

29.07.2005

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М. М. ШЕМЯКИНА и Ю. А. ОВЧИННИКОВА  
Российской академии наук (ИБХ РАН)

*На правах рукописи*

ЧУВИКОВСКИЙ  
Дмитрий Вячеславович

**Полиферментные системы для получения модифицированных  
нуклеозидов**

02. 00. 10 - биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2005

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Института биоорганической химии им акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Научный руководитель:

академик РАН

А. И. Мирошников

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Л. Д. Румш

кандидат химических наук

А. М. Крицын

Ведущая организация:

Московская государственная академия тонкой химической технологии имени М.В.Ломоносова (МИТХТ)

Защита состоится «21» декабря 2005г. на заседании

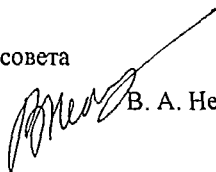
Специализированного совета Д002.019.01 при Институте биоорганической химии им акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН по адресу: 117997 ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Макляя, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Автореферат разослан «15» ноября 2005 г.

Ученый секретарь Специализированного совета

доктор химических наук, профессор



В. А. Несмеянов

2007-4  
11304

2447860

## Характеристика работы

**Актуальность работы.** В настоящее время в химической и фармацевтической промышленности находят все более широкое применение энзиматические реакции в качестве альтернативы традиционным методам органической химии.

Одна из таких областей, в которой использование регио- и стереоспецифичности ферментов позволяет избежать многостадийного органического синтеза - это синтез модифицированных нуклеозидов.

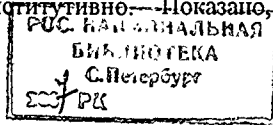
В силу своего сходства с природными нуклеозидами модифицированные аналоги могут избирательно ингибировать ферменты нуклеинового обмена, что используется для лечения различных вирусных и раковых заболеваний.

Поэтому актуальными являются работы, направленные на разработку новых биотехнологических способов синтеза модифицированных нуклеозидов, которые позволят значительно упростить синтез и повысить его эффективность.

**Цель работы.** Целью данной работы было получение полиферментных систем на основе рекомбинантных ферментов нуклеозидфосфорилаз (НФ) *E. coli* и разработка биотехнологических методов синтеза лекарственных препаратов на основе модифицированных нуклеозидов (кладрибина, флударабина и рибавирина). Конкретные задачи состояли в следующем:

- создание штаммов-продуцентов тимидинфосфорилазы (ТФ), уридинфосфорилазы (УФ) и пуридинфосфорилазы (ПНФ) *E. coli*;
- выделение и очистка рекомбинантных ферментов;
- сравнение каталитических параметров рекомбинантных и природных ферментов;
- подбор условий синтеза с помощью рекомбинантных ферментов субстанций препаратов на основе модифицированных нуклеозидов - рибавирина, кладрибина и флударабина;

**Научная новизна.** В результате выполненной работы были получены высокоэффективные штаммы-продуценты НФ, в которых синтез рекомбинантных ферментов происходит конститутивно. Показано, что



кинетические параметры рекомбинантных ферментов не отличаются от их природных аналогов. Разработаны новые схемы трансгликозилирования модифицированных гетероциклических оснований с использованием рекомбинантных ферментов. Осуществлен подбор оптимальных условий синтеза модифицированных нуклеозидов.

**Практическая ценность работы.** В настоящее время использование ферментов в фармацевтической и химической промышленности является одним из актуальных направлений исследований. Однако для проведения энзиматических реакций в промышленных масштабах, необходимы большие количества чистых ферментов. Полученные штаммы суперпродуценты нуклеозидфосфорилаз *E. coli*, и подобранные методы выделения этих ферментов могут быть легко масштабированы для получения необходимых количеств чистых ферментов.

Низкая субстратная специфичность нуклеозидфосфорилаз, позволяет использовать реакцию трансгликозилирования для получения широкого спектра модифицированных нуклеозидов, как в промышленности, так и для проведения скрининга.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были представлены на: 3 Конкурсе для молодых ученых России Биохимического общества РАН (Москва, 2001), XI международном симпозиуме фармацевтической фирмы KRKA (Ново Место, 2001), 12-ом Европейском Биотехнологическом Конгрессе (Копенгаген, 2005).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, получено 3 патента.

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, экспериментальной части, списка цитированной литературы (131 ссылка).

Диссертация изложена на 126 страницах, включает 5 таблиц и 42 рисунка.

## Содержание работы

### 1. Клонирование и экспрессия генов нуклеозидфосфорилаз *E. coli*.

С помощью ПЦР с хромосомной ДНК *E. coli* были амплифицированы гены нуклеозидфосфорилаз. Для этого использовались синтетические праймеры У1 и У2 (содержащие сайты рестрикции *NdeI* и *SalI*) для уридинфосфорилазы (УФ), П1 и П2 (*NcoI* и *EcoRI*) для пурииннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) и Т1 и Т2 (*NdeI* и *SalI*) для тимидинфосфорилазы (ТФ) (рис. 1).

У1 GGAATTCATATGTCCAAGTCTGATGTTTTTC  
У2 ACGCGTCGACGAATTACAGCAGACGACGCGCCGC

П1 AAAACCATGGCTACCCACACATTAATGC  
П2 CGGAATTCATTACTCTTTATCGCCCAGCAGAAC

Т1 GGAATTCATATGTTGTTTCTCGCACAA  
Т2 TTTTCTCGACTTATTCGCTGATACGG

Рис. 1. Нуклеотидные последовательности праймеров. Сайты рестрикции подчеркнуты.

После обработки соответствующими рестриктазами амплифицированные фрагменты генов были клонированы в векторах рЕТ20b (УФ и ТФ), и рЕТ23d (ПНФ) под контролем промотора для Т7-РНК-полимеразы. Правильность встраивания фрагментов и отсутствие мутаций в клонированных генах было показано с помощью секвенирования.

В качестве клеток хозяина для экспрессии генов мы использовали штамм *E. coli* BL21(DE3), в состав хромосомы которого входит ген Т7-РНК полимеразы.

