



УДК 577.113.3.017

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РИБАВИРИНА. ДЕЙСТВИЕ РИБАВИРИНА И НЕКОТОРЫХ ЕГО КОМБИНАЦИЙ НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ (Vaccinia Virus)

© 2004 г. И. Д. Константинова**, Н. А. Леонтьева**, Г. А. Галегов**, О. И. Рыжова*,
Д. В. Чувицкий*, К. В. Антонов*, Р. С. Есипов*, С. А. Таран***, К. Н. Веревкина***,
С. А. Феофанов***, А. И. Мирошников*

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва;

***Филиал Института биоорганической химии РАН, г. Пуццано

Поступила в редакцию 17.07.2003 г. Принята к печати 17.11.2003 г.

Усовершенствован биотехнологический способ получения рибавирина, видарабина и 6-азауридина путем применения на стадии микробиологического трансгликозилирования иммобилизованных рекомбинантных ферментных препаратов нуклеозидфосфорилаз. Изучено действие полученного рибавирина и его комбинаций с другими синтезированными нуклеозидами на репродукцию вируса осповакцины-дермовакцины (Vaccinia Virus) в культуре клеток Vero. Показано, что сочетание рибавирина и видарабина обеспечивает противовирусное действие в меньших концентрациях по сравнению с этими соединениями, взятыми в отдельности.

Ключевые слова: рибавирин; видарабин; 6-азауридин; пуриннуклеозидфосфорилаза; уридинфосфорилаза; иммобилизованные ферменты; вирус осповакцины.

ВВЕДЕНИЕ

К наиболее многочисленной группе противовирусных препаратов относятся модифицированные нуклеозиды, сходные по структуре с промежуточными продуктами биосинтеза ДНК и РНК. Механизм противовирусного действия пуриновых и пиримидиновых аналогов заключается в том, что они в составе нуклеотидов включаются в структуру синтезирующейся вирусной ДНК, замещая природные нуклеозиды. В целом ряде случаев это приводит к ингибированию ДНК- и РНК-полимераз, прекращению роста цепи вирусной нуклеиновой кислоты и потере, как следствия, ее инфекционности.

Выраженный ингибирующий эффект в отношении ДНК-содержащих вирусов, в том числе ви-

русов группы герпеса, покс- и аденовирусов, проявляет группа модифицированных нуклеозидов: 5-бром-2'-дезоксидеоксиуридин, 1-β-D-арабинофуранозилцитозин, 9-β-D-арабинофуранозиладенин (видарабин, AraA), нашедшие практическое применение. Выдающееся место в лечении герпесной инфекции занимают ациклические гуанинсодержащие нуклеозиды, например ациклогуанозин (ацикловир). Для системной терапии целого ряда распространенных вирусных инфекций человека (вирусный гепатит С, респираторно-синцитиальная и аденовирусная инфекции) применяется рибавирин (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид), проявляющий широкий спектр антивирусной активности в отношении множества РНК- и ДНК-вирусов [1, 2].

Хотя вирус натуральной оспы человека уже не менее 20 лет не циркулирует в природе и не представляет эпидемиологической и медицинской опасности, представители семейства поксвирусов продолжают вызывать не только научный интерес. В настоящее время вероятность использования отдельных высокопатогенных ортопоксвирусов человека в качестве оружия агрессивного нападения (биотерроризм) не кажется утопией. К эффективным средствам лекарственной терапии ортопоксвирусной инфекции относятся некото-

Сокращения: AraA – 9-β-D-арабинофуранозиладенин, видарабин; AzUr – 6-азауридин; БОЕ – бляшкообразующая единица; ФКЭ – фибробласты куриного эмбриона; ИД₅₀ и ИД₉₀ – дозы препаратов, ингибирующие вирусное цитопатогенное действие на 50 и 90%; ЦД₅₀ – 50% цитотоксическая доза для незараженных клеток Vero; ТЦИД₅₀ – 50% тканевая цитотоксическая инфекционная доза; ТСА – 1,2,4-триазол-3-карбоксамид; ЦПД – цитопатогенное действие вируса.

*Автор для переписки (тел.: (095) 330-72-47; эл. почта: kid@kou.ibch.ru).

рые известные нуклеозиды (рибавирин, видарабин, цидофовир [(S)-1-(3-гидрокси-2-фосфонилметокси-пропил)цитозин], нуклеотиды, изатин- β -тиосемикарбазоны и рекомбинантный α -интерферон [3–5]. Комбинированное воздействие антипоксвирусных соединений на адекватной модели вируса осповакцины изучено минимально. Мы считаем, что применение комбинаций реальных антипоксвирусных веществ, например модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов с α -интерфероном, может открыть новые перспективы лекарственного контроля поксвирусной инфекции человека. Наше исследование посвящено изучению действия рибавирина и его комбинаций с 9- β -D-арабинофуранозиладенином, а также 6-азауридином на репродукцию вируса осповакцины в культуре клеток Vero.

Неуклонный рост и распространенность вирусных заболеваний населения, доказанная на практике эффективность медицинского использования лекарственных препаратов на основе модифицированных нуклеозидов обеспечивают высокий интерес к созданию современных биотехнологических способов производства противовирусных препаратов

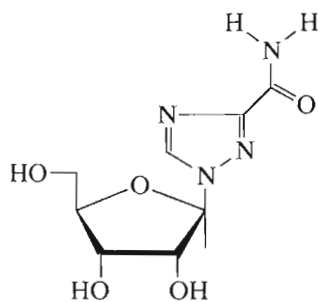
нового поколения для широкого применения в практической медицине.

В связи с этим в настоящей работе мы приводим усовершенствованный высокоэффективный способ получения рибавирина и некоторых других модифицированных аналогов нуклеозидов, основанный на реакции микробиологического трансгликозилирования с помощью иммобилизованных генно-инженерных ферментов нуклеозидфосфорилаз.

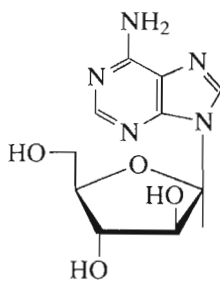
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биотехнологический способ получения модифицированных нуклеозидов

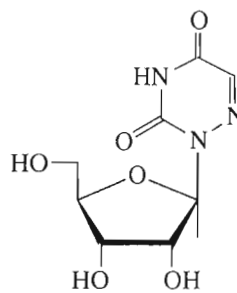
Модифицированные нуклеозиды: рибавирин, видарабин, 6-азауридин в современной медицинской практике применяются для комбинированной терапии вирусных инфекций, лечения ряда особо опасных заболеваний человека, включая бронхиолиты у детей первого года жизни, различные формы герпетических поражений организма и хронический гепатит С.



Рибавирин



AraA



AzUr

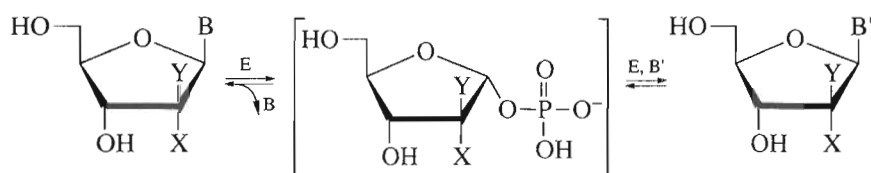
Химический синтез модифицированных нуклеозидов – сложный и многостадийный процесс [6–9], в котором ключевой стадией является реакция гликозилирования модифицированного основания защищенным производным рибозы (арабинозы). Проведение этой реакции селективными химическими методами приводит к образованию рацемической смеси α - и β -аномеров с 90–95% преобладанием природного β -аномера. Отделение минорных примесей неприродного α -аномера – довольно трудоемкий процесс, кроме того, по окончании реакции гликозилирования необходимо удалять защитные группы. Таким образом, количество стадий химических методов синтеза модифицированных нуклеозидов в среднем колеблется от 5 до 9, и соответственно уменьшается суммарный выход целевых продуктов.

Альтернативный способ синтеза природных и модифицированных нуклеозидов основан на реакции микробиологического трансгликозилирования, которая осуществляется с помощью фер-

ментов нуклеозидфосфорилаз (схема 1) [10–13]. В процессе реакции происходит перенос сахарного остатка от природного пуринового или пиримидинового нуклеозида на природное или модифицированное гетероциклическое основание.

Во всех известных работах по получению модифицированных нуклеозидов химико-ферментативным способом для стадии трансгликозилирования в качестве источника нуклеозидфосфорилаз использовались бактериальные штаммы микроорганизмов, полученные путем микробиологического отбора. Интактные клетки этих микроорганизмов или сами ферменты, выделенные из бактерий, и служили катализаторами биохимических превращений [10–15].

В настоящей работе была усовершенствована и оптимизирована технологическая схема получения препаратов рибавирина, видарабина и 6-азауридина с использованием созданных ранее генно-инженерных нуклеозидфосфорилаз, а именно пуриннуклео-



где X = OH, Y = H, B = Gua, B' = 1,2,4-триазол-3-карбоксамид;
 X = H, Y = OH, B = Ura, B' = Ade;
 X = OH, Y = H, B = Ade, B' = 6-азаурацил;
 E – P_{uo}-/Urd-фосфорилазы.

Схема 1. Принципиальная схема реакции трансгликозилирования.

зидфосфорилазы (P_{uo}-фосфорилазы) из штамма суперпродуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERPUPHO1 (КФ 2.4.2.1) [16, 17] и уридинфосфорилазы (Urd-фосфорилазы) из штамма суперпродуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERPUPHO1 (КФ 2.4.2.3) [18], иммобилизованных на аминпропилированном макропористом стекле AP-CPG-170 (Sigma, США). Использование иммобилизованных ферментных препаратов значительно упрощает технологию получения модифицированных нуклеозидов и позволяет многократно использовать каталитическую активность ферментных препаратов (до 15 производственных циклов).

Ферменты иммобилизовали на аминпропилированном макропористом стекле AP-CPG-170, обработанным глутаровым альдегидом по способу [19]. В присутствии боргидрида натрия образуется ковалентная связь между альдегидными группами глутарового альдегида и аминогруппами сорбента и белков [20].

Далее проводили синтез рибавирина по схеме 2. В реакции ферментативного трансгликозилирования необходимо присутствие неорганического фосфата для эффективного образования промежуточного α -D-рибозил-1-фосфата [11]. Оптимальные условия для проведения реакции трансгликозилирования – 60°C, pH 7.0. Подробнее характеристики реакции трансгликозилирования в синтезе модифицированных нуклеозидов приведены в табл. 1.

Нами была показана возможность получения модифицированных нуклеозидов AгаА и AzUr по аналогичной вышеприведенной схеме с использованием бинарной системы иммобилизованных нуклеозидфосфорилаз (P_{uo}- и Urd-фосфорилаз).

Таким образом, разработан эффективный биотехнологический способ получения ряда модифицированных нуклеозидов с помощью иммобилизованных на аминпропилированном макропористом стекле генно-инженерных ферментов нуклеозидфосфорилаз. Простота и универсальность данного подхода позволяют масштабировать процесс и нарабатывать опытные партии модифицированных нуклеозидов для проведения биологического тестирования.

Полученные результаты позволяют прогнозировать принципиальную возможность создания эффективных современных технологических установок по синтезу ряда модифицированных нуклеозидов с применением иммобилизованных генно-инженерных нуклеозидфосфорилаз.

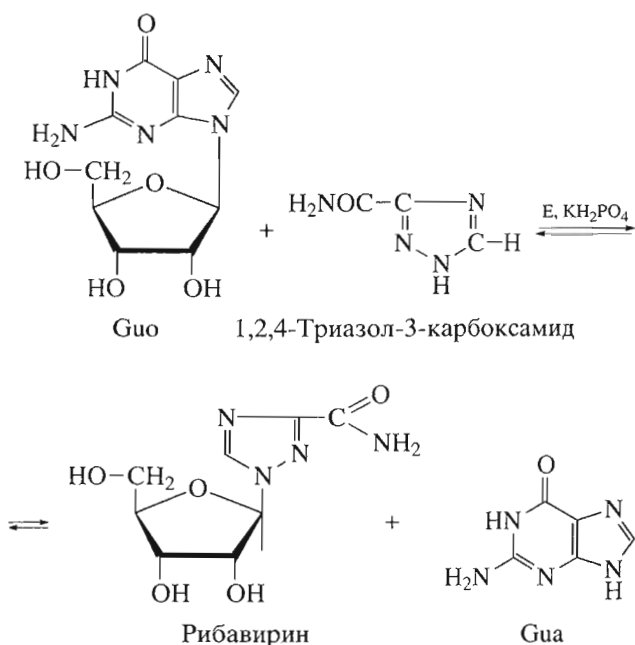
Изучение противовирусной активности модифицированных нуклеозидов

Результаты изучения влияния синтезированного рибавирина, AгаА и их комбинации на репродукцию вируса осповакцины (определялся инфекционный титр вируса (lg БОЕ/мл), рисунок) показа-

Таблица 1. Характеристики реакции трансгликозилирования в синтезе модифицированных нуклеозидов

Субстраты для ферментативной реакции (60°C, pH 7.0)	Иммобилизованный фермент	Время реакции, сут	Содержание целевого продукта*, %	Выход**, %
Guo (60 мМ) TCA (40 мМ) KН ₂ РO ₄ (50 мМ)	P _{uo} -фосфорилаза	1.5	Рибавирин, 92	68
6-Азаурацил (3 мМ) Аденозин (10 мМ) KН ₂ РO ₄ (0.4 мМ)	P _{uo} /Urd-фосфорил- лаза	0.2	6-Азауридин, 19.3	45
1-β-D-Арабинофуранозилурацил (5 мМ) Аденин (6 мМ) KН ₂ РO ₄ (5 мМ)	P _{uo} /Urd-фосфорил- лаза	1	Видарабин, 45.7	56

* ВЭЖХ – контроль инкубационной смеси. ** После очистки (см. “Эксперимент. часть”).



E – иммобилизованная Рнo-фосфорилаза.

Схема 2. Стадия трангликозилирования в химико-ферментативном синтезе рибавирина.

ли, что комбинация этих двух модифицированных нуклеозидов эффективна и наблюдается синергический противовирусный эффект даже при снижении концентрации рибавирина в 4 и АгаА – в 2 раза.

Развитие вирусной инфекции оценивали по выраженности вирусиндуцированного цитопатогенного действия (ЦПД) (табл. 2). Антивирусное действие исследуемых соединений индивидуально или в сочетании оценивали по их способности ингибировать развитие вирусиндуцированного ЦПД на 50% (ИД₅₀), а также по способности соединений практически полностью предотвращать развитие вирусиндуцированного ЦПД (ИД₉₀). Из табл. 2 следует, что все три модифицированных нуклеозида защищают клетки, предотвращают развитие ЦПД вируса осповакцины, но их комбинации ин-

гибируют развитие ЦПД в более низких концентрациях. Это имеет отношение и к варианту вируса осповакцины, резистентному к 5-йод-2'-дезоксисуридину. Сочетание рибавирина и АгаА оказалось наиболее эффективным. Комбинация AzUr и АгаА менее выражена. По-видимому, репродукция вируса осповакцины, исходя из механизма действия АгаА и его 5'-трифосфата, может нарушаться непосредственно на стадии синтеза вирусной ДНК [21]. Одновременно рибавирин, по литературным данным, в виде его 5'-трифосфата снижает эффективность трансляции мРНК вируса осповакцины, так как препятствует формированию кэп-структуры на 5'-конце РНК вируса осповакцины [22–24].

В первичной культуре клеток фибробластов куриного эмбриона мы также получили положительный противовирусный эффект комбинации рибавирина и АгаА. При множественности инфицирования 0.1 БОЕ/клетку и введении соединения непосредственно после инфицирования клеток мы получили нижеследующие результаты (см. табл. 3).

Показано, что рибавирин ИБХ РАН, полученный биотехнологическим способом, эффективно подавляет репродукцию вируса осповакцины в клетках Vero и ФКЭ как при высокой, так и при низкой множественности инфицирования культур клеток. Обнаружено, что сочетание рибавирина и АгаА обеспечивает усиление противовирусного действия в меньших концентрациях по сравнению с этими соединениями, взятыми в отдельности. Рибавирин и АгаА эффективно ингибируют репродукцию варианта вируса осповакцины, резистентного к 5-йод-2'-дезоксисуридину. Этот эффект сохраняется и при использовании комбинации модифицированных нуклеозидов в более низких концентрациях. Реально применение комбинации этих двух соединений с различным механизмом действия на репродукцию вируса осповакцины для возможного лечения и ортопоксвирусной инфекции человека.

Высокая чувствительность репродукции поксвирусов к действию α-интерферона делает целесообразным изучение его противовирусной

Таблица 2. Развитие вирусспецифического цитопатогенного действия в культурах клеток Vero, инфицированных вирусом осповакцины в присутствии рибавирина, АгаА, AzUr и их комбинаций*

Серия	Соединение	ИД ₅₀ , мкг/мл		ИД ₉₀ , мкг/мл		Цитотоксичность – ЦД ₅₀ , мкг/мл
		VV	VV-R	VV	VV-R	
I	Рибавирин	3.0	3.0	3.0	6.0	95
II	АгаА	2.0	2.5	5.0	5.0	37
III	AzUr	20	20	–**	–**	90
IV	Рибавирин/АгаА	0.22/0.22	0.22/0.5	0.5/0.5	0.5/0.5	>50/10
V	Рибавирин/AzUr	3.0/3.5	3.0/3.5	7.5/7.0	7.5/7.0	>25/25
VI	АгаА/AzUr	3.75/1.0	3.75/1.5	7.5/2.0	7.5/3.0	>25/10

* Результат через 72 ч после инфицирования клеток. Множественность инфицирования – 0.001 БОЕ/кл. VV – вирус осповакцины, VV-R – вирус осповакцины, резистентный к 5-йод-2'-дезоксисуридину. **Эффект не достигается.

активности в комбинации с рибавирином и АгаА. Это может быть оптимальной схемой лечения поксвирусной инфекции человека. Вместе с тем, сочетание α -интерферона и рибавирина оказалось эффективным при лечении широко распространенного вирусного гепатита С; такое сочетание реально применять и для терапии недавней вспышки РНК-вирусной инфекции “атипичной пневмонии”, вызываемой коронавирусом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали отечественные растворители и реактивы, а также реактивы фирм “Sigma” (США) и “Chemapol” (Чехия), гуанозин (Новополоцкий завод БВК, Беларусь) без дополнительной очистки.

Для идентификации соединений и для контроля их чистоты применяли ТСХ в системе ацетонитрил–вода, 9 : 1 на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) и НРТLC Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системе растворителей ацетонитрил–вода, 9 : 1 (обнаружение веществ обработкой 70%-ной H₂SO₄ с последующим нагреванием).

Индивидуальность соединений, ход реакции и выходы продуктов контролировали с помощью ВЭЖХ на хроматографе Waters 740 с использованием колонки Altima (0.4 × 25 см) с сорбентом Nucleosil C₁₈, 5 мкм, при элюировании со скоростью 1 мл/мин в следующих системах: система 1: раствор А: H₂O, раствор В: H₂O–CH₃CN, 1 : 1. Градиент В в А: 0–100%, 40 мин, детекция при 214 нм, синтез рибавирина; система 2: раствор А: H₂O, раствор В: H₂O–CH₃CN, 0.3 : 0.7. Градиент В в А: 0% 7 мин, 0–100%, 8–48 мин, детекция при 254 нм, синтез AzUr; система 3: раствор А: H₂O, раствор В: H₂O–CH₃CN, 0.3 : 0.7. Градиент В в А: 0–100%, 40 мин, детекция при 254 нм, синтез АгаА.

Ионообменную хроматографию проводили с использованием колонки (3 × 9 см) с дауэксом 1х8 (ОН⁻), 20–50 меш, а также колонки (2.2 × 12 см) с дауэксом 50Wх8 (Н⁺), 400 меш (Serva).

Колоночную хроматографию осуществляли на носителе C₁₈ Octadecyl = Si 100polyol (0.03 мм) (Serva, США).

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония), а ИК-спектры – на спектрофотометре Hitachi 270–30. ¹H-ЯМР-спектры регистрировали, используя спектрометр Bruker DRX-500 в D₂O. Масс-спектры записывали на спектрометре Finnigan 900 S (ESI).

Получение иммобилизованных ферментных препаратов

Аминопропилированное макропористое стекло AP-CPG-170 (10 г, 125–225 мкмоль первичных аминогрупп/г, 200–400 меш) промывали последователь-

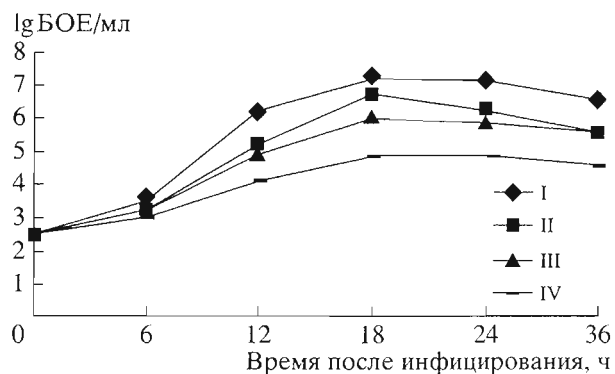
Таблица 3. Влияние рибавирина, АгаА и их комбинаций на репродукцию вируса осповакцины в культуре ФКЭ

Соединение	Концентрация, мкг/мл	Инфекционный титр вируса, lg БОЕ/мл через 48 ч*
(контроль)	–	7.4
Рибавирин	15	6.6
	25	6.0
АгаА	3	6.3
	6	5.7
Рибавирин + АгаА	10 + 2	5.2
	12.5 + 3	4.2

* Множественности инфицирования 0.1 БОЕ/кл. Соединения добавляли непосредственно после инфицирования клеток.

но 40 мл дистиллированной воды, 80 мл этилового спирта, 40 мл дистиллированной воды, 80 мл 0.1 М раствора K₃PO₄, рН 7.3. Подготовленный сорбент отжимали от буфера на стеклянном фильтре, смешивали с 250 мл 5% (по объему) глутарового альдегида в 0.1 М K₃PO₄ при рН 7.3 и выдерживали при перемешивании в течение 10 ч. Сорбент отжимали от реакционной смеси на стеклянном фильтре и промывали 80 мл 0.1 М раствора KN₂PO₄, рН 7.3. Отмытый сорбент отжимали от буфера на стеклянном фильтре, взвешивали. Влажный сорбент готовили непосредственно перед нанесением ферментных препаратов и использовали в течение 1 сут.

Из лиофилизованного порошка Рио-фосфорилазы из штамма суперпродуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERPUPH01 [16, 17] (удельная активность – 20 ед. акт./мг белка; за 1 ед. акт. Рио-фосфорилазы принимали такое количество фермента, которое превращает в гипоксантин 1 мкмоль инозина в 50 мМ растворе фосфорнокислого калия, рН 7.3, в течение 1 мин при температуре 37°C) готовили 30 мл раствора в 50 мМ буферном растворе KN₂PO₄ (рН 7.3) с концентрацией белка 5 мг/мл (определено по методу Лоури [25]).



Влияние рибавирина, АгаА и их комбинаций на репродукцию вируса осповакцины в культуре клеток Vero.

Множественность инфицирования – 5 БОЕ/кл. Препараты добавляли в следующих концентрациях (мкг/мл): I – 0; II – рибавирин – 20; III – АгаА – 5; IV – рибавирин 5 + АгаА 2.5.

Раствор Р_ио-фосфорилазы вносили в сосуд с влажным сорбентом и выдерживали в течение 18–21 ч при 4°C при постоянном мягком перемешивании на качалке, не допуская вспенивания белка и контролируя концентрацию белка в супернатанте в аликвотах по 100 мкл.

По завершении сорбции (содержание белка в супернатанте ≤0.5 мг/мл) сорбент промывали трижды последовательно 60 мл 50 мМ буферного раствора фосфорнокислого калия (рН 7.3) и 20 мл 2 М раствора КСl и затем обрабатывали 20 мл раствора 90 мг боргидрида натрия в дистиллированной воде в течение 1 ч при 4°C. Затем сорбент промывали трижды последовательно 60 мл 50 мМ буферного раствора фосфорнокислого калия и 20 мл 2 М раствора хлористого калия, определяли количество несорбированного белка в промывочных растворах и, по разнице, количество белка, иммобилизованного на 1 г сорбента.

Получали 30 г влажного сорбента, содержащего 90 мг Р_ио-фосфорилазы (по результатам трех экспериментов – 3 мг белка на 1 г влажного сорбента).

Ферментативную активность иммобилизованной рекомбинантной Р_ио-фосфорилазы определяли по способности расщеплять инозин с образованием гипоксантина. За 1 ед. акт. принимали количество фермента, которое превращает 1 мкмоль инозина в течение 1 мин при 37°C. Удельная активность иммобилизованной Р_ио-фосфорилазы в указанных условиях не менее 15 ед. акт. на 1 мг иммобилизованного белка.

Препарат Р_ио-фосфорилазы хранят при температуре –4°C не более четырех недель.

Аналогичным образом получали препарат иммобилизованной Urd-фосфорилазы, выделенной из штамма суперпродуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERUPH01 [18]. Удельная активность иммобилизованного фермента не менее 25 ед. акт. на 1 мг иммобилизованного белка.

1-β-D-Рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид. Смесь 17.0 г (0.06 моль) гуанозина с 4.48 г (0.04 моль) 1,2,4-триазол-3-карбоксамид в присутствии 30 г иммобилизованной Р_ио-фосфорилазы в 1 л 50 мМ КН₂Р_о₄-буфера при рН 7.0 инкубировали при термостатировании в течение 36 ч при 60°C. Контроль полноты процесса осуществляли с помощью ВЭЖХ: процесс считали законченным при содержании рибавирина в реакционной смеси 86–92%.

Реакционную смесь отделяли от иммобилизованного ферментного препарата декантацией. Ферментный препарат промывали 60 мл 50 мМ КН₂Р_о₄ раствора рН 7.0 и использовали повторно в процессе получения рибавирина не менее 15 раз.

Реакционный раствор охлаждали до +4°C, и выпавший осадок гуанина отделяли фильтрованием, промывали 30 мл воды. Фильтрат упаривали в вакууме до небольшого объема и пропускали

через дауэкс (Н⁺-форма) для очистки от следов тяжелых металлов и неорганических катионов, технический рибавирин элюировали водой. Элюат упаривали в вакууме до небольшого объема, пропускали через слой дауэкса (ОН⁻-форма) для очистки от примесей исходных соединений (гуанозина и 1,2,4-триазол-3-карбоксамид), а также неорганического фосфата и следов гуанина. Рибавирин элюировали водой. Полученный водный раствор упаривали в вакууме досуха (55°C), затем высушивали в эксикаторе до постоянного веса и продукт кристаллизовали из этанола с добавлением воды (до 10% по объему). Белый кристаллический порошок высушивали при температуре 100°C в течение 5 ч. Выход продукта 6.60 г (68%), содержание основного вещества 99.9% (ВЭЖХ, система 1);

$[\alpha]_D^{20}$ –36.2 (с 1; Н₂О); т. пл. 168–170°C; R_f 0.48; λ_{max} , нм (ϵ , М⁻¹ см⁻¹): 205.6 (11300–11400) (лит. данные: т. пл. 166–168°C [6]); m/z : 245.5 [M + H]⁺, 267.1 [M + Na]⁺, 282.9 [M + K]⁺, 487.9 [2M]⁺, 510.0 [2M + Na]⁺, 526.0 [2M + K]⁺. ¹H-ЯМР (D₂O, δ , м. д., КССВ, Гц): 8.80 (1 Н, уш. с, Н5), 6.20 (1 Н, д, Н1', J_{1',2'} 3.44), 4.71 (1 Н, дд, Н2', J_{2',1'} 3.44, J_{2',3'} 5.27), 4.55 (1 Н, дд, Н3', J_{3',2'} 5.27, J_{3',4'} 5.27), 4.28 (1 Н, тд, Н4', J_{4',3'} 5.27, J_{4',5a'} 3.21, J_{4',5b'} 5.27), 3.93 (1 Н, дд, Н5a', J_{5a',5b'} 12.6, J_{5a',4'} 3.21), 3.82 (1 Н, дд, Н5b', J_{5b',5a'} 12.6, J_{5b',4'} 5.27).

6-Азауридин. Смесь 0.53 г (1.9 ммоль) аденозина с 0.068 г (0.6 ммоль) 6-азаурицила в присутствии иммобилизованных Р_ио- и Urd-фосфорилаз (соответственно 2 и 3 г) в 0.2 л 0.4 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7.0, перемешивали в течение 4.8 ч при 60°C. Контроль полноты процесса осуществляли с помощью ВЭЖХ: процесс считается законченным при содержании 6-азауридина в реакционной смеси 18–19%.

Реакционную смесь отделяли от иммобилизованного ферментного препарата декантацией. Сорбент с иммобилизованными ферментами промывали 30 мл 50 мМ калий-фосфатного буферного раствора и использовали повторно в процессе получения 6-азауридина.

Раствор упаривали в вакууме до небольшого объема и пропускали через сорбент C₁₈ Octadecyl = Si 100polyol (0.03 мм). 6-Азауридин элюировали водой. Фракции, содержащие более 95% целевого вещества, собирали и упаривали в вакууме досуха, затем высушивали в эксикаторе до постоянного веса и кристаллизовали из этанола. Белый кристаллический порошок высушивали при 50°C в течение 5 ч. Получено 66 мг (45% в пересчете на 6-азаурицил), содержание основного вещества 99% (определено по данным ВЭЖХ в системе 2 сравнением с заведомым стандартом). Т. пл. 159–161°C; λ_{max} , нм (ϵ , М⁻¹ см⁻¹): 262.3 (6100).

9-β-D-Арабинофуранозиладенин. Смесь 0.24 г (1.0 ммоль) 1-β-D-арабинофуранозилурицила [26] с 0.162 г (1.2 ммоль) аденина в присутствии 2 г

иммобилизованной Р₁₀₀-фосфорилазы и 3 г иммобилизованной Urd-фосфорилазы в 0.2 л 5 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7.0, перемешивали в течение 24 ч при 60°C. Контроль полноты процесса осуществляли с помощью ВЭЖХ: процесс считается законченным при содержании 9-β-D-арабинофуранозиладенина в реакционной смеси 45–46%.

Реакционную смесь отделяли от иммобилизованного ферментного препарата декантацией. Ферментный препарат промывали 30 мл 50 мМ калий-фосфатного буферного раствора и использовали повторно в процессе получения 9-β-D-арабинофуранозиладенина.

