

УДК 547.95:579.66

А. И. ВАСИЛЬКЕВИЧ<sup>1</sup>, М. А. КИСЕЛЬ<sup>1</sup>, Л. А. ЕРОШЕВСКАЯ<sup>2</sup>, А. Н. РЫМКО,<sup>2</sup>  
член-корреспондент А. И. ЗИНЧЕНКО<sup>2</sup>

## СИНТЕЗ ФОСФАТИДИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО КИНЕТИНРИБОЗИДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОСФОЛИПАЗЫ D *STREPTOMYCES NETROPSIS*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 11.12.2013

**Введение.** Известно, что противовирусные и противоопухолевые препараты на основе модифицированных нуклеозидов имеют ряд недостатков. Прежде всего, в некоторых клетках-мишенях отсутствуют нуклеозидкиназы, способные эффективно осуществлять начальный этап метаболической активации таких нуклеозидов [1]. Более того, многие нуклеозиды плохо проникают в клетки и поэтому большая часть их выводится из организма в неизменном виде. Отсюда, поиск препаратов, способных с большей эффективностью проходить сквозь клеточную мембрану, является актуальной задачей [2].

Из теоретических соображений, 5'-монофосфатные производные модифицированных нуклеозидов являются более перспективными фармакологическими субстанциями, чем исходные нуклеозиды. Этот вывод основан на том, что у нуклеозидмонофосфатов короче цепь метаболической активации и они активны даже в клетках, в которых отсутствуют нуклеозидкиназы. Однако нуклеозидмонофосфаты, являясь заряженными молекулами, плохо проникают через гидрофобную клеточную мембрану.

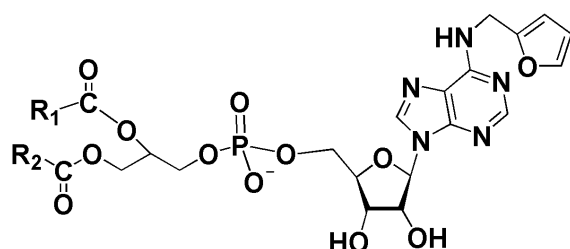
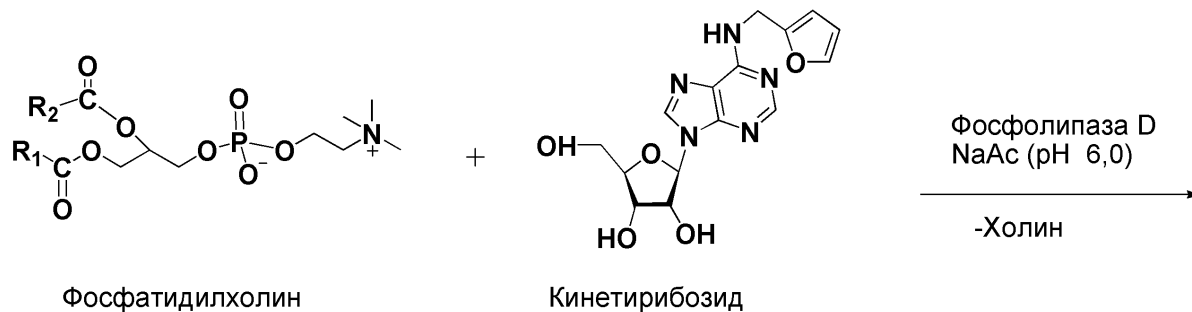
Одним из простых и эффективных подходов к решению проблемы транспорта лекарственных нуклеозидов через гидрофобные липидные биологические мембраны в клетку является химическая модификация нуклеозидов остатками жирных кислот или фосфолипидами [1; 3–8]. Такие конъюгаты содержат фосфатидильный остаток в качестве нетоксичной транспортной группы, которая защищает нуклеозид от инактивации ферментами и, обладая высокой аффинностью к клеточным мембранам, облегчает проникновение лекарства в пораженные клетки. В клетках происходит постепенное освобождение нуклеозида, причем в ряде случаев уже в 5'-монофосфорилированной форме, что укорачивает цепь трансформации нуклеозида в действующее соединение – нуклеозид-5'-трифосфат. Как упоминалось выше, последнее обстоятельство имеет решающее значение для тех систем, где отсутствуют соответствующие нуклеозидкиназы.