Для достижения высокого уровня экспрессии генов, чья транскрипция регулируется промотор-операторной системой, индукция биосинтеза должна быть осуществлена только после накопления большого числа клеток в культуре. При использовании системы с Т7-РНК-полимеразой, синтез которой находится под контролем *lac*-оператора (в клетках *E. coli* BL21(DE3)), нежелательную конститутивную транскрипцию в клетках на стадии роста можно ингибировать добавлением в питательную среду глюкозы, присутствие которой усиливает взаимодействие *lac*-оператора с *lac*-репрессором. Кроме

этого, нежелательную экспрессию клонированного гена можно ингибировать используя в качестве клеток-хозяина штамм *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, содержащий в плазмиде pLysS ген T7-лизоцима, продукт которого способен подавлять активность T7-РНК-полимеразы.

Мы сравнили эффективность биосинтеза нуклеозидфосфорилз в различных условиях, как с индукцией, так и без индукции (рис. 2). Результаты показали, что ни содержание глюкозы, ни присутствие T7-лизоцима не смогли полностью ингибировать конститутивный синтез НФ. В тоже время, конститутивный биосинтез ПНФ и УФ оказался выше по сравнению с индуцированным биосинтезом в присутствии ингибиторов.

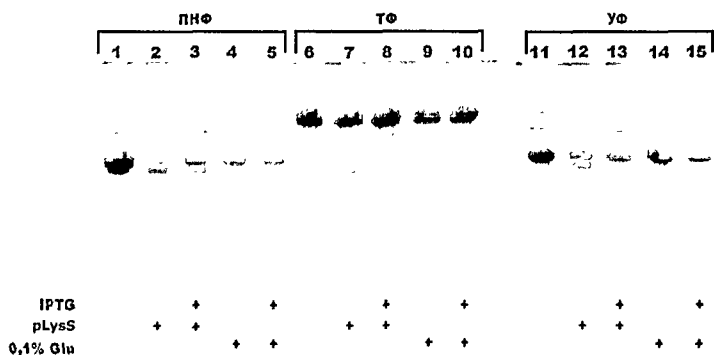


Рис. 2. Гель-электрофореграмма в 15% ПААГ тотальных клеточных лизатов клеток-продуцентов рекомбинантных белков. 1-5 - ПНФ; 6-10 - ТФ; 11-15 - УФ; IPTG - синтез в присутствии IPTG (во всех остальных случаях синтез проходил без индуктора); pLysS - в качестве клеток продуцентов использовался штамм BL21(DE3)/pLysS (во всех остальных случаях - BL21(DE3)); 0,1% Glu - синтез в присутствии 0,1% глюкозы.

Результаты определения активности НФ в тотальных клеточных лизатах по окончании инкубации показали, что уровень удельной активности в лизате клеток с индуцированным IPTG биосинтезом НФ выше на 10-15% по сравнению с активностью в лизате клеток с конститутивным синтезом (рис. 3).

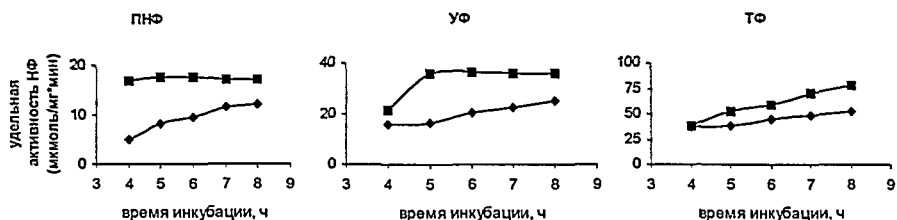


Рис. 3. Зависимость удельной активности НФ в тотальном клеточном лизате от времени инкубации.  $\blacklozenge$  - показан неиндуцированный биосинтез НФ,  $\blacksquare$  - биосинтез индуцированный IPTG. Индукция была на третьем часу инкубации, после достижения культурами клеток плотности  $A_{600}=0,5$ .

Следует обратить внимание на разную динамику накопления НФ при индуцированном и неиндуцированном биосинтезе. При конститутивном биосинтезе удельная активность НФ возрастала постоянно на всем протяжении времени инкубации. Такая же зависимость наблюдалась и для индуцированного биосинтеза ТФ, тогда как для индуцированного биосинтеза ПНФ и УФ наблюдалось резкое увеличение удельной активности до максимальных значений в течение первых часов индукции, которые затем уже практически не менялись.

Высокое содержание рекомбинантного белка в клетке обычно наблюдается лишь в случае агрегации его в нерастворимых тельцах включения, однако в наших примерах присутствие таких агрегатов нуклеозидфосфорилаз мы не обнаружили. Более того, высокий уровень экспрессии нуклеозидфосфорилаз в клетке не вызывал никакого детектируемого лизиса клеток. Большое количество целевых ферментов образующихся в ходе конститутивного синтеза, позволило исключить стадию индукции биосинтеза в схеме культивирования клеток-продуцентов.

## 2. Выделение рекомбинантных ферментов.

На первой стадии выделения НФ клетки осаждали с помощью центрифугирования и ресуспендировали в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСI pH 7.5 и 5 мМ ЭДТА, разрушали с помощью проточного дезинтегратора и

центрифугировали полученный лизат. Затем из супернатанта с помощью сульфата аммония 25% насыщения высаливали примесные белки. Высаливание фосфорилаз происходило при 80% насыщении сульфатом аммония. Полученный осадок растворяли в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСI рН 7.5 и 1 мМ ЭДТА и очищали с помощью ультрафильтрации на мембране XM-50 в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСI рН 7.5 и 2 мМ меркаптоэтанол. Сконцентрированную фракцию очищали на колонке ДЭАЕ-Сефацел, элюируя буфером, содержащим 20 мМ Трис-НСI рН 7.5 и 2 мМ ЭДТА в градиенте концентрации NaCl 0-0.5 М. Для обессоливания раствор фермента хроматографировали на колонке G-50 в буфере, содержащем 20 мМ  $\text{KН}_2\text{P}_4$  рН 7.3 и 1 мМ ЭДТА, и лиофилизовали. Эта схема позволила получить из 10 граммов клеток 200-250 мг ферментов, ферментативная активность которых составила для ПНФ 40 ед.акт./мг, для УФ 60 ед.акт./мг и 160 ед.акт./мг для ТФ. Содержание белка и ферментативная активность на каждой стадии выделения и очистки приведены в таблице 1.

Таблица 1  
Стадии выделения и очистки нуклеозидфосфорилаз

НФ	Стадии очистки	Общее кол-во белка (мг)	Общая активность (ед.акт)	Удельная активность (ед.акт./мг)	Выход (%)
<b>ПНФ</b>					
	Клеточный лизат после обработки ультразвуком	420	4620	11	100
	Супернатант	297	3564	12	77
	Супернатант после 25% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	245	3430	14	74
	Осадок после 80% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и ультрафильтрации на XM-50	101	2424	24	52
	Хроматография на ДЕАЕ-Сефацел и на Сефадексе G-50	60	2400	40	51
<b>УФ</b>					
	Клеточный лизат после обработки ультразвуком	500	10500	21	100
	Супернатант	400	10000	25	95



	Супернатант после 25% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	344	8944	26	85
	Осадок после 80% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и ультрафильтрации на XM-50	231	8547	37	81
	Хроматография на ДЕАЕ-Сефацел и на Сефадексе G-50	138	6900	50	65
<b>ТФ</b>					
	Клеточный лизат после обработки ультразвуком	720	38160	53	100
	Супернатант	444	26640	60	69
	Супернатант после 25% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	335	25795	77	67
	Осадок после 80% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и ультрафильтрации на XM-50	261	24273	93	63
	Хроматография на ДЕАЕ-Сефацел и на Сефадексе G-50	147	20580	140	54

Как показали эксперименты с синтезом модифицированных нуклеозидов, чистота ферментов, полученных приведенным выше способом превышала необходимую. Поэтому нами была разработана упрощенная схема выделения нуклеозидфосфорилаз (таблица 2). В данной схеме после высаливания фосфорилаз сульфатом аммония 80% насыщения, осадок с фосфорилазами, растворяли в буфере, содержащем 20 мМ Трис HCl pH 7.5, 2 мМ ЭДТА и 50 мМ NaCl, и хроматографировали на колонке G-100. Фракции, содержащие фермент, объединяли и опять высаливали белки 80% сульфатом аммония. Полученный осадок растворяли в буфере 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.3 и затем диализовали против этого же буфера. Данная схема выделения ферментов позволила получить с 10 граммов клеток 300-400 мг ферментов, удельная ферментативная активность которых составила 45 ед.акт./мг для УФ, 120 ед.акт./мг для ТФ и 30 ед.акт./мг для ПНФ.

**Таблица 2.**  
**Стадии выделения и очистки нуклеозидфосфорилаз (упрощенный способ)**

НФ	Стадии очистки	Общее кол-во белка (мг)	Общая активность (ед.акт.)	Удельная активность (ед.акт./мг)	Выход (%)
<b>ПНФ</b>					
	Клеточный лизат после обработки ультразвуком	900	10800	12	100
	Осадок после 25% и 80% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	750	9750	13	90
	Хроматография на Сефадекс G-100	360	9000	25	83
	Диализ	330	8910	27	82,5
	Лиофильная сушка	228	7980	35	74
<b>УФ</b>					
	Клеточный лизат после обработки ультразвуком	954	23850	25	100
	Осадок после 25% и 80% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	825	21450	26	89
	Хроматография на Сефадекс G-100	424	19504	46	81
	Диализ	390	18720	48	79
	Лиофильная сушка	330	17490	53	73
<b>ТФ</b>					
	Клеточный лизат после обработки ультразвуком	1440	89280	62	100
	Осадок после 25% и 80% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1188	83160	70	93
	Хроматография на Сефадекс G-100	576	74880	130	83
	Диализ	550	74250	135	82
	Лиофильная сушка	503	72935	145	81

На рисунке 4 показана гель-электрофореграмма в 15% ПААГ в нативных условиях очищенных НФ. На рисунке видно, что олигомерный состав очищенных НФ однороден, и, по-видимому, соответствует гексамеру для ПНФ и УФ и димеру для ТФ.

Следует заметить, содержание рекомбинантных ферментов в растворимой клеточной фракции после центрифугирования достигало 75-80%, поэтому степень очистки ферментов не превышала величину 3-4.

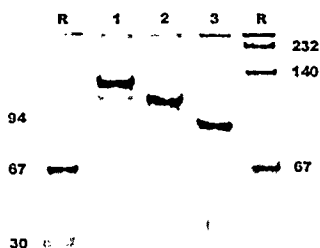


Рис. 4. Гель-электрофореграмма в 15% ПААГ в неденатурирующих условиях очищенных рекомбинантных ферментов. 1 – УФ; 2 – ПНФ; 3 – ТФ. R – стандарты молекулярных масс (kDa).

### 3. Определение кинетических параметров рекомбинантных ферментов.

Для сравнения кинетических параметров природных и рекомбинантных ферментов, для последних были определены константы Михаэлиса ( $K_M$ ) и константы равновесия реакции фосфолиза ( $K_{eq}$ ). Полученные значения были сопоставлены с литературными данными, полученными для природных ферментов (таблица 3 и 4).

Таблица 3.

Константы Михаэлиса ферментативного фосфолиза, катализируемого УФ, ТФ и ПНФ.

Фермент	Субстрат	$K_M$ , мкМ*	Литературные данные ( $K_M$ , мкМ)	Ссылка
ПНФ	Ino	56	70	Jensen <i>et al</i> 1975
			32	Bzowska <i>et al</i> 1988
			47	Bzowska <i>et al</i> 1995
УФ	Urd	80	90	Leer <i>et al</i> 1977
			120	Вейко <i>с соавт.</i> 1998
	SUrd**	80		

ТФ				
	dThd	300	380	Schwartz M. 1978
	SdThd***	250		

\* - Ошибка измерения  $K_M$  не превышала 20%

\*\* - 4-Теоуридин

\*\*\* - 4-Тнотимидин

Таблица 4.

Константы равновесия реакций ферментативного фосфорилиза, катализируемые УФ, ТФ и ПНФ.

Фермент	Субстрат/Продукт	$K_{ср}$ *	Литературные данные	Ссылка
ПНФ				
	CdA**/2Cl-Ade	0,04		
	Ado/Ade	0,01		
	Guo/Gua	0,02		
	Ino/Hyp	0,03	0,03	Krenitsky <i>et al</i> 1981
	7-Me-Guo/7-Me-Gua	$\infty$ ***		
УФ				
	Urd/Ura	0,21	0,2	Krenitsky <i>et al</i> 1981
	SUrd	0,3		
ТФ				
	dThd/Thy	0,25	0,1	Krenitsky <i>et al</i> 1981
	SdThd	0,1		

\* - Приведены значения для трех экспериментов, ошибка определения констант была не более 5%.

\*\* - CdA – 2-хлор-2'-дезоксаденозин

\*\*\* - 7-Me-Guo фосфорилируется полностью, т. к. основание (7-метил-гуанин) выпадает в осадок

Таким образом, клонированные ферменты по основным кинетическим параметрам не отличаются от природных ферментов.

#### 4. Синтез модифицированных нуклеозидов с использованием рекомбинантных ферментов.

Выделенные ферменты были использованы для разработки биотехнологического способа синтеза трех модифицированных нуклеозидов – кладрибина (9- $\beta$ -D-2'-дезоксирибозил-2-хлораденин, CdA), флударабина (9- $\beta$ -D-арабинозил-2-фтораденин, F-ара-A) и рибавирина (1- $\beta$ -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) (рис. 5). В настоящее время эти препараты широко применяются в медицине для лечения различных вирусных заболеваний (рибавирин), злокачественных заболеваний системы кроветворения (кладрибин, Флудара – 5'-монофосфат флударабина), рассеянного склероза (кладрибин) и ряда других аутоиммунных заболеваний.

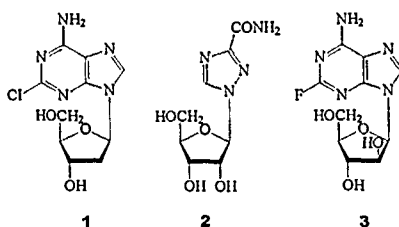


Рис. 5. 1 - Кладрибин. 2 - Рибавирин. 3 - Флударабин.

#### 4.1. Синтез кладрибина.

Синтез кладрибина осуществляли по схеме, представленной на рисунке 6, которая включала в себя следующие обратимые реакции: 1) фосфорилиз дезоксигликозидного донора – дезокситимидина (dThd), в присутствии ТФ и неорганического фосфата, с образованием тимина (Thy) и ключевого интермедиата - 2-дезокси- $\alpha$ -D-рибофуранозил-1-фосфата (дезоксирибозо-1-фосфата); 2) фосфорилиз донора гетероциклического основания 2-хлораденозина (2Cl-Ado), в присутствии ПНФ и неорганического фосфата с образованием 2-хлораденина (2Cl-Ade) и  $\alpha$ -D-рибофуранозил-1-фосфата (рибозо-1-фосфата); 3) катализируемое ПНФ дезоксигликозилирование 2Cl-Ade дезоксирибозо-1-фосфатом с высвобождением фосфата и образованием CdA.

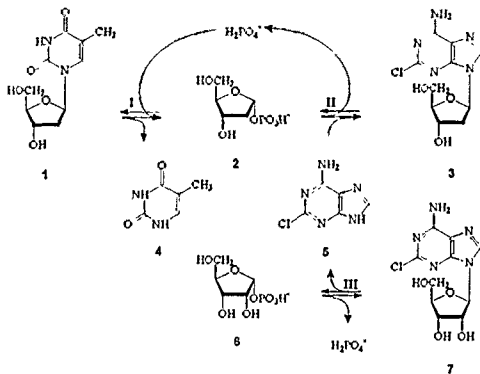


Рис. 6. Схема синтеза кладрифина. 1 - дезокситимидин; 2 - 2'-дезоксирибозо-1-фосфат; 3 - кладрифин; 4 - тимин; 5 - 2-хлораденин; 6 - рибозо-1-фосфат; 7 - 2-хлораденозин. Реакция I катализируется ТФ, реакции II и III ПНФ.

Использование 2-хлораденозина в качестве донора 2-хлораденина, обусловлено высокой растворимостью нуклеозида (до 100 мМ), по сравнению с гетероциклическим основанием (5 мМ при 50°C).

Оптимизация условий синтеза CdA была проведена по следующим параметрам:

- температура реакции;
- концентрация  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфера;
- рН реакционной смеси;
- количество добавляемых препаратов ферментов;
- соотношение субстратов реакции - dThd и 2Cl-Ado;



Рис. 7. Зависимость синтеза CdA от температуры.

Для нахождения зависимости скорости реакции от температуры реакционную смесь, содержащую в объеме 0.3 мл 1 мМ 2Cl-Ado, 1 мМ dThd, 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  рН 7.0, 0.82 ед. акт. ТФ и 0.31 ед. акт ПНФ, инкубировали в течение

25 мин при различных температурах. Как видно из рисунка 7, наибольшая скорость реакции наблюдалась при температуре 50°C. Уменьшение скорости реакции при более высоких температурах, как мы полагаем, вызвано тепловой денатурацией ферментов. В тоже время, стабильность ферментов при 50°C, по-видимому, вызвана их стабилизацией рибозо-1-фосфатом и дезоксирибозо-1-фосфатом (Krenitsky et al 1981). Дальнейшие эксперименты по синтезу CdA проводили при температуре 50°C.

Зависимость содержания в реакционной смеси CdA от концентрации  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  буфера приведена на рисунке 8. Реакционная смесь, за исключением концентрации буфера, была такой же, как и в предыдущем опыте. Из схемы синтеза CdA (рис. 6) видно, что фосфат оказывает двоякое влияние на выход CdA: с одной стороны, недостаток фосфата уменьшает эффективность фосфорилиза донора дезоксирибозного остатка - dThd, с другой - излишек его сдвигает равновесие реакции дезоксирибозилирования 2Cl-Ado в сторону фосфорилиза, тем самым, уменьшая выход CdA. В нашем случае, при наименьшей концентрации фосфата – 1.25 мМ (концентрация субстратов dThd и 2Cl-Ado в реакции - 1 мМ), процентное содержание CdA в реакции после установления равновесия было наибольшим. По-видимому, для достижения наибольшего содержания CdA в реакционной смеси достаточно лишь каталитических количеств фосфата, необходимых только для начала реакции фосфорилиза dThd, однако в этом случае значительно увеличивается время достижения равновесия. В тоже время следует заметить, что с увеличением концентрации фосфатного буфера с 1.25 мМ до 20 мМ содержание CdA в реакционной смеси уменьшается всего на 5%.

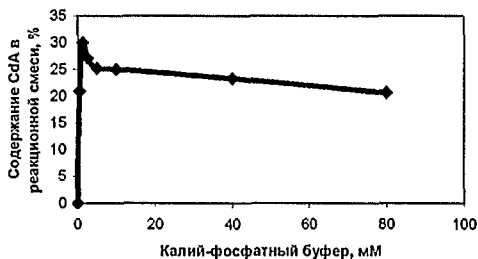


Рис. 8 Влияние концентрации  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  буфера на синтез CdA. (концентрации CdA и dThd – 1 мМ).

Зависимость содержания CdA в реакционной смеси от pH показана на рисунке 9.

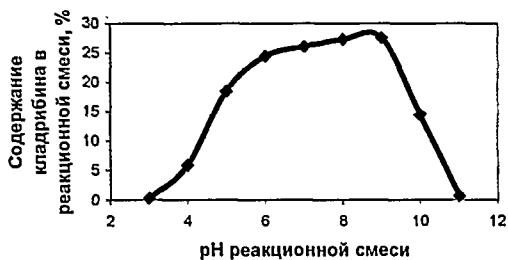


Рис. 9. Зависимость содержания CdA в реакционной смеси от pH.

Как видно из графика оптимум pH реакции находится в диапазоне 7-9. Из литературных данных известно, что при pH 8 стабильность ферментов значительно уменьшается (krenitsky et al 1981). В данном случае, по-видимому, из-за небольшого времени инкубации – 25 минут, ингибирование ферментов было незначительным.

На рисунке 10 представлены данные экспериментов, в которых было определено оптимальное количество фермента ПНФ, необходимого для достижения реакции состояния равновесия за 25 мин при 50°C. В реакционной смеси содержалось 0.3 мкмоль 2Cl-Ado (концентрация 1 mM), 0.3 мкмоль dThd (1 mM), 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7.0. Количество ед. акт ПНФ изменялось от 0.01 до 0.94, тогда как количество ед. акт ТФ было постоянным и равным 0.82. Из представленных данных видно, что для достижения состояния равновесия реакции в данных условиях достаточно 0.1 – 0.3 ед. акт. ПНФ на 0.3 мкмоль 2Cl-Ado.

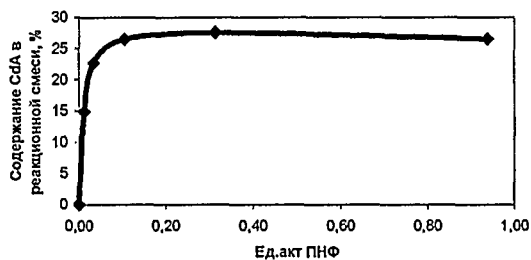


Рис. 10. Зависимость содержания CdA в реакционной смеси от количества ед. акт. ПНФ (в реакционной смеси содержалось 0.82 ед. акт. ТФ).

Интересно, что в этих условиях, количество ед. акт. ТФ необходимых для установления равновесия в реакции, было на порядок меньше – 0.01-0.015 (рис. 11). Состав реакционной смеси, в которой содержалось 0.31 ед. акт. ПНФ, был



такой же, как и в предыдущем опыте. По-видимому, это обусловлено как уменьшением скорости реакции ПНФ с модифицированными субстратами, так и частичным ингибированием ПНФ кладрибином ( $K_i=4.5$  мкМ) (Bzowska et al 1995).

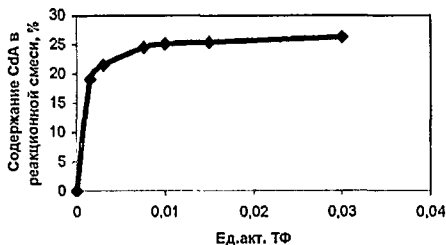


Рис. 11. Зависимость содержания CdA в реакционной смеси от количества ед. акт. ТФ (в реакционной смеси содержалось 0.31 ед. акт. ПНФ).

Заключительным этапом исследований было нахождение оптимального соотношения субстратов реакции - dThd и 2Cl-Ado. Зависимость выхода CdA в реакционной смеси в пересчете на 2Cl-Ado приведена на рисунке 12. Реакционная смесь в объеме 0,3 мл содержала 1 мМ 2Cl-Ado, 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0, 0.31 ед. акт ПНФ. Концентрацию dThd изменяли в диапазоне от 0.625 до 20 мМ. Количество ед. акт ТФ добавляли из расчета 0.015 ед. акт. на 1 мМ (0.3 мкмоль) dThd. Наиболее значительное увеличение выхода наблюдалось при повышении концентрации dThd с 0.625 мМ до 5 мМ (с 57% до 85,3%). Однако дальнейшее увеличение концентрации dThd приводило лишь к незначительному увеличению содержания CdA.

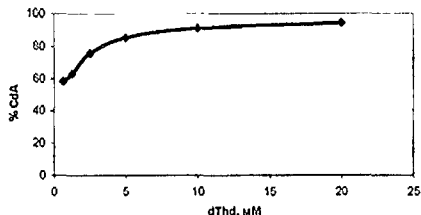


Рис. 12. Влияние избытка dThd на выход в реакции CdA (концентрация 2Cl-Ado - 1 мМ).

Наиболее сильно смещает равновесие реакции избыток dThd. С увеличением концентрации dThd с 0.625 мМ до 5 мМ, степень превращения Cl-Ado  $\rightarrow$  CdA увеличивается с 58% до 85.3%. В тоже время, уменьшение концентрации фосфатного буфера с 80 мМ до 1 мМ увеличивает выход CdA в

реакции всего лишь на 5,4%. Поэтому для увеличения выхода CdA целесообразно использовать избыток dThd.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов нами было установлено, что оптимальными параметрами для синтеза CdA с помощью рекомбинантных ферментов ТФ и ПНФ являются следующие:

- оптимальная температура реакции - 50°C
- концентрация  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфера эквивалентна наибольшей концентрации одного из субстратов;
- рН реакционной смеси - 7.0-7.5;
- для достижения реакцией равновесного состояния за 25 мин. при температуре 50°C достаточно 0.31 ед. акт. ПНФ и 0.015 ед. акт. ТФ на 0.3 мкмоль 2CI-Ado и dThd, соответственно.
- для увеличения выхода реакции следует использовать 2-5 кратный избыток dThd по отношению к 2CI-Ado.

В этих условиях выход в реакции CdA в пересчете на 2CI-Ado через 25 минут после начала реакции составил 85%.

#### 4.2. Синтез рибавирина.

Синтез рибавирина проводили по схеме, которая включала в себя две обратимые реакции: 1) фосфорилиз гликозидного донора - гуанозина (Guo), в присутствии неорганического фосфата с образованием гуанина (Gua) и рибозо-1-фосфата; 2) гликозилирование последним 1,2,4-триазол-3-карбоксамидом (ТКА) с освобождением фосфата и образованием рибавирина (рис. 13). Обе реакции катализирует фермент ПНФ.

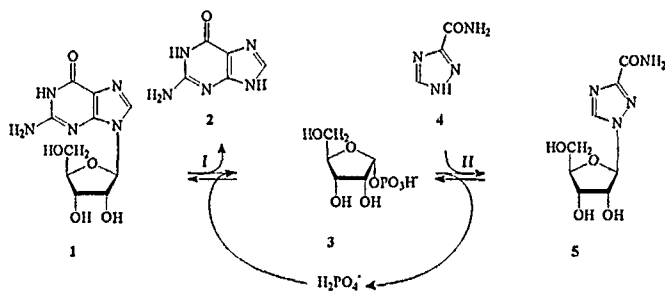


Рис. 13. Схема синтеза рибавирина. 1 - гуанозин; 2 - гуанин; 3 - рибозо-1-фосфат; 4 - 1,2,4-триазол-3-карбоксамид; 5 - рибавирин. Реакции I и II катализируются ПНФ.

Как правило, в реакциях гликозилирования в качестве донора рибозы используется пиримидиновый нуклеозид. Это обусловлено тем, что, как показано выше, равновесие реакции фосфорилиза пиримидиновых нуклеозидов значительно меньше смещено в сторону образования нуклеозида, чем при фосфорилизе пуриновых нуклеозидов. Однако в литературе есть ряд успешных примеров использования Guo в качестве донора рибозы для синтеза модифицированных нуклеозидов, так как образующийся после фосфорилиза гуанозина гуанин, из-за низкой растворимости кристаллизуется и смещает равновесие реакции в сторону образования продуктов реакции.

Оптимизация реакции синтеза рибавирина была проведена по следующим параметрам:

- концентрация  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  буфера;
- количество добавляемого ферментативного препарата;
- соотношение субстратов реакции - Guo и ТКА;

Эксперименты для определения оптимальной температуры и pH реакции не были проведены, потому что в литературе опубликовано много примеров синтеза рибавирина, в том числе и с использованием целых бактериальных клеток, оптимальная температура реакции в которых была 50-60°C, и pH 6.5-7.5. Поэтому все эксперименты были проведены при температуре 50°C и pH 7.0.

Зависимость выхода рибавирина от концентрации  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  буфера показана на рисунке 14. Реакционная смесь содержала в объеме 2 мл 10 мМ Guo, 10 мМ ТКА, 18 ед. акт. ПНФ. Так же как и в синтезе кладрибина, при больших избытках фосфата, равновесие реакции гликозилирования ТКА смещается в обратную сторону. Поэтому концентрацию  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  буфера следует использовать не выше 20 мМ.

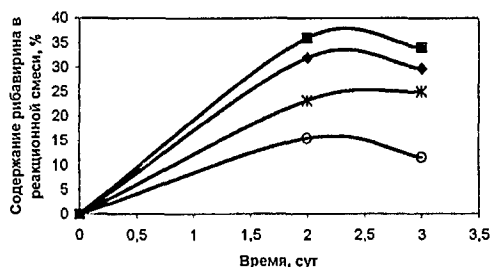


Рис. 14. Влияние концентрации  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  буфера на синтез рибавирина. (♦) - 10 мМ; (■) - 20 мМ; (\*) - 60 мМ; (○) - 120 мМ.

В ходе дальнейших экспериментов было установлено, что оптимальным соотношением субстратов реакции Guo:ТКА является отношение 1.5:1, при котором содержание рибавирина в реакционной смеси после установления равновесия достигало 80%. Надо заметить, что увеличение концентрации Guo в реакционной смеси выше 60 мМ при 50°C приводило к его кристаллизации.

Полученное в предыдущем эксперименте соотношение Guo:ТКА было использовано для определения оптимального количества ПНФ необходимое для катализа реакции. Реакционная смесь содержала в объеме 2 мл 30 мМ Guo (60 мкмоль) и 20 мМ ТКА (40 мкмоль), 30 мМ  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  pH 7.0. Из приведенных на рисунке 15 результатов видно, что в этих условиях для достижения равновесного состояния на третьи сутки реакции достаточно 0.4 ед. акт. ПНФ.

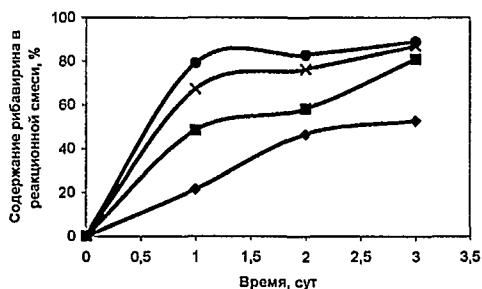


Рис. 15. Зависимость содержания рибавирина в реакционной смеси от количества ПНФ в 30 мМ  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  буфере. (♦) - 0.08 ед. акт.; (■) - 0.4 ед. акт.; (x) - 0.7 ед. акт.; (●) - 1.1 ед. акт.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было показано, что оптимальными условиями реакции синтеза рибавирина с использованием рекомбинантной ПНФ, следующие:

- концентрация  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  буфера эквивалентна концентрации Guo;
- соотношение Guo:ТКА - 1.5:1;
- оптимальное количество ПНФ - 0.42 ед. акт. на 60 мкмоль Guo и 40 мкмоль ТКА.

В данных условиях на четвертые сутки проведения реакции содержание рибавирина в реакционной среде составило 84%.