Реакционный раствор упаривали в вакууме до небольшого объема и пропускали через сорбент Octadecyl = Si 100polyol (0.03 мм). Продукт элюировали водой. Фракции, содержащие более 95% целевого вещества, собирали, растворитель удаляли в вакууме досуха, затем высушивали в эксикаторе до постоянного веса и кристаллизовали из метанола. Белый кристаллический порошок высушивали при температуре 50°C в течение 5 ч. Выделено 0.15 г (56% в пересчете на 1-β-D-арабинофуранозилурацил), содержание основного вещества – 98% (определено по данным ВЭЖХ в системе 3 сравнением с заведомым образцом). Т. пл. 257–258°C; λ_{max}, нм (ε, М⁻¹ см⁻¹): 259 (13100).

Противовирусная активность рибавирина и других модифицированных нуклеозидов

Для изучения противовирусной активности использовали рибавирин ИБХ РАН, полученный по приведенной выше методике с использованием иммобилизованных ферментов, в отдельных экспериментах как стандарт сравнения использовали рибавирин производства “ICN Pharmaceutical” (США); 6-азауридин получен из Института органической химии (Прага, Чехословакия); 9-β-D-арабинофуранозиладенин и 5-йод-2'-дезоксинуридин производства Sigma (США).

Клетки. Использовали перевиваемую культуру клеток Vero (клетки почек африканских зеленых марьшшек). В качестве среды поддержки – питательную среду ИГЛА МЕМ, содержащую 10% эмбриональной сыворотки телят (ПАНЭКО, Россия). Клетки культивировали в 96-луночных пластиковых панелях (Linbro, Flow Lab., Великобритания) в атмосфере, содержащей СО₂.

Вirus. Использовали вирус осповакцины (осповакцина-дермовакцина, штамм 113), полученный из музея вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва.

Множественность инфицирования клеток для каждого эксперимента указана в таблицах и на рисунке.

Подавление репродукции вируса осповакцины в культуре клеток Vero оценивали по величине инфекционного титра вируса (lg БОЕ/мл, рисунок). Рибавирин добавляли к клеткам до инфицирования, к сериям II, IV в концентрации 10 мкг/мл. Через 45 мин среду поддержки в сериях I–IV удаляли, клетки инфицировали (множественность инфицирования – 5 БОЕ/кл). Непосредственно после этого добавляли препараты в следующих концентрациях (мкг/мл): I – 0 (контроль); II – рибавирин – 20; III – АгаА – 5; IV – рибавирин 5 + АгаА 2.5.

Противовирусное действие оценивали методом [27] по способности изучаемых соединений ингибировать развитие вирусиндуцированного ЦПД максимумально через 72 ч после инфицирования клеток (табл. 2). Соединения (отдельно и в комбинации) добавляли в концентрации (мкг/мл): рибавирин – 5, АгаА – 2, AzUr – 10. Через 60 мин среду поддержки удаляли, клетки инфицировали вирусом (множественность инфицирования 0.001 БОЕ/клетку), и изучаемое соединение добавляли непосредственно после этого в среду поддержки. Определяли эффективные противовирусные концентрации соединений и их комбинаций во всех шести экспериментальных сериях по сравнению с полным ЦПД в контрольных инфицированных культурах: ИД₅₀ и ИД₉₀ – концентрации соединения, которые предотвращают развитие вирусного ЦПД не менее чем на 50 и 90%.

Вариант вируса осповакцины, резистентной к 50 мкг/мл 5-йод-2'-дезоксинуридина (VV-R), получали путем 5-кратного серийного пассирования вируса в присутствии возрастающей концентрации этого ингибитора [28].

Цитотоксичность клеток определяли с помощью стандартного метода, используя способность мертвых клеток окрашиваться красителем трипановым синим [4]. За величину ЦД₅₀ принимали ту концентрацию соединения, которая обеспечивала 50% выживаемости неинфицированных клеток Vero через 72 ч контакта с тестируемыми соединениями (табл. 2).

Подавление репродукции вируса осповакцины в культуре ФКЭ оценивали по величине инфекционного титра вируса (lg БОЕ/мл) через 48 ч после инфицирования (табл. 3). Множественность инфицирования составляла 0.1 БОЕ/кл. Непосредственно после инфицирования клеток были добавлены рибавирин, АгаА и в комбинации в концентрациях, указанных в табл. 3.