Одним из модифицированных нуклеозидов, который сравнительно недавно предложено использовать в качестве высокоэффективного противоопухолевого средства, является рибозид фитогормона кинетина.

Кинетинрибозид проявляет цитотоксическую активность в культуре клеток мышей, человека и опухолей растений [9]. Его антипролиферативные и апоптозные эффекты на опухолевых клетках человека также надежно документированы [10]. Цитотоксические эффекты кинетинрибозид обусловлены его способностью вызывать быстрое истощение АТФ, приводя к генотоксическому стрессу, который активирует ген *CDKN1A* и другие ответственные за стресс гены [11]. Недавно было показано, что кинетинрибозид проявляет терапевтическую эффективность в отношении острого миелобластного лейкоза [12] и антипролиферативную активность на клетках рака прямой кишки [13]. Таким образом, кинетинрибозид играет важную роль при индукции клеточной гибели у клеток различных типов опухолей и может рассматриваться в качестве перспективного кандидата на статус противоопухолевого средства. Ранее [5; 6] нами для получения

фосфолипидных аналогов нуклеозидов был применен вместо трудоемкого химического синтеза [7; 8] ферментативный способ, который заключается в переносе фосфатидильного остатка с фосфатидилхолина на первичную гидроксильную группу рибозы под действием микробной фосфолипазы D (КФ 3.1.4.4).

Цель исследования – синтез фосфатидил-N<sup>6</sup>-фурфуриладенозина (ФФА) из кинетинрибозид и фосфатидилхолина с помощью микробной фосфолипазы D.



Фосфатидил-N<sup>6</sup>-фурфуриладенозин

**Материалы и методы исследования.** В качестве фосфолипидного субстрата использовали фосфатидилхолин, выделенный из препарата соевого лецитина Epicuron-200 фирмы Lucas Meyer (Германия) с помощью флэш-хроматографии на силикагеле. Процедура получения препарата фосфолипазы D *Streptomyces netropsis* описана нами в [5]. Используемый в работе кинетинрибозид синтезировали методом ферментативного трансгликозилирования, как было описано ранее [14].

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Silufol-UV<sub>254</sub> (Serva, Германия) в системах растворителей хлороформ–метанол–14 н. NH<sub>4</sub>OH (14 : 4 : 0,15, система 1) и хлороформ–метанол–7 н. NH<sub>4</sub>OH (13 : 5 : 1, система 2). Обнаружение веществ на хроматограммах определяли по флуоресценции пятен при УФ-освещении и с помощью специфического реагента на фосфолипиды [15], а также проявлением 10 %-ным раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метаноле с последующим нагреванием пластинки до 200 °С. Содержание фосфора в образцах определяли по методу, предложенному в [15].

Спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрофотометре UV-1202 фирмы Shimadzu (Япония). Спектры ПМР регистрировали на приборе Avance 500 (Bruker, Германия). Химические сдвиги приведены относительно тетраметилсилана как внутреннего стандарта.

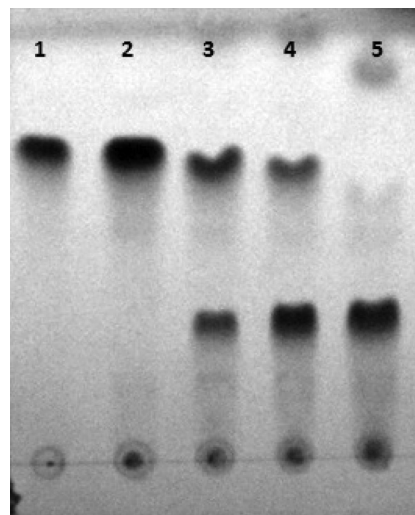
**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе работы был проведен анализ состава и структуры продуктов, образующихся в ходе изучаемого ферментативного процесса. На рисунке представлена хроматограмма реакционной смеси, из которой видно, что ферментативный процесс сопровождается накоплением нового продукта. Его фосфолипидная природа подтверждается окрашиванием пятна при обработке хроматограммы специфическим реагентом на фосфолипи-

ды [15]. В спектре поглощения продукта после его выделения с помощью флэш-хроматографии наблюдается полоса поглощения при 268 нм (этанол), характерная для гетероциклического основания (кинетинрибозида). Соотношение содержания фосфора и хромофора в образующемся фосфолипