промышленности для получения практически важных нуклеозидов применяются, а также разрабатываются новые технологии, основанные на реакциях ферментативного трансгликозилирования [9–12]. Ферментативные методы образования гликозидной связи могут успешно конкурировать с химическими, а в некоторых случаях имеют несомненные преимущества как регио- и стереоселективные, а также экологически чистые. Реакция трансгликозилирования представляет собой перенос углеводного остатка с одного гетероциклического основания на другое. Ферментативное трансгликозилирование катализируется различными ферментами класса гликозилтрансфераз (КФ 2.4). Фер-

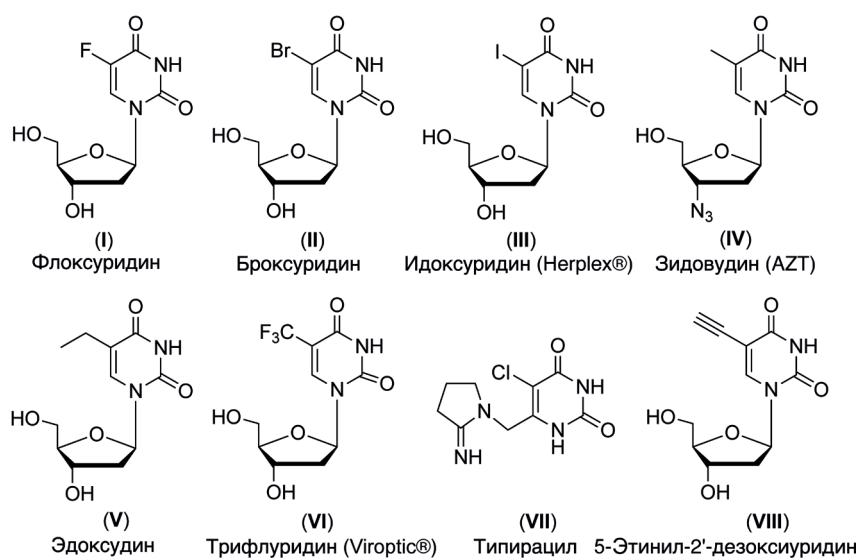


Рис. 1. 5-Замещенные производные 2'-дезоксиуридина, используемые в противовирусной и противоопухолевой терапии.

менты, представляющие практическое значение в биотехнологической промышленности, принадлежат к классу пентозилтрансфераз (КФ 2.4.2) и осуществляют обратимое расщепление *N*-гликозидной связи в рибонуклеозидах/2'-дезоксирибонуклеозидах с высвобождением соответствующего гетероциклического основания и производного пентафуранозы в виде α -D-(дезокси)рибозо-1-фосфата (нуклеозидфосфорилазы (NP)) или комплекса, состоящего из связанного 2-дезоксирибозного остатка в виде оксокарбениевого кationsа в активном центре фермента (нуклеозиддезоксирибозилтрансферазы (NDT)). NP катализируют в присутствии неорганического фосфата обратимый фосфоролиз *N*-гликозидной связи с образованием гетероциклического основания и (2-дезокси)рибозо-1-фосфата. К наиболее часто используемым в биотехнологической промышленности NP относятся пуриннуклеозидфосфорилаза (PNP, КФ 2.4.2.1), уридинфосфорилаза (UP, КФ 2.4.2.3) и тимидинфосфорилаза (TP, КФ 2.4.2.4). Равновесие реакций фосфоролиза в реакциях, катализируемых NP, смещено в сторону образования нуклеозидов, причем в большей степени – пуриновых [10]. На этом основана реакция ферментативного трансгликозилирования, в ходе которой углеводный остаток переносится с пуридинового нуклеозида на гетероциклическое пуриновое основание. Эта общая схема может быть расширена и легко адаптирована для получения практически важных нуклеозидов (схема 1).

NDT – это ферменты, катализирующие перенос 2-дезоксирибозного фрагмента с одного пуринового или пиридинового нуклеозида на другое пиридиновое или пуриновое основание [13, 14], причем в ходе реакции углеводный остаток не высвобождается в реакционную среду, а остается связанным в активном центре фермента (схема 2).

Благодаря свой довольно широкой субстратной специфичности, использование данных ферментов для получения большого ряда модифицированных 2'-дезоксинуклеозидов выглядит весьма перспективным [1]. Эти ферменты чаще всего выделяют из различных лактобактерий, а также они встречаются в паразитических одноклеточных организмах [15]. Разница в субстратной специфичности NDT по отношению к гетероциклическим основаниям позволяет разделить эту группу ферментов на два основных типа: ферменты I типа (NDT I) специфичны в отношении исключительно пуриновых нуклеозидов и гетероциклических оснований, а ферменты II типа (NDT II) распознают и катализируют реакции как с пуриновыми, так и с пиридиновыми нуклеозидами и гетероциклическими основаниями [13, 16]. В то же время оба типа ферментов имеют достаточно консервативный участок, который принимает участие в связывании 2-дезоксирибозы [17, 18]. Таким образом, оба типа NDT специфичны к 2'-дезоксинуклеозидам. При этом субстратная специфичность сайта связывания гетероциклического основания достаточно широка, чтобы

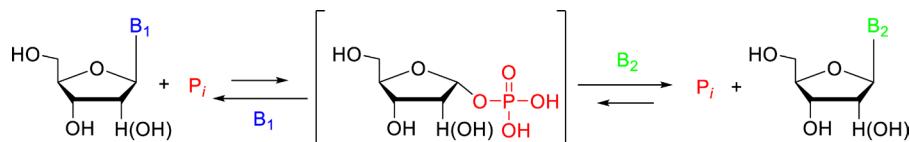


Схема 1. Реакция ферментативного трансгликозилирования, катализируемая нуклеозидфосфорилазами (NP). B₁ и B₂ – пуриновые и/или пиридиновые гетероциклические основания.

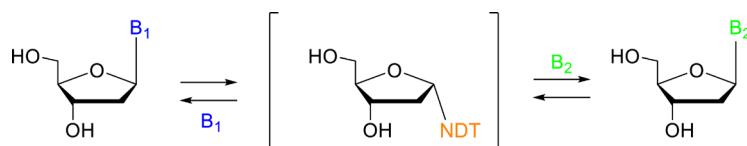


Схема 2. Реакция ферментативного трансгликозилирования, катализируемая нуклеозиддезоксирибозилтрансферазой (NDT). B₁ и B₂ – пуриновые и/или пиридиновые гетероциклические основания.

распознавать в качестве субстратов относительно широкий спектр природных и модифицированных нуклеиновых оснований, включая азолы, пурины с объемными заместителями, дезапурины, галогенированные пурины и пиримидины [19–21]. Также следует отметить, что NDT II распознает производные цитозина и 2'-дезоксицитидина и катализирует реакции с их участием. Производные цитидина входят в состав важных противовирусных и противоопухолевых препаратов (зальцитабин, ламивудин, молнурил, эмтрицитабин, цитарабин). Синтез таких соединений методом ферментативного трансгликозилирования затруднен из-за того, что наиболее часто используемые NP не обладают специфичностью к производным цитозина и цитидина. NDT II, обладающие субстратной специфичностью в отношении некоторых цитозиновых нуклеозидов, могут существенно расширить возможности ферментативного подхода к трансгликозилированию. Биосинтез различных структурных аналогов нуклеозидов – одно из преимуществ использования NDT II, поскольку в литературе упоминается их широкая субстратная специфичность как к пуриновым, так и к пиримидиновым гетероциклическим основаниям по сравнению с NP, что позволяет использовать в реакции ферментативного трансгликозилирования один фермент NDT II вместо пары NP (например, PNP + UP, PNP + TP), которые более специфичны в процессе трансгликозилирования между пуриновыми/пиримидиновыми нуклеозидами, поскольку каждая пара ферментов специфична к своему субстрату [9, 11].

Целью настоящей работы было изучение реакций ферментативного трансгликозилирования, катализируемых NDT II *Lactobacillus leichmannii*, подбор оптимальных условий ее проведения, а также синтез серии производных 2'-дезоксиуридина, модифицированных по положению 5 гетероциклического основания, исходя из соответствующих производных урацила и 7-метил-2'-дезоксигуанозина (7-Me-dGuo) в качестве донора углеводного остатка, а также проведение сравнительного анализа с несколькими аналогичными реакциями, катализируемыми NP *E. coli* (PNP и TP *E. coli*), для ферментативного синтеза пиримидиновых 2'-дезоксиконъюгатов с модифицированными пиримидиновыми основаниями [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

NP – представители гликозилтрансфераз, в настоящее время достаточно широко используемые в качестве биокатализаторов для получения биологически активных нуклеозидов. Уже существуют запатентованные технологии получения биологически активных нуклеозидов флуорадина [23] и кладрибина [24] с использованием NP. Одно из достоинств использования ферментов для катализа – сравнительная простота проведения реакций ферментативного трансгликозилирования, что способствует проведению дополнительных исследований, посвященных поискам новых биокатализаторов для получения биологически активных соединений. Один из таких видов – хорошо известные нуклеозидные 2'-дезоксирибозилтрансферазы II типа (NDT II, КФ 2.4.2.6), обнаруженные в различных бактериях рода *Lactobacillus*, а также встречающиеся в паразитических одноклеточных организмах, которые катализируют перенос углеводного остатка от одного гетероциклического основания на другое, подобно NP. Так, в работе [25] используется комплексный подход, включающий структурный анализ, скрининг и оптимизацию реакции с использованием NDT II в качестве биокатализаторов для получения различных модифицированных нуклеозидов.

Ранее в нашей лаборатории были проведены исследования с использованием NDT II для ферментативного синтеза производных 2'-дезоксицитозина, 5-бром- и 5-гидроксиметил-2'-дезоксиуридина [26]. При проведении ферментативного трансгликозилирования были использованы природные пиримидиновый (тимидин) и пуриновый (2'-дезоксиинозин) доноры углеводного остатка, а также 7-метил-2'-дезоксигуанозин (7-Me-dGuo), который ранее показал очень хорошие результаты в ферментативном трансгликозилировании, катализируемом PNP *E. coli* [22] и PNP *Aeromonas hydrophila* [27]. В работе [26] было показано, что использование 7-Me-dGuo позволяло получать целевые нуклеозиды с высокими выходами, начиная от 80% при эквимолярном соотношении донор–акцептор и количественными при соотношении 1 : 3 и 1 : 6.

В настоящей работе в качестве начальных условий реакции нами был выбран 7-Me-dGuo (как донор углеводного остатка) в молярном соот-

ношении основание-акцептор/нуклеозид-донор 1 : 3 для получения серии модифицированных пиримидиновых дезоксинуклеозидов. В качестве акцепторов были выбраны модифицированные гетероциклические основания 5-фторурацил (5-F-Ura), 5-иодурацил (5-I-Ura), 5-трифторметилурацил (5-CF₃-Ura), 5-хлорурацил (5-Cl-Ura), 5-винилурацил (5-Vin-Ura). Выбор данных оснований обусловлен их потенциальной биологической активностью. Так, 5-F-dUrd, 5-I-dUrd и 5-CF₃-dUrd используются в настоящее время в противовирусной и противоопухолевой терапии, а 5-Cl-dUrd может обладать активностью в отношении вируса HIV-1 и сниженной цитотоксичностью, подобно своим 2',3'-дизокси-5-Cl-замещенным аналогам [28].

В результате был получен ряд 5-замещенных производных 2'-дезоксиуридина с высокими выходами (табл. 1).

Контроль за ходом реакции ферментативного трансгликозилирования осуществляли при помощи ВЭЖХ. Скорость протекания реакции зависела от заместителя в положении 5 урацила. На рис. 2 показан ферментативный синтез 5-I-dUrd, где первая хроматограмма реакционной смеси отображает состояние реакционной смеси до добавления фермента (t_0), а вторая – спустя 1.5 ч после инициирования реакции (t_{eq}). Сигналы 3 (5.21 мин), 4 (7.35) и 5 (8.43 мин) принадлежат

7-метилгуанину (7-Me-Gua), 7-Me-dGuo и 5-I-Ura соответственно. Спустя 1.5 ч наблюдали полное исчезновение сигнала, соответствующего основанию 5-I-Ura, и появление нового сигнала 5, соответствующего целевому продукту 5-I-dUrd (11.68 мин). В случае 5-галогензамещенных оснований (5-F-Ura, 5-Cl-Ura) практически полная их конверсия наблюдалась в течение часа после инициирования реакции, подобно цитозину и 5-Br-Ura, реакции с которыми нами были ранее изучены [26].

В случае 5-CF₃-Ura и 5-Vin-Ura скорость образования целевого нуклеозида была значительно ниже, так, при температуре 37°C и спустя 7 ч с начала реакции конверсия оснований-акцепторов составила 67 и 68% соответственно. Благодаря более широкой субстратной специфичности NDT II мы получили 5-CF₃-dUrd, который не удалось синтезировать с помощью TP *E. coli*.

Ранее [22] мы получили 5-F-dUrd с помощью совместного использования пары PNP и TP *E. coli*, при этом выход целевого нуклеозида составил 95% (табл. 2, строка 2), исходя из 1.5 экв. избытка нуклеозида-донора. В аналогичных условиях был получен 5-Et-dUrd, причем увеличение избытка донора от 1.5 до 3 экв. позволило увеличить выход всего лишь на 5% – с 90 до 95% соответственно (табл. 2, строки 3 и 4). При проведении фермен-

Таблица 1. Ферментативный синтез 2'-дезоксинуклеозидов с использованием NDT II *L. leichmanii*¹ и PNP *E. coli* + TP *E. coli*²

Строка	Соединение	Нуклеозид-донор	Основание	Целевой нуклеозид	Молярное соотношение акцептор/донор	Выход, % (ВЭЖХ) ³
1	(I)	7-Me-dGuo	5-F-Ura	5-F-dUrd	1 : 3	100 ⁴
2					1 : 1.5 : 0.5 (A : Д : P _i) ²	95 [22]
3			5-I-Ura	5-I-dUrd		100 ⁴
4			5-CF ₃ -Ura	5-CF ₃ -dUrd		67 ⁵
5			5-Cl-Ura	5-Cl-dUrd		100 ⁴
6			5-Vin-Ura	5-Vin-dUrd		68 ⁵

Примечание: А – акцептор, Д – донор.

¹ Условия реакции: 25 мМ HEPES, pH 7.4, 20°C, NDT II *L. leichmanii*, концентрации акцептора и донора 0.2 и 0.6 мМ (1 : 3).

² Реакцию проводили в 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 37°C, PNP *E. coli*, TP *E. coli*, молярные концентрации акцептора, донора и P_i составляли 0.2, 0.3 и 0.1 мМ соответственно (1 : 1.5 : 0.5).

³ Выход рассчитан как отношение равновесной молярной концентрации целевого нуклеозида к начальной концентрации лимитирующего субстрата.

⁴ Сигнал гетероциклического основания-акцептора не обнаружен.

⁵ Температура проведения реакции – 37°C, 7 ч.

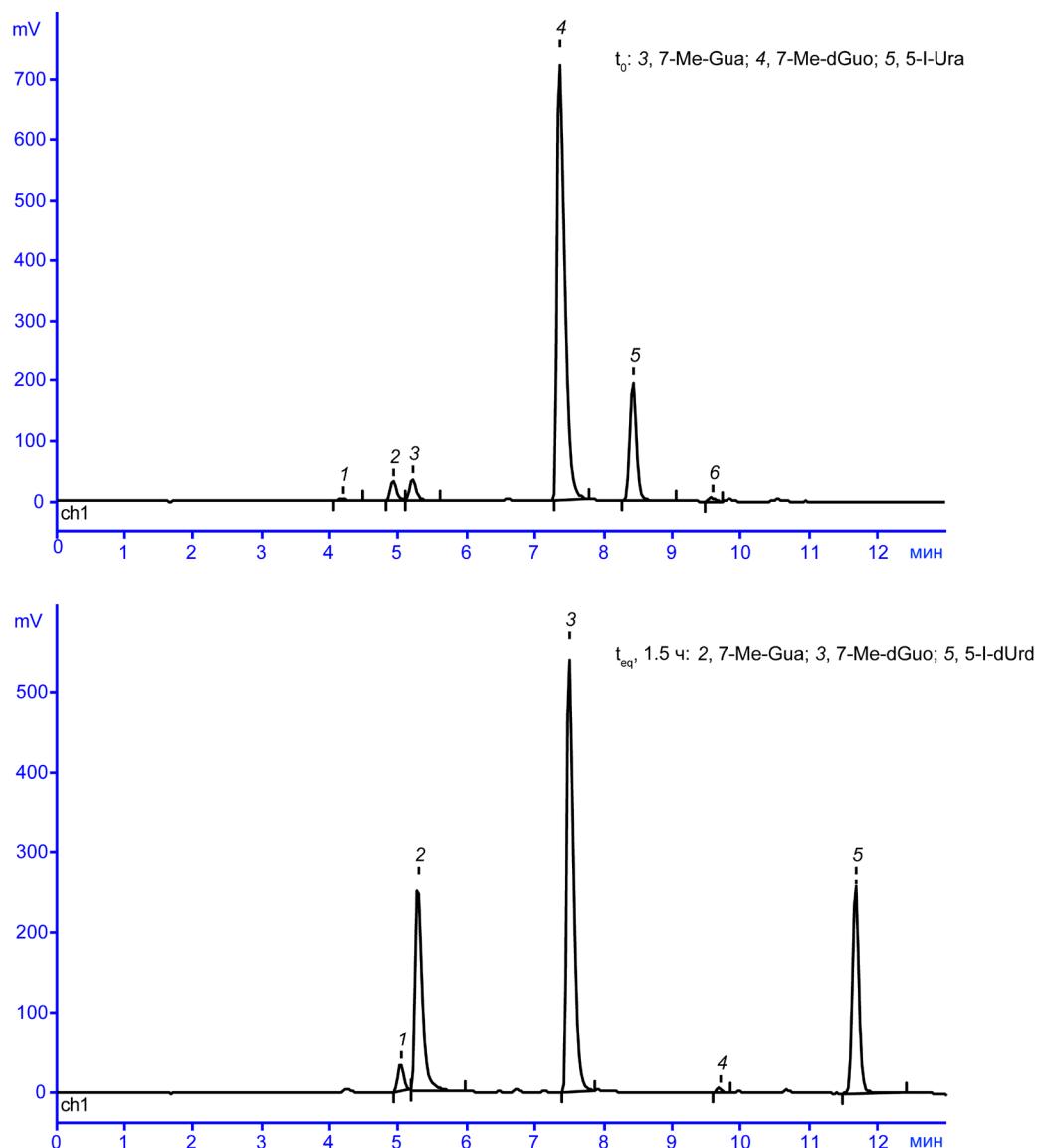


Рис. 2. Ферментативный синтез 5-I-dUrd. Условия: 25 мМ HEPES, pH 7.4, 20°C, NDT II *L. leichmanii*, концентрации акцептора и донора составляли 0.2 и 0.6 мМ (соотношение 1 : 3).

Таблица 2. Сравнительный анализ реакции ферментативного трансгликозилирования 2'-дезоксинуклеозидов с использованием NDT II *L. leichmanii*¹ и PNP *E. coli* + TP *E. coli*²

Строка	Соединение	Нуклеозид-донор	Основание	Целевой нуклеозид	Молярное соотношение акцептор/донор	Выход, % (ВЭЖХ) ³
1	(I)	7-Me-dGuo	5-F-Ura	5-F-dUrd	1 : 3	100 ⁴
2					1 : 1.5 : 0.5 (A : Д : P _i)	95 [22]
3			5-Et-dUra	5-Et-dUrd	1 : 1.5 : 0.5 (A : Д : P _i)	90 [22]
4	(V)				1 : 3 : 0.5 (A : Д : P _i)	95 [22]

Примечание: А – акцептор, Д – донор.

¹ Условия реакции: 25 мМ HEPES pH 7.4, 20°C, NDT II *L. leichmanii*, концентрации акцептора и донора 0.2 и 0.6 мМ (1 : 3).

² Реакцию проводили в 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 37°C, PNP *E. coli*, TP *E. coli*, концентрации акцептора, донора и P_i составляли 0.2, 0.3 и 0.1 мМ соответственно (1 : 1.5 : 0.5).

³ Выход рассчитан как отношение равновесной молярной концентрации целевого нуклеозида к начальной концентрации лимитирующего субстрата.

⁴ Сигнал гетероциклического основания-акцептора не обнаружен.

тативного трансгликозилирования с использованием NDT II для достижения количественного выхода 5-F-dUrd потребовалось 3 экв. избытка донора, что сравнимо с условиями реакции с использованием NP, но для осуществления ферментативной реакции требовался только один фермент.

Следует отметить, что в случае использования NDT II в качестве катализатора необходимо тщательно контролировать ход реакции, т.к. при достижении равновесного состояния наблюдается процесс гидролиза как продукта, так и донора. Равновесие – по сути динамическое, при котором гидролиз целевого нуклеозида продукта компенсируется расходованием нуклеозида-донора как источника углеводного остатка для поддержания равновесной концентрации продукта. В отличие от использования NP, где состояние равновесия и продукт реакции сохраняются относительно долго, проведение обработки реакционной смеси и выделение целевого нуклеозида возможны в течение довольно продолжительного периода времени.

NDT II представляет собой хорошую альтернативу NP, широко используемым в синтезе нуклеозидов методом ферментативного трансгликозилирования, поскольку позволяет добиться сопоставимых выходов целевых продуктов и экономно использовать ферменты за счет более широкой субстратной специфичности NDT II. NDT II, как и NP, позволяет получать различные серии разнообразных модифицированных нуклеозидов, исходя из новых гликозил-доноров, но, в отличие от последних, возможен синтез модифицированных нуклеозидов, не являющихся субстратами NP, и, следовательно, которые невозможно получить в реакциях, катализируемых NP. Выбор новых доноров углеводного остатка, таких как 7-Me-dGuo, в ряде случаев позволяет добиться высоких выходов пиримидиновых нуклеозидов, сравнимых с выходами продуктов реакций с участием NP. Однако в зависимости от структуры гетероциклических оснований-акцепторов для повышения выхода продуктов реакций необходимо чаще варьировать условия реакции. В случае использования NDT II в качестве биокатализатора необходим тщательный контроль протекания реакции из-за высокой скорости обратной реакции гидролиза гликозидной

связи нуклеозидного продукта после достижения равновесия. Большие избытки гликозил-донора в реакции, катализируемой NDT II, по сравнению с NP позволяют сместить равновесие в сторону образования продуктов, при этом сохраняя равновесную концентрацию целевого продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В ходе экспериментальной работы для осуществления реакций и выделения соединений использовали коммерчески доступные реагенты и растворители. ВЭЖХ-анализ осуществляли с помощью градиентной системы Аквилон (Россия) ($2 \times$ Stayer – насос высокого давления, Stayer MS16 – динамический смеситель и Stayer 104M – детектор в УФ- и видимой области) для контроля за ходом реакции. Условия ВЭЖХ-анализа: колонка 4.6×150 мм (5 мкм, Cosmosil 5C18-MS-II, 120 Å, Nacalai Tesque, Inc., Япония) с установленной защитной предколонкой стандарта ЕС (4.0 × 3 мм, 5 мкм, C18, Phenomenex, США); линейный градиент ацетонитрила в 0.06%-ном (об.) растворе трифтормукусной кислоты (ТФУ) в деионизированной воде от 2 до 12% в течение 10 мин (с дальнейшей промывкой в системе 12–80% ацетонитрил/0.06% (об.) ТФУ/ H_2O за 10–10.1 мин, затем 80–2% за 10.1–10.8 мин) при скорости потока 1 мл/мин, УФ-детекцию производили при 260 нм (реакция с 5-F-Ura и 5-CF₃-Ura), 276 нм (реакция с 5-Cl-Ura), 285 нм (реакция с 5-I-Ura), 281 нм (реакция с 5-Vin-Ura) и 276 нм (реакция с 5-Cl-Ura), объем пробы 20 мкл.

Растворители и материалы были “reagent grade” (Sigma-Aldrich, США), использовались без дополнительной очистки. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле (Kieselgel 60, 0.040–0.063 мм; Merck KGaA, Германия). ТСХ осуществляли на пластинах Alugram SIL G/UV254 (Macherey-Nagel, Германия) с УФ-визуализацией. Пиримидиновые основания были получены из коллекции нуклеозидов лаборатории дизайна и синтеза БАС Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. 7-Me-dGuo получали в соответствии с ранее разработанной процедурой [22]. Нуклеозиды и гетероциклические основания использовали в настоящей работе в виде 1 и 2 мМ растворов.

Исходные (“stock solutions”) 1 мМ растворы гетероциклических оснований были приготовлены

путем растворения 0.025 ммоль соединения в деионизированной воде в мерной колбе на 25 мл (0.025 ммоль соответствует 3.25 мг 5-F-Ura, 3.7 мг 5-Cl-Ura, 5.95 мг 5-I-Ura, 3.45 мг 5-Vin-Ura, 4.5 мг 5-CF₃-Ura).

Исходный (“stock solution”) 2 мМ раствор нуклеозида-донора 7-Me-dGuo был приготовлен путем растворения 0.05 ммоль гидроиодной соли последнего в деионизированной воде в мерной колбе на 25 мл (0.05 ммоль соответствует 21.3 мг 7-Me-dGuo·HI).

Нуклеозиддезоксирибозилтрансфераза второго типа *Lactobacillus leichmannii* (NDT II *L. leichmannii*, КФ 2.4.2.6) была приобретена у Sigma-Aldrich, США (кат. № N2665).

Ферментативный синтез нуклеозидов. Реакцию проводили в пластиковых пробирках объемом 1.5 мл (Eppendorf, Германия), объем реакционной смеси составлял 1 мл в 25 мМ НЕРЕС-буфере (рН 7.4) при 20°C (в случае 5-Vin-Ura и 5-CF₃-Ura при 37°C), концентрация субстратов основание/донор составляла 0.2 и 0.6 мМ (молярное соотношение 1 : 3). Реакцию инициализировали добавлением 0.12 U NDT II *L. leichmannii*. Выходы (конверсия) для 5-F-Ura, 5-Cl-Ura и 5-I-Ura составили 100%, для 5-Vin-Ura – 68% (7 ч), для 5-CF₃-Ura – 67% (7 ч).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые была получена серия 5-замещенных 2'-дезоксиуридинов с помощью реакции ферментативного трансгликозилирования, катализируемой NDT II *L. leichmannii*, с использованием в качестве источника углеводного остатка 7-метил-2'-дезоксигуанозина, в том числе практически важных 5-F-dUrd, 5-IdUrd и 5-CF₃-dUrd, применяемых в клинической практике в настоящее время. Был проведен сравнительный анализ реакций трансгликозилирования, катализируемых ферментами NDT II *L. leichmannii* и NP *E. coli* (PNP *E. coli* + TP *E. coli*). 7-Me-dGuo, используемый в качестве донора углеводного остатка, позволяет добиться высоких выходов целевых продуктов, сравнимых с выходами реакций, катализируемых NP. Благодаря более широкой субстратной специфичности NDT II удалось синтезировать 5-CF₃-dUrd, попытки получить который ранее с помощью TP *E. coli* были безрезультатными.

Приведенные в настоящей работе результаты исследования, а именно выбор нуклеозида-донора, соотношения начальных молярных концентраций субстратов и выбор фермента-катализатора, могут использоваться в дальнейшей разработке и оптимизации биохимических методов получения практически важных модифицированных нуклеозидов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00542).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

К.С. Алексеев – администрирование проекта, концептуализация, методология, написание первоначального варианта рукописи, рецензирование и редактирование, руководство; А.М. Сергиевская и Д.А. Платов – проведение исследования, валидация; М.С. Дреничев – проведение исследования, обработка данных, написание статьи, рецензирование и редактирование.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Del Arco J., Acosta J., Fernández-Lucas J.* // Biotechnol. Adv. 2021. V. 51. P. 107701. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107701>
2. *Uchikubo Y., Hasegawa T., Mitani S., Kim H.-S., Wataya Y.* // Nucleic Acids Res. Suppl. 2002. V. 2. P. 245–246. <https://doi.org/10.1093/nass/2.1.245>
3. *Goz B.* // Pharmacol. Rev. 1977. V. 29. P. 249–272.
4. *Gulick R.M., Mellors J.W., Havlir D., Eron J.J., Gonzalez C., McMahon D., Richman D.D., Valentine F.T., Jonas L., Meibohm A., Emini E.A., Chodakewitz J.A.* // N. Engl. J. Med. 1997. V. 337. P. 734–739. <https://doi.org/10.1056/NEJM199709113371102>

5. *Sacks S.L., Tyrrell L.D., Lawee D., Schlech W., 3rd, Gill M.J., Aoki F.Y., Martel A.Y., Singer J.* // *J. Infect. Dis.* 1991. V. 164. P. 665–672.
<https://doi.org/10.1093/infdis/164.4.665>
6. *De Clercq E.* // *Antivir. Chem. Chemother.* 2013. V. 23. P. 93–101.
<https://doi.org/10.3851/IMP2533>
7. *Fukushima M., Suzuki N., Emura T., Yano S., Kazuno H., Tada Y., Yamada Y., Asao T.* // *Biochem. Pharmacol.* 2000. V. 59. P. 1227–1236.
[https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00253-7](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00253-7)
8. *Lenz H.J., Stintzing S., Loupakis F.* // *Cancer Treat. Rev.* 2015. V. 41. P. 777–783.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.06.001>
9. *Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I.* // *Mendeleev Commun.* 2011. V. 21. P. 57–68.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2011.03.001>
10. *Alexeev C.S., Kulikova I.V., Gavryushov S., Tararov V.I., Mikhailov S.N.* // *Adv. Synth. Catal.* 2018. V. 360. P. 3090–3096.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201800411>
11. *Alexeev C.S., Drenichev M.S., Dorinova E.O., Esvipov R.S., Kulikova I.V., Mikhailov S.N.* // *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2020. V. 1868. P. 140292.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140292>
12. *Kaspar F., Giessmann R.T., Neubauer P., Wagner A., Gimpel M.* // *Adv. Synth. Catal.* 2020. V. 362. P. 867–876.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201901230>
13. *Holguin J., Cardinaud R.* // *Eur. J. Biochem.* 1975. V. 54. P. 505–514.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb04163.x>
14. *Kaminski P.A.* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 14400–14407.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111995200>
15. *Fresco-Taboada A., De la Mata I., Arroyo M., Fernández-Lucas J.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 3773–3785.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4816-y>
16. *Becker J., Brendel M.* // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 1996. V. 377. P. 357–362.
<https://doi.org/10.1515/bchm3.1996.377.6.357>
17. *Crespo N., Sánchez-Murcia P.A., Gago F., Cejudo-Sánchez J., Galmes M.A., Fernández-Lucas J., Mancheño J.M.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 7187–7200.
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8450-y>
18. *Pérez E., Sánchez-Murcia P.A., Jordaan J., Blanco M.D., Mancheño J.M., Gago F., Fernández-Lucas J.* // *Chem. Cat. Chem.* 2018. V. 10. P. 4406–4416.
<https://doi.org/10.1002/cctc.201800775>
19. *Cardinaud R., Holguin J.* // *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* 1979. V. 568. P. 339–347.
[https://doi.org/10.1016/0005-2744\(79\)90301-2](https://doi.org/10.1016/0005-2744(79)90301-2)
20. *Fernández-Lucas J., Acebal C., Sinisterra J.V., Arroyo M., de la Mata I.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 1462–1470.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01685-09>
21. *Schnetz-Boutaud N.C., Chapeau M.C., Marnett L.J.* // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 2001. Ch. 1. Unit 1.2.
<https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0102s00>
22. *Drenichev M.S., Alexeev C.S., Kurochkin N.N., Mikhailov S.N.* // *Adv. Synth. Catal.* 2018. V. 360. P. 305–312.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201701005>
23. *Константинова И.Д., Антонов К.В., Берзин В.Б., Дорофеева Е.В., Фатеев И.В., Музыка И.С., Мирошников А.И.* // Патент RU2368662C1, опубл. 27.09.2009.
24. *Zuffi G., Monciardini S.* // Patent US8012717B2, published 06.09.2011.
25. *Salihovic A., Ascham A., Taladriz-Sender A., Bryson S., Withers J.M., McKean I.J.W., Hoskisson P.A., Grogan G., Burley G.A.* // *Chem. Sci.* 2024. V. 15. P. 15399–15407.
<https://doi.org/10.1039/d4sc04938a>
26. *Konkina M.A., Drenichev M.S., Nasyrova D.I., Porozov Y.B., Alexeev C.S.* // *Sustain. Chem. Pharm.* 2023. V. 32. P. 101011.
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101011>
27. *Rabuffetti M., Bavaro T., Semproli R., Cattaneo G., Massone M., Morelli C.F., Speranza G., Ubiali D.* // *Catal.* 2019. V. 9. P. 355.
<https://doi.org/10.3390/catal9040355>
28. *Van Aerschot A., Everaert D., Balzarini J., Augustyns K., Jie L., Janssen G., Peeters O., Blaton N., De Ranter C., De Clercq E.* // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. P. 1833–1839.
<https://doi.org/10.1021/jm00168a046>

Enzymatic Synthesis of Biologically Active 5-Substituted Analogues of 2'-Deoxyuridine by *Lactobacillus leichmannii* Nucleoside Deoxyribosyltransferase Type II

C. S. Alexeev*, #, A. M. Sergievskaya**, D. A. Platov*, **, and M. S. Drenichev*

Phone: +7 (499) 135-97-33; e-mail: micelle@mail.ru, cyril.alex@eimb.ru

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

** Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA Russian Technological University,
prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

Enzymatic transglycosylation reactions catalysed by *Lactobacillus leichmannii* nucleoside deoxyribosyltransferase type II in the presence of 7-methyl-2'-deoxyguanosine and modified pyrimidine heterocyclic bases were studied. The choice of 7-methyl-2'-deoxyguanosine as a nucleoside donor of a carbohydrate residue allowed the enzymatic synthesis of 5-substituted 2'-deoxyuridine derivatives in high yields. Biologically active 2'-deoxyuridine derivatives were obtained, three ones currently used in clinical practice in antiviral and antitumour therapy. The selected enzyme-catalyst, initial ratios of molar concentrations of substrates and the selected nucleoside-donor – source of carbohydrate residue will make it possible to develop environmentally friendly biochemical methods for the preparation of practically important modified nucleosides.

Keywords: enzymatic transglycosylation, 7-methyl-2'-deoxyguanosine, nucleoside deoxyribosyltransferase type II, 2'-deoxyuridine, nucleosides, antiviral agents, 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine, floxuridine, idoxuridine