

УДК 57.037:577.113.3:577.151.45: 615.013

И. А. ЦИБУЛЬСКАЯ, Т. И. КУЛАК, Т. Н. БУРАВСКАЯ, М. Б. ГОЛУБЕВА, П. С. ШАБУНЯ,
С. А. ФАТЫХОВА, П. В. КУРМАН, член-корреспондент Е. Н. КАЛИНИЧЕНКО

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ ДИАЦИЛГЛИЦЕРОФОСФАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФЛУДАРАБИНА

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
ilonaolenikova@tut.by; kulak@iboch.bas-net.by; buravskaya@iboch.bas-net.by; kuzm@iboch.bas-net.by;
iboh_lfhi@rambler.ru; peter_kurman@tut.by; kalinichenko@iboch.bas-net.by

Установлено, что в результате внутрижелудочного введения 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных флударабина крысам Вистар и аутбредным мышам ICR наблюдается пролонгированное выделение и более длительная циркуляция нуклеозида в системном кровотоке животных, чем после введения эквимолярных количеств флударабина фосфата. Изученные фосфолипидные производные могут рассматриваться в качестве пероральных пролекарств флударабина. Показано, что оральная биодоступность флударабина из его 1,2-димиристоилглицерофосфатного производного у животных близка к его оральной биодоступности из эквимолярного количества флударабина фосфата. На основании данных, полученных в модельных экспериментах *in vitro*, можно предположить, что флударабин может выделяться из полученных пролекарств под действием ферментов, принадлежащих к семействам фосфолипаз А и Д, а также фосфодиэстераз.

Ключевые слова: флударабин, диацилглицерофосфаты, пролекарства, биодоступность, конъюгаты, ферментативный гидролиз, фармакокинетика.

I. A. TSYBULSKAYA, T. I. KULAK, T. N. BURAVSKAYA, M. B. GOLUBEVA, P. S. SHABUNYA,
S. A. FATYKHOVA, P. V. KURMAN, E. N. KALINICHENKO

PHARMACOKINETIC PROPERTIES AND THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF DIACYLGLYCEROPHOSPHATE FLUDARABINE DERIVATIVES

Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Belarus
ilonaolenikova@tut.by; kulak@iboch.bas-net.by; buravskaya@iboch.bas-net.by; kuzm@iboch.bas-net.by;
iboh_lfhi@rambler.ru; peter_kurman@tut.by; kalinichenko@iboch.bas-net.by

It is shown that the intragastric administration of 1,2- and 1,3-diacylglycerphosphate fludarabine derivatives to Wistar rats and ICR outbred mice leads to a prolonged circulation of fludarabine in animal serum in comparison with the analogous administration of equimolar fludarabine phosphate. The investigated compounds can be regarded as oral fludarabine prodrugs. It is found that the oral bioavailability of fludarabine from its 1,2-dimyristoylglycerophosphate derivative is close to its oral bioavailability from equimolar fludarabine phosphate. Based on the data of the model *in vitro* experiments, we can suppose that fludarabine can release from its diacylglycerphosphate prodrugs under the action of phospholipases A and D and phosphodiesterases.

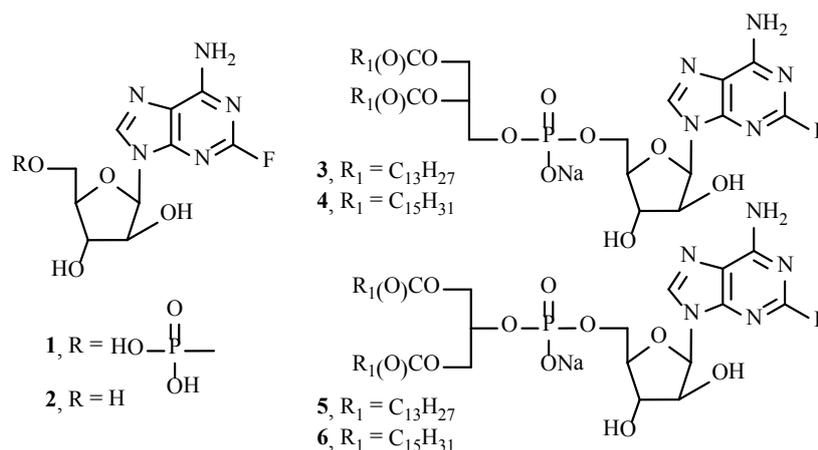
Keywords: fludarabine, diacylglycerophosphates, prodrugs, bioavailability, conjugates, enzymatic hydrolysis, pharmacokinetic.

Введение. Флударабина фосфат (5'-монофосфат 9-β-D-арабинофуранозил-2-фтораденина, F-ага-AMP, **1**) – эффективный противоопухолевый препарат, который используют в медицинской практике для лечения В-клеточного хронического лимфолейкоза, неходжкинских лимфом и других онкогематологических заболеваний [1]. Флударабина фосфат как лекарственное средство имеет ряд недостатков, к числу которых относятся короткое время полужизни в плазме и быстрый метаболизм [2]. Для устранения такого рода недостатков лекарственных средств нуклеозидной природы было предложено использовать данные соединения в виде их липидных производных [3]. Известно, что липидные пролекарственные формы нуклеозидов могут проявлять улучшенную биодоступность и повышенную биостабильность по сравнению с исходным лекарственным средством [4].

Принято считать, что природные фосфолипиды метаболизируются фосфолипазами А и лизофосфолипазами. Было показано, что подобным образом могут протекать и первые стадии метаболизма 1,2-диацилглицерофосфолипидных производных противовирусных нуклеозидов, таких как азидотимидин (AZT) [5]. Основными продуктами метаболизма 1,2-димиристоилфосфатидил-AZT в СЕМ-клетках являются лизофосфатидил-AZT и глицеро-3-фосфо-5'-AZT. Предполагается, что последнее соединение может гидролизываться фосфодиэстеразами до AZT или AZT-5'-монофосфата, с последующим фосфорилированием киназами до активного AZT-5'-трифосфата [6]. Сходные метаболические пути описаны в случае *sn*-1-пальмитоил-*sn*-2-олеоилфосфатидил-AZT [7].

В литературе мало данных о липидных производных флударабина (2). Описаны несколько алкилфосфолипидных производных F-ага-А, проявивших эффективность в отношении клеток карциномы молочной железы [8]. Недавно нами получены соединения 3–6, представляющие собой конъюгаты флударабина с 1,2-диацилглицерофосфатами, а также их неприродными 1,3-изомерами. Синтез соединений 3–6 был осуществлен с использованием Н-фосфонатного подхода и комбинации трет-бутилдиметилсилильной и левулиновой защитных групп для флударабинового фрагмента [9].

Ранее было показано, что 1,3-изомеры природных 1,2-диацилглицерофосфохолинов также являются субстратами фосфолипазы А₂ (ФЛА₂). Было установлено, что данный фермент способен не только отщеплять ацильную группу в *sn*-2 положении глицеринового остова 1,2-диацилглицерофосфохолинов, но и осуществлять гидролиз ацильного остатка в *sn*-1 положении их синтетических 1,3-изомеров, при этом скорость отщепления ацильной группы в последнем случае заметно ниже по сравнению с гидролизом природных производных [10].



Мы предположили, что 1,3-диацилглицерофосфолипидные производные нуклеозидов также могут являться субстратами ФЛА₂ и проходить первую стадию метаболизма (деацилирование) с последующим выделением нуклеозида/нуклеотида. Первые данные в пользу этого предположения были получены нами при изучении процессов энзиматического гидролиза 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных 1-(β-D-рибофуранозил)-1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (известного противовирусного препарата рибавирина) панкреатической фосфолипазой А₂. Было обнаружено, что как 1,2-, так и 1,3-диацилглицерофосфаты рибавирина являются субстратами ФЛА₂, однако деацилирование 1,2-диацилпроизводных протекает значительно быстрее, чем гидролиз соединений, содержащих фрагменты синтетических 1,3-диацилглицеролипидов [11]. Таким образом, ввиду разницы в скоростях протекания энзиматической реакции, ответственной за начальную стадию метаболизма 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных, можно было ожидать заметных различий и в фармакокинетических свойствах изомерных конъюгатов нуклеозидов.

Цель работы – определение фармакокинетических параметров фосфолипидных производных флударабина при их пероральном применении у животных, а также изучение способности этих соединений гидролизываться ферментами, обладающими фосфолипазной и фосфодиэстеразной активностью.

Материалы и методы исследования. Крысы Вистар (190–210 г) и аутбредные мыши ICR (самцы, 25–30 г) были получены из вивария Института биоорганической химии НАН Беларуси. Эксперименты на животных проводились в соответствии с принципами работы с лабораторными животными, указанными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS 123) [12].

В работе использовали панкреатическую ФЛА₂ из поджелудочной железы свиньи (кат. № P6534), фосфолипазу Д (ФЛД) из *Streptomyces* sp. (кат. № P4912) и фосфолипазу С (ФЛС) из *Clostridium perfringens* (*C. welchii*, кат. № P7633) производства Sigma-Aldrich, а также фосфодиэстеразу (ФДЭ) из *Crotalus durissus* (кат. № 108260, Boehringer Mannheim).

Определение содержания флударабина в сыворотке крови экспериментальных животных. Для осаждения белков к образцам сыворотки (100 мкл) добавляли 50 %-ный водный СН₃ОН (50 мкл) и СН₃CN (250 мкл) и центрифугировали 10 мин при 4600 об/мин. Супернатант анализировали с помощью ВЭЖХ. Образцы сыворотки необработанных животных готовили аналогичным образом. Раствор флударабина (**2**) для калибровочных кривых готовили растворением нуклеозида в сыворотке необработанного животного. Концентрацию F-ara-A (**2**) в образцах сыворотки (5 мкл) определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Waters (США) с УФ детектором при длине волны 260 нм. Разделение проводили на колонке Nucleodur EC C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) при элюировании смесью СН₃ОН / 0,1М КН₂РО₄, 20 : 80, со скоростью 0,7 мл/мин при 40 °С.

Фармакокинетические параметры определяли используя программу GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Значения фармакокинетических параметров представлены в виде $X \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) пяти независимых экспериментов. Результаты проанализированы с использованием *t*-теста Стьюдента ($P < 0,05$).

Энзиматический гидролиз фосфолипидных конъюгатов флударабина ФЛА₂. К 1,279 мкмоль каждого из конъюгатов **3–6** добавляли 10 мМ раствор дезоксихолата натрия (0,38 мл) и 0,05 М Трис-НСI буфер (рН 8,1, 1 мМ Са²⁺) (1,62 мл). Смесью подвергали воздействию ультразвука в ультразвуковой бане Elmasonic S 10H (4 × 10 мин) и добавляли при 37 °С раствор ФЛА₂, содержащий 21 мкг белка. Пробы реакционной смеси (0,25 мл) отбирали в определенные промежутки времени (*t*), гидролиз останавливали добавлением 10 мМ раствора ЭДТА (0,061 мл). Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ с использованием хроматографа Waters (США) с УФ детектором (260 нм) и колонки Poroshell 120 EC-C18 (50 × 4,6 мм, 2,7 мкм) при скорости потока 0,7 мл/мин, 25 °С, в условиях элюирования смесью СН₃ОН/СН₃CN/ 0,05 % NH₄ОAc (45 : 50 : 5). Определяли концентрации (*c*) негидролизованного конъюгата и его лизо-производного. Значения начальных скоростей (V_0) и времен половинного гидролиза ($\tau_{1/2}$) для соединений **3–6** определяли из графических зависимостей *c–t*. Результаты представлены в виде средних значений трех независимых экспериментов.

Энзиматический гидролиз конъюгатов флударабина ФЛД. К 1,066 мкмоль каждого из соединений **3–6** добавляли СНСI₃ (0,67 мл) и 0,1 М натрий-ацетатный буфер (рН 5,6, 40 мМ Са²⁺, 0,33 мл). Реакцию гидролиза начинали при 37 °С добавлением раствора ФЛД (12,5 ед. акт.) при перемешивании (300 об/мин). После 24 ч реакционную смесь разбавляли СН₃ОН (1,4 мл) и анализировали с помощью ВЭЖХ, как описано выше для гидролиза ФЛА₂. Для каждого соединения определяли степень гидролиза через 24 ч от начала реакции (α_{24h} , %). Результаты представлены в виде среднего значения трех независимых экспериментов.

Энзиматический гидролиз фосфолипидных производных флударабина ФДЭ. К 11,34 мМ раствору каждого из конъюгатов **3–6** в 0,05М Трис-НСI буфере (рН 7,33, 0,1 мл) добавляли при 37 °С раствор ФДЭ (10 мкг) в глицерине. Через 48 и 168 ч пробы реакционных смесей нагревали до кипения, фильтровали через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и анализировали методом ВЭЖХ (колонка Nucleodur EC C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм), 40 °С; подвижная фаза А – 0,05 % NH₄ОAc, подвижная фаза В – СН₃CN, скорость потока 1 мл/мин; программа элюирования: фаза В от 0 до 95 % за 20 мин, изократическое элюирование смесью А/В, 5 : 95, в течение 40 мин). Для каждого конъюгата рассчитывали степень гидролиза через 48 и 168 ч от начала реакции (α_{48h} и α_{168h} , %). Данные представлены в виде среднего значения из двух независимых экспериментов.

Определение состава смесей энзиматического гидролиза фосфолипидных конъюгатов флударабина методом хромато-масс-спектрометрии. Состав смесей энзиматического гидролиза соединений **3–6** анализировали на хроматографе Agilent 1200 (США) с масс-детектором Agilent 6410 Triple Quad на колонке Zorbax Eclipse Plus C18 (100 × 3,0 мм; 1,8 мкм) при 30 °С, объем пробы – 2 мкл. Подвижная фаза А – 8 мМ NH₄OAc; подвижная фаза В – CH₃CN, скорость потока 0,4 мл/мин; программа элюирования: фаза В от 5 до 95 % за 10 мин, изократическое элюирование смесью А/В, 5 : 95, в течение 12 мин. Параметры масс-детектора: электро-спрей (API-ES) с позитивной ионизацией Agilent G1948В, фрагментационный вольтаж 60 В, регистрируемый диапазон *m/z* 150–1200. Капиллярный вольтаж – 4000 В, давление небулайзера 30 psi, скорость потока газа-осушителя (N₂) 10 л/мин, температура газа 350 °С.

Результаты и их обсуждение. Известно, что после введения флударабина фосфата (**1**) в крови происходит его быстрый количественный гидролиз до флударабина (**2**), который затем проникает в клетки, где рефосфорилируется нуклеозидкиназами до цитотоксического метаболита – 5'-трифосфата F-ara-A. Для предварительной оценки фармакокинетических свойств фосфолипидных производных флударабина **3–6** было изучено содержание флударабина (**2**) в сыворотке крови крыс Вистар после однократного внутривенного введения флударабина фосфата (**1**) в дозе 30 мг/кг и его липидных производных **3–6** в эквимоларных дозах, равных 72 мг/кг для димиристоильных производных **3, 5** и 77 мг/кг для дипальмитатов **4, 6**. Каждое соединение было введено восьми животным в виде суспензии в 2 %-ном растворе гуммиарабика. Образцы сыворотки были получены из крови, отбираемой в определенные промежутки времени после введения тестируемых соединений, используя одно животное для каждой временной точки. Концентрацию флударабина в сыворотке крови определяли методом ВЭЖХ.

После введения 1,2-димиристоилглицерофосфатного производного **3** концентрация флударабина (**2**) в сыворотке крови крыс достигала максимального значения (1900 нг/мл) за 2,9 ч; в случае 1,2-дипальмитата **4** максимальный уровень нуклеозида **2** (1350 нг/мл) наблюдался через 4,0 ч, затем его концентрация постепенно уменьшалась в течение 24 ч наблюдения; время полувыведения F-ara-A (**2**) составляло 10,4 и 6,5 ч соответственно. Максимальная концентрация флударабина в сыворотке крови крыс после введения 1,3-изомерных конъюгатов **5** и **6** была ниже: около 1150 нг/мл через 3,5 ч и 600 нг/мл через 3,3 ч соответственно. После введения флударабина фосфата наблюдался быстрый рост, а затем быстрое снижение концентрации флударабина, максимальная концентрация которого (3800 нг/мл) была достигнута через 1 ч после приема соединения **1**, а затем уменьшилась вдвое через 1,25 ч, что согласуется с фармакокинетическими параметрами, описанными в литературе [13]. Площадь под фармакокинетической кривой (AUC_{0–24}) флударабина, выделившегося из конъюгата **3**, была почти такой же, как после введения эквимоларного количества флударабина фосфата. Оральная биодоступность флударабина из 1,2-диацилглицерофосфатных производных **3** и **4** составила 99 и 71 % соответственно от его оральной биодоступности из флударабина фосфата. В случае 1,3-диацилглицерофосфатных производных флударабина эти значения составили 54 % для конъюгата **5** и 34 % для липидного производного **6**.

На основании полученных данных для дальнейшего более детального фармакокинетического исследования был выбран 1,2-димиристоилглицерофосфат флударабина **3**, который характеризовался наибольшей биодоступностью. Флударабина фосфат (50 мг/кг) и производное **3** (120,4 мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы самцам аутобредных мышей ICR. Образцы сыворотки были получены из крови, забираемой через 0,5, 1, 2, 4, 8 и 24 ч после введения исследуемых соединений. Концентрацию флударабина определяли методом ВЭЖХ. Фармакокинетические параметры флударабина у мышей ICR после внутривенного введения флударабина фосфата (**1**) и конъюгата **3** приведены в табл. 1.

Концентрация флударабина в сыворотке крови мышей после введения фосфолипидного производного **3** достигала максимального значения 1613 ± 247 нг/мл за 2,8 ± 1,1 ч, затем медленно снижалась за 24 ч. Период полувыведения флударабина составлял 14,2 ± 2,6 ч. Подобно отмеченному ранее у крыс, при введении F-ara-AMP (**1**) наблюдался быстрый рост концентрации флударабина, а затем ее быстрый спад: максимальная концентрация 8989 ± 2537 нг/мл достигалась за 0,9 ± 0,2 ч после введения, затем она уменьшалась наполовину за 1,5 ± 0,4 ч. Оральная биодо-

Т а б л и ц а 1. **Фармакокинетические параметры флударабина у мышей ICR после внутрижелудочного введения флударабина фосфата (1) и конъюгата 3**

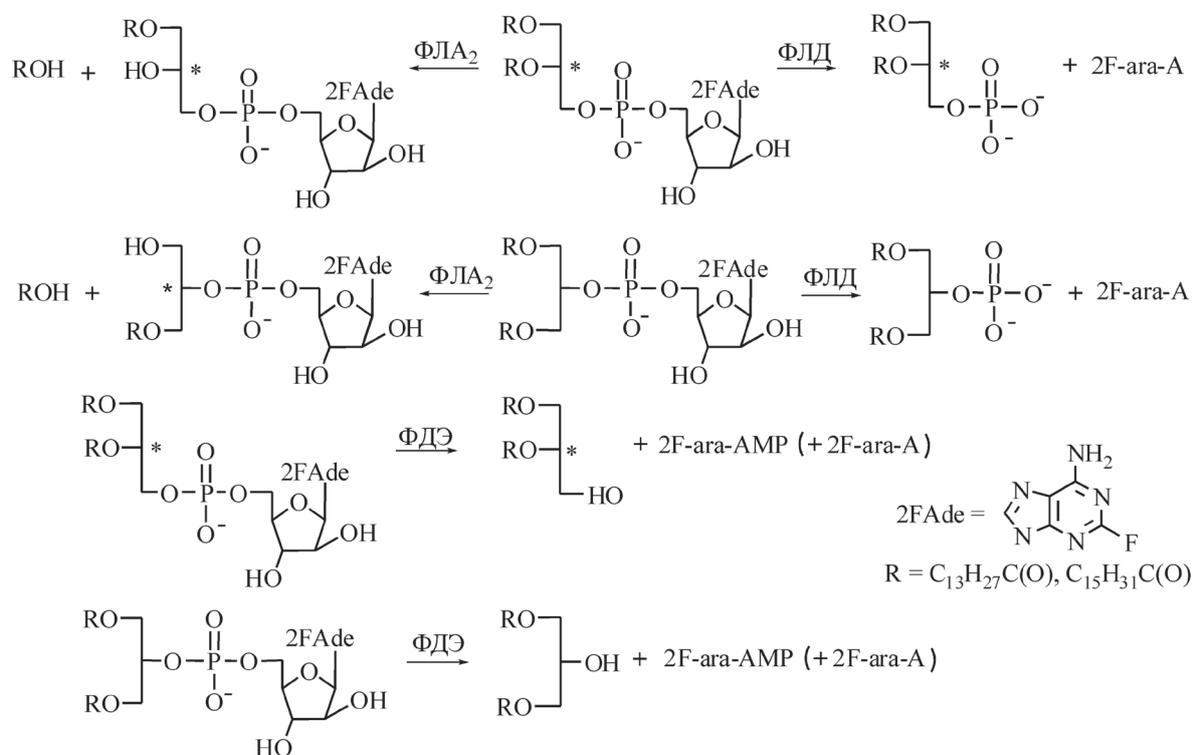
Соединение	Фармакокинетические параметры*,**				
	C_{max} (нг/мл)	T_{max} (ч)	AUC_{0-24} (нг·ч/мл)	$T_{1/2}$ (ч)	C_{min} (нг/мл)
Флударабина фосфат (1)	8989 ± 2537	0,9 ± 0,2	17790 ± 1934	1,5 ± 0,4	13 ± 9
Конъюгат 3	1613 ± 247	2,8 ± 1,1	19368 ± 1411	14,2 ± 2,6	199 ± 31