Определяли эффективность рибавирина (ИБХ РАН) в сравнении с рибавирином “ICN Pharmaceutical” в отношении гриппозной А-инфекции в культуре клеток MDCK (штамм H3N2/Aichi/68). Среда поддержки вирусинфицированной культуры клеток включала трипсин. И рибавирин ИБХ и рибавирин “ICN Pharmaceutical” в диапазоне нецитотоксичной концентрации 6–25 мкг/мл снижают репродукцию вируса гриппа на 2.15–3.1 lg ТЦИД₅₀/мл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Eliot G.B.* // Antiviral Chemotherapy. New Directions / Eds Mills I., Corey L. Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 118–137.
2. *Roizman B., Sears A.* // Virology / Ed. Field H.J. New York: Lippincott-Raven, 1996. P. 2231–2295.
3. *Marques V.E.* // Phosphonylmethyl Ether of Nucleosides and their Acyclic Analogues as Antiviral Agents / Ed. Martin J.C. Washington: American Chemical Society, 1989. P. 140–155.
4. *Holy A., De Clercq E., Votruba I.* // Phosphonylmethyl Ether of Nucleosides and their Acyclic Analogues as Antiviral Agents / Ed. Martin J.C. Washington: American Chemical Society, 1989. P. 50–71.
5. *Joklik W.K., Jungwirth C., Oda K., Woodson B.* // Molecular Biology of Viruses / Eds Colter J.C., Paranchych W. New York; London: Acad. Press, 1969. P. 473–494.
6. *Witkowski J.T., Robins R.K., Sidwell R.W., Simon L.N.* // J. of Med. Chem. 1972. V. 15. P. 1150–1154.
7. *Reist E.J., Benitez A., Goodman L., Baker B.R., Lee W.W.* // J. Org. Chem. 1962. V. 27. P. 3274–3279.
8. *Лукевиц Э.Я., Заболоцкая А.Е.* Силлильный метод синтеза нуклеозидов. Рига: Зинатне, 1985.
9. *Prystas M., Gut J., Sorm F.* // Chem. & Ind. London. 1961. № 25. P. 947–948.
10. *Hennen W.J., Wong C.H.* // J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 4692–4695.
11. *Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D.* // Pharmacology & Therapeutics. 2000. V. 88. P. 349–425.
12. *Shirae H., Yokozeki K., Kubota K.* // Agric. Biol. Chem. 1988. V. 52. P. 295–296.
13. *Krenitsky T.A., Koszalka G.W., Tuttle J.V., Rideout J.L., Eliot G.B.* // Carbohydrate Res. 1981. V. 97. P. 139–146.
14. *Hori N., Watanabe M., Sunagawa K., Uehara K., Mikami Y.* // J. Biotechnol. 1991. V. 17. P. 121–131.
15. *Mikhailopulo I.A., Zinchenko A.I., Bokut S.B., Dudchik N.V., Barai V.N., Kalinichenko E.N.* // Biotechnol. Lett. 1992. V. 14. P. 885–890.
16. *Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovskiy D.V., Chupova L.A., Muravyova T.I., Miroshnikov A.I.* // Protein Express. Purif. 2002. V. 24. P. 56–60.
17. *Есипов Р.С., Гуревич А.И., Мирошников А.И., Чувиковский Д.В.* // Патент РФ № 2179188, 10.02.2002.
18. *Есипов Р.С., Гуревич А.И., Мирошников А.И., Чувиковский Д.В.* // Патент РФ № 2177998, 10.01.2002.
19. *Jurkiewicz M., Alegret S., Fabregas E.* // Anal. Chim. Acta. 1998. V. 370. P. 47–58.
20. *Kito M., Tawa R., Takeshima S., Hirose S.* // J. Chromatogr. 1990. V. 528. P. 91–99.
21. *North T.W., Cohen S.S.* // International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics: Viral Chemotherapy / Ed. Shugar D. Oxford: Pergamon, 1984. P. 303–340.
22. *Галегов Г.А., Флорентьев В.Л., Львов Н.Д., Петрова И.Г.* // Вопросы мед. химии. 1987. № 1. С. 40–51.
23. *Toltzis P.* // Antiviral Chemotherapy. New Directions / Eds Mills I., Corey L. Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 75–78.
24. *Sidwell R.W.* // Ribavirin. A Broad Spectrum Antiviral Agent / Ed. Smith R.S. New York: Acad. Press, 1981. P. 23–42.
25. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
26. *Furukawa Y., Honjo M.* // Chem. Pharm. Bull. 1968. V. 16. P. 2286–2288.
27. *De Clercq E., Descamps J., Verheist G., Walker R.T., Jones A.S., Torrence P.F., Shugar D.* // J. Infect. Dis. 1980. V. 141. P. 563–573.
28. *Field H.J., Darby G., Wildy P.* // J. Gen. Virol. 1980. V. 49. Part 1. P. 115–124.

Ribavirin: Biotechnological Synthesis and Effect on the Reproduction of *Vaccinia* Virus

I. D. Konstantinova[#], N. A. Leont'eva^{**}, G. A. Galegov^{**}, O. I. Ryzhova^{*},
D. V. Chuvikovskii^{*}, K. V. Antonov^{*}, R. S. Esipov^{*}, S. A. Taran^{***},
K. N. Verevkin^{***}, S. A. Feofanov^{***}, and A. I. Miroshnikov^{*}

[#]Phone: +7(095) 330-7247; e-mail: kid@kou.ibch.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}Ivanovskii Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Gamalei 16, Moscow, 123098 Russia

^{***}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch), Russian Academy of Sciences,
pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

The biotechnological method of synthesis of ribavirin, vidarabin, and 6-azauridine by the use of immobilized recombinant enzymatic preparations of nucleoside phosphorylase was improved. The effect of ribavirin and its combinations with the other synthesized nucleosides on the reproduction of *Vaccinia* virus was studied using cultures of Vero cells. The combination of ribavirin and vidarabin was shown to provide an antiviral effect at lesser concentrations than when these compounds were taken separately. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: 6-azauridine, immobilized enzymes, purine nucleoside phosphorylase, ribavirin, uridine phosphorylase, *Vaccinia* virus, vidarabin