#### 4.3. Синтез флударабина.

Синтез флударабина – предшественника препарата Флудары - осуществлялся по схеме, представленной на рисунке 16. Реакция

энзиматического трансгликозилирования, включала в себя следующие равновесные реакции: 1) фосфоролиз гликозидного донора, 1-β-D-арабинофуранозилурацила (Ara-U), в присутствии УФ и неорганического фосфата, с образованием урацила (Ura) и α-D-арабинофуранозил-1-фосфата (арабинозо-1-фосфата); 2) фосфоролиз донора гетероциклического основания 2-фторадеозина (2F-Ado), в присутствии ПНФ и неорганического фосфата, с образованием 2-фтораденина (2F-Ade) и рибозо-1-фосфата; 3) катализируемое ПНФ гликозилирование 2F-Ade арабинозо-1-фосфатом с высвобождением фосфата и образованием флударабина (F-ara-A). Кроме того, в ходе реакции образуется Urd из Ura и рибозо-1-фосфата. Реакция катализируется УФ. Из-за нестабильности рибозо-1-фосфата, длительное время проведения реакции приводит к полному распаду этого соединения на рибозу и неорганический фосфат.

Из-за очень низкой растворимости 2F-Ade в воде (3 мМ при 50°C), в качестве его донора использовали 2F-Ado, растворимость которого при 50°C значительно выше – 80 мМ.

В ходе проведения реакции образующийся F-ara-A начинал выпадать в осадок, если его концентрация в реакционной смеси достигала 26-30%, тем самым, смещая равновесие реакции в сторону образования F-ara-A.

Оптимизация условий реакции проводилась по следующим параметрам:

- температура реакции;
- количество добавляемых ферментативных препаратов ПНФ и УФ;
- рН реакционной смеси;
- соотношение субстратов - 2F-Ado и Ara-U;

На основании предыдущих экспериментов по оптимизации условий синтеза кладрибина и рибавирина, концентрация  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  буфера во всех экспериментах была равна наибольшей концентрации одного из субстратов.

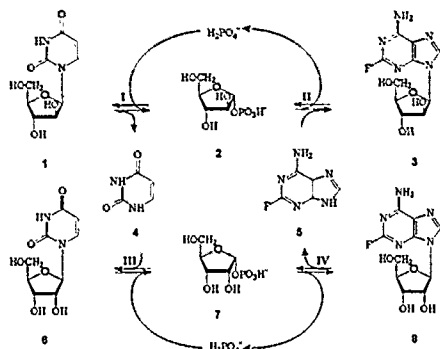


Рис. 16. Схема синтеза флударабина. 1 - 1-β-D-арабинозилурацил; 2 - арабинозо-1-фосфат; 3 - флударабин; 4 - урацил; 5 - 2-фтораденин; 6 - уридин; 7 - рибозо-1-фосфат; 8 - фтораденозин. Реакции I и III катализирует УФ, реакции II и IV катализирует ПНФ.

На рисунке 17 показана зависимость скорости синтез F-ага-А от температуры реакции. Реакционная смесь в объеме 3 мл содержала 10 мМ 2F-Ado, 10 мМ Ага-У, 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 30 ед. акт. ПНФ и 35 ед. акт. УФ. Результаты, показанные на диаграмме, были получены после инкубирования реакционной смеси 15 мин.

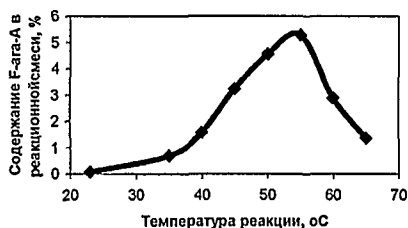


Рис. 17. Влияние температуры на синтез F-ага-А.

Как видно из приведенной зависимости, скорость синтеза F-ага-А максимальна в диапазоне температур 50-55°C. При повышении температуры реакции выше 60°C, ферменты начинали денатурировать и выпадать в осадок в виде белого творожистого осадка. Очевидно, что стабильность ферментов при температуре 50-55°C обусловлена причинами, которые были уже упомянуты выше для синтеза кладрибина.

В таблице 5 представлены данные зависимости содержания F-ага-А в реакционной смеси от количества ед. акт. вносимых в реакцию ферментов за

первые сутки реакции. Количество ед. акт ПНФ и УФ было эквивалентным. Так, при отношении ед. акт. НФ/мг субстрата – 3.2 за 1 сутки образовывалось 30 % F-ага-А в смеси, и на вторые сутки начинался процесс его кристаллизации. Уменьшение удельного количества ферментов в 12 раз приводило к образованию всего 8.6 % F-ага-А, время начала кристаллизации, по достижению концентрации F-ага-А в реакционной смеси 26-30%, увеличивалось до 4 суток.

Для дальнейшей разработки биотехнологического способа синтеза F-ага-А целесообразно увеличить время синтеза за счет снижения удельного количества ферментативных препаратов, поэтому для дальнейших экспериментов нами было выбрано отношение ед. акт. НФ/мг субстрата 0.27.

Таблица 5.

Зависимость содержания F-ага-А в реакционной смеси от количества ед. акт. НФ.

Количество 2F-Ado, мг	НФ, ед. акт.	Отношение ед. акт. НФ/мг субстрата	Содержание F-ага-А (24 ч), %
10	32	3.2	30.1
20	35	1.75	21.3
300	420	1.40	19.2
1000	460	0.46	12.6
600	160	0.27	8.6

Зависимость отношения F-ага-А/2F-Ado в реакционной смеси от pH показана на рисунке 18.

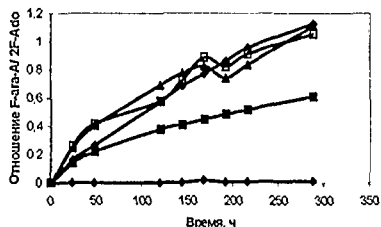


Рис. 18. Зависимость отношения F-ага-А/2F-Ado в реакционной смеси от pH. (◆) - pH 5; (■) - pH 6; (▲) - pH 7; (□) - pH 8; (◇) - pH 9.

Оптимальные значения pH лежат в пределах 7-8. При кислых значениях pH синтез F-ага-А протекает значительно медленнее, чем при нейтральных или щелочных значениях. Эта же зависимость наблюдалась и в синтезе кладрибина.

Уменьшение содержания F-aga-A на 7 сутки реакции (около 170 часов) при pH 7 и pH 8, вызвано его кристаллизацией. При pH 6 и pH 9 F-aga-A практически не кристаллизовался при 50°C, поэтому его общий выход в процессе реакции был ниже.

На рисунке 19 показана зависимость отношения F-aga-A/2F-Ado в реакционной смеси от соотношения субстратов реакции Aga-U и 2F-Ado. Концентрация 2F-Ado была постоянной и равной 10 мМ, тогда как концентрация Aga-U изменялась от 10 мМ до 100 мМ. Из графика видно, что отношение F-aga-U/2F-Ado увеличивается на порядок, при увеличении концентрации Aga-U в 10 раз.

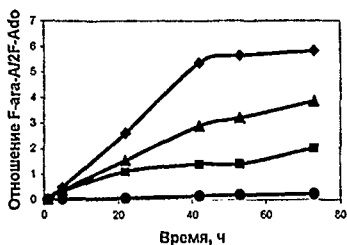


Рис. 19. Влияние избытка Aga-U на соотношение F-aga-A/2F-Ado в реакционной смеси. (●) - концентрация Aga-U 10 мМ; (■) - 30 мМ; (▲) - 50 мМ; (◆) - 100 мМ.

Поэтому, технологический процесс получения F-aga-A желательно было бы проводить при 4-5-кратном избытке Aga-U, однако из-за его высокой себестоимости целесообразно оказалось снизить соотношение Aga-U:2F-Ado до 2:1 и увеличить время реакции.

В результате проведенных экспериментов оптимальными параметрами для синтеза F-aga-A с использованием рекомбинантных ферментов ПНФ и УФ, были выбраны следующие:

- температура реакционной смеси – 50°C;
- соотношение ед. акт. НФ/мг 2F-Ado – 0.27;
- соотношение субстратов реакции Aga-U и 2F-Ado – 2:1
- pH реакционной смеси 7.0;

В оптимальных условиях выход F-aga-A после 300 часов проведения реакции, составил 70%.



## Выводы

1. Осуществлено клонирование генов пурииннуклеозидфосфорилазы, тимидинфосфорилазы и уридинфосфорилазы *E. coli* в экспрессионные векторы серии рЕТ. Получены конститутивные штаммы-суперпродуценты нуклеозидфосфорилаз на основе штамма *E. coli* BL21(DE3).
2. Разработаны эффективные методы выделения и очистки рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз.
3. Показано, что кинетические параметры рекомбинантных ферментов незначительно отличаются от кинетических параметров природных ферментов.
4. Подобраны оптимальные условия реакций трансгликозилирования с использованием полученных полиферментных систем.
5. Разработаны новые биотехнологические способы получения субстанции лекарственных средств на основе модифицированных нуклеозидов (кладрибина, рибавирина и флударабина).

## Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. *Chuvikovskiy D. V., Esipov R. S., Gurevich A. I., Miroshnikov A. I.* Designing the strains superproducing *E. coli* nucleoside phosphorylases and elaborating methods of purification these enzymes. Book of Abstracts. XI International symposium, Novo Mesto, Slovenija, p. 45. 2001.
2. *Esipov R. S., Gurevich A. I., Chuvikovskiy D. V., Chupova L. A., Muravyova T. I., Miroshnikov A. I.* Overexpression of *Escherichia coli* genes encoding nucleoside phosphorylase in the pET/BL21(DE3) system yields active recombinant enzymes. *Protein. Expr. Purif.* (2002) 24, 56-60.
3. *Есипов Р. С., Гуревич А. И., Мирошников А. И., Чувиковский Д. В.* Способ получения рекомбинантной тимидин-фосфорилазы, рекомбинантная плазмидная ДНК pERTPHO1 и штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERTPHO1 – продуцент тимидин-фосфорилазы. Патент РФ №2188234 от 27.08.2002.
4. *Есипов Р. С., Гуревич А. И., Мирошников А. И., Чувиковский Д. В.* Способ получения рекомбинантной уридин-фосфорилазы, рекомбинантная плазмидная ДНК pERURPHO1 и штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERURPHO1 для его осуществления. Патент РФ №2177998 от 10.01.2002.
5. *Есипов Р. С., Гуревич А. И., Мирошников А. И., Чувиковский Д. В.* Способ получения рекомбинантной пуриннуклеозид-фосфорилазы, рекомбинантная плазмидная ДНК pERPUPHO1 и штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERPUPHO1 для его осуществления. Патент РФ №2179188 от 10.02.2002.
6. *Панова Н. Г., Щевелева Е. В., Алексеев К. С., Мухортов В. Г., Зуев А. Н., Михайлов С. Н., Есипов Р. С., Чувиковский Д. В., Мирошников А. И.* Использование 4-тиоуридина и 4-тиотимидина для изучения пиримидиннуклеозидфосфорилаз. *Молекулярн. биология* (2004) 38(5), 907-913.
7. *Константинова И. Д., Леонтьева Н. А., Галегов Г. А., Рыжова О. И., Чувиковский Д. В., Антонов К. В., Есипов Р. С., Таран С. А., Вережкина К. Н., Феофанов С. А., Мирошников А. И.* Биотехнологический способ получения рибавирина. Действие рибавирина и некоторых его комбинаций на репродукцию вируса осповакцины (*Vaccinia Virus*). *Биоорг. химия* (2004); 30(6):613-20.
8. *Chuvikovskiy D., Esipov R., Muravyova T., Miroshnikov A.* Polyzymic systems for the preparation of drugs based on modified nucleosides. *Abstracts/Journal of Biotechnology 118S1* (2005). 12th European Congress on Biotechnology, Copenhagen, p. S43. 2005.

---

Заказ № 2112 Подписано в печать 10.11.2005 Тираж 100 экз. Усл. п. л. 1

---



ООО "Цифровичок", тел. (095) 797-75-76; (095) 778-22-20  
[www.cfr.ru](http://www.cfr.ru) ; e-mail: [info@cfr.ru](mailto:info@cfr.ru)

02 00

РНБ Русский фонд

2007-4

11304



29 DEC 2005