П р и м е ч а н и я. * – C_{max} – максимальная концентрация; T_{max} – время достижения максимальной концентрации; AUC_{0-24} – площадь под кинетической кривой в промежуток времени от 0 до 24 ч; $T_{1/2}$ – время полувыведения; C_{min} – минимальная концентрация (концентрация через 24 ч наблюдения); ** – Значения фармакокинетических параметров представлены в виде $X \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение) пяти независимых экспериментов. Результаты экспериментов проанализированы с использованием t -теста Стьюдента ($P < 0,05$).

ступность флударабина из конъюгата 3 у мышей близка к его оральной биодоступности из эквивалентного количества фосфата 1; площади под кинетической кривой (AUC_{0-24}) флударабина, выделившегося из соединений 1 и 3, составляли 17790 ± 1934 и 19368 ± 1411 нг·ч/мл соответственно. Разница между средними значениями T_{max} , C_{max} и $T_{1/2}$ флударабина, выделившегося из F-ara-AMP (1) и конъюгата 3, была статистически значимой ($P < 0,05$), в отличие от разницы между средними значениями AUC_{0-24} ($P = 0,25$).

Описанные различия в фармакокинетических свойствах изомерных 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных флударабина 3–6 могут быть обусловлены разным метаболизмом данных соединений. В связи с этим нам представлялось интересным изучить способность производных флударабина 3–6 гидролизоваться в модельных условиях различными ферментами семейства фосфолипаз и фосфодиэстераз.

Данные, полученные в экспериментах по энзиматическому гидролизу фосфолипидных производных флударабина панкреатической ФЛА₂, фосфолипазой Д (ФЛД) из *Streptomyces* sp., фосфолипазой С (ФЛС) из *Clostridium perfringens* (*C. Welchii*) и фосфодиэстеразой (ФДЭ) из *Crotalus durissus*, приведены на рисунке и в табл. 2.



Схемы гидролиза конъюгатов флударабина 3–6 панкреатической ФЛА₂, ФЛД из *Streptomyces* sp. и ФДЭ из *Crotalus durissus*

Т а б л и ц а 2. Параметры энзиматического гидролиза конъюгатов 3–6

Соединение	Определяемые параметры				
	ФЛА ₂ *		ФЛД*	ФДЭ**	
	$\tau_{1/2}$ (мин)	V_0 (мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹)	Степень гидролиза, α_{24h} (%)	Степень гидролиза, α_{48h} (%)	Степень гидролиза, α_{168h} (%)
3	8,8 ± 1,8	5,9 ± 1,7	50,9 ± 7,9	2,1 ± 0,7	4,5 ± 0,9
4	14,7 ± 2,5	3,1 ± 1,4	36,4 ± 13,1	1,4 ± 0,2	3,1 ± 0,6
5	153,0 ± 14,1	0,42 ± 0,07	3,3 ± 0,7	3,4 ± 0,5	18,1 ± 4,5
6	242,0 ± 21,9	0,38 ± 0,09	7,3 ± 1,4	2,2 ± 0,6	9,9 ± 2,4

Примечания. * – Данные представлены в виде $X \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) трех независимых экспериментов. ** – Данные представлены в виде $X \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) двух независимых экспериментов.

В масс-спектрах реакционных смесей энзиматического гидролиза конъюгатов 3–6 ФЛА₂ обнаруживались пики молекулярных ионов ($[M-Na+2H]^+$) с m/z 650 и 678, соответствующие молекулярной массе лизофосфолипидных производных, образующихся в результате деацилирования соединений 3–6. Процент гидролиза конъюгатов 3–6 в определенные промежутки времени определяли по содержанию образовавшихся лизоглицерофосфолипидных производных. После добавления ФЛА₂ к раствору субстрата происходил быстрый гидролиз 1,2-диацильных производных 3 и 4, в противоположность 1,3-изомерам 5 и 6. В условиях эксперимента начальная скорость гидролиза (V_0) конъюгатов 3 и 4 составила $5,9 \pm 1,7$ и $3,1 \pm 1,4$ мкмоль \cdot мин⁻¹ \cdot мг⁻¹ соответственно, тогда как в случае изомерных 1,3-производных 5 и 6 значения V_0 равнялись $0,42 \pm 0,07$ и $0,38 \pm 0,09$ мкмоль \cdot мин⁻¹ \cdot мг⁻¹. Замедление гидролитического расщепления 1,3-диацилпроизводных в сравнении с 1,2-изомерами отражалось и во временах половинного гидролиза $\tau_{1/2}$ ($8,8 \pm 1,8$ и $14,7 \pm 2,5$ мин для соединений 3 и 4, $153,0 \pm 14,1$ и $242,0 \pm 21,9$ мин для конъюгатов 5 и 6 соответственно). Эти зависимости коррелируют с данными, полученными ранее для соответствующих фосфолипидных конъюгатов рибавирина [11].

Инкубирование конъюгатов 3–6 с ФЛД из *Streptomyces* sp. [10; 14] приводило к выделению флударабина (для всех конъюгатов пик молекулярного иона $[M+H]^+$ локализовался при m/z 286). Как и в случае ФЛА₂, гидролиз 1,2-изомеров 3 и 4 ФЛД происходил быстрее в сравнении с 1,3-диацильными производными 5 и 6: из 1,2-изомеров 3 и 4 после 24 ч гидролиза выделялось примерно 51 и 36 % флударабина, тогда как в случае 1,3-производных 5 и 6 это значение составляло только 3,3 и 7,3 % соответственно.

Эксперименты по гидролизу конъюгатов флударабина 3–6 ФЛС из *Clostridium perfringens* проводили в различных системах (водных и двухфазных) [11; 15], однако ни в одном из случаев указанные соединения не гидролизировались ФЛС.

Из данных табл. 2 видно, что фосфодиэфирная связь, соединяющая флударабина фосфат и липидную компоненту конъюгатов 3–6, расщепляется под действием ФДЭ *Crotalus durissus* очень медленно. После 48 и 168 ч инкубации с ферментом наибольшая степень гидролиза, наблюдаемая в случае соединения 5, не превышала 3,4 и 18,1 % соответственно. Следует отметить, что в этой серии экспериментов был использован большой избыток ФДЭ по сравнению с количеством фермента, которое обычно применяют, например, для гидролиза олигонуклеотидов. Тем не менее, медленный гидролиз конъюгатов флударабина 3–6 обусловлен действием фермента, а не химической деструкцией, так как в контрольных растворах исследуемых соединений (без ФДЭ) продукты расщепления фосфодиэфирной связи не детектировались. Интересно отметить, что гидролиз 1,3-изомеров 5 и 6 происходил несколько быстрее, чем в случае их 1,2-аналогов 3 и 4.

Заключение. Полученные результаты позволяют заключить, что внутрижелудочное введение 1,2- и 1,3-диацилглицерофосфатных производных флударабина 3–6 крысам Вистар и аутбредным мышам ICR приводит к пролонгированному выделению и более длительной циркуляции флударабина (2) в системном кровотоке животных, чем наблюдается в случае введения эквивалентных количеств флударабина фосфата (1). Диацилглицерофосфатные производные 3–6 могут рассматриваться в качестве пероральных пролекарств флударабина. Показано, что ораль-

ная биодоступность F-ара-А (2) из его 1,2-димиристоилглицерофосфатного производного 3 у животных близка к его оральной биодоступности из эквивалентного количества F-ара-АМР (1). На основании данных, полученных в экспериментах *in vitro*, можно предположить, что флударабин может выделяться из полученных пролекарств под действием ферментов, принадлежащих к семействам фосфолипаз А и Д, а также фосфодиэстераз.

Работа выполнена в рамках задания № 4.20 программы «Химфармсинтез». Авторы глубоко признательны д-ру мед. наук профессору Б. Б. Кузьмицкому за чрезвычайно полезное обсуждение результатов работы.

Список использованной литературы

1. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases / L. P. Jordheim [et al.] // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2013. – Vol. 12, N 6. – P. 447–464.
2. *Chun, H. G.* Fludarabine phosphate: a synthetic purine antimetabolite with significant activity against lymphoid malignancies / H. G. Chun, B. Leyland-Jones, B. D. Cheson // *J. Clin. Oncol.* – 1991. – Vol. 9, N 1. – P. 175–188.
3. *Shea, R. G.* Synthesis, hybridization properties and antiviral activity of lipid-oligodeoxynucleotide conjugates / R. G. Shea, J. C. Marsters, N. Bischofberger // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol. 18, N 13. – P. 3777–3783.
4. Nucleoside conjugates. 15. Synthesis and biological activity of anti-HIV nucleoside conjugates of ether and thioether phospholipids / C. I. Hong [et al.] // *J. Med. Chem.* – 1996. – Vol. 39, N 9. – P. 1771–1777.
5. Cellular metabolism in lymphocytes of a novel thioether-phospholipid-AZT conjugate with anti-HIV-1 activity / G. L. Kucera [et al.] // *Antiviral Res.* – 2001. – Vol. 50, N 2. – P. 129–137.
6. *Hostetler, K. Y.* Phosphatidylazidothymidine. Mechanism of antiretroviral action in CEM cells / K. Y. Hostetler, D. A. Carson, D. D. Richman // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, N 18. – P. 11714–11717.
7. Lipid conjugates of antiretroviral agents. I. Azidothymidine-monophosphate-diglyceride: anti-HIV activity, physical properties, and interaction with plasma proteins / J. M. Steim [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – Vol. 171, N 1. – P. 451–457.
8. Synthesis and antiproliferative potency of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine phospholipid adducts / H. Brachwitz [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 7, N 6. – P. 1195–1200.
9. Phospholipid derivatives of cladribine and fludarabine: synthesis and biological properties / I. Tsybul'skaya [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 23, N 13. – P. 3287–3296.
10. Discrimination between the regioisomeric 1,2- and 1,3-diacylglycerophosphocholines by phospholipases / J. Mansfeld [et al.] // *Chem. Phys. Lipids.* – 2011. – Vol. 164, N 3. – P. 196–204.
11. Synthesis of Phospholipid-Ribavirin Conjugates / I. A. Oleynikova [et al.] // *Helv. Chim. Acta.* – 2013. – Vol. 96, N 3. – P. 463–472.
12. *de l'Europe, C.* European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: [Strasbourg, 18.III.1986]. 1986: Conseil de l'Europe Section des publications.
13. *Lee-Ham, D. Y.* Pharmacology review: oral fludarabine phosphate / D. Y. Lee-Ham // Center for drug evaluation and research 2008. Application number 22–273.
14. *Yang, S. F.* Transphosphatidylolation by phospholipase D / S. F. Yang, S. Freer, A. A. Benson // *J. Biol. Chem.* – 1967. – Vol. 242, N 3. – P. 477–484.
15. *Haftendorn, R.* Activity of phospholipase C in two-phase systems / R. Haftendorn, R. Ulbrich-Hofmann // *Anal. Biochem.* – 2002. – Vol. 306, N 1. – P. 144–147.

Поступило в редакцию 21.10.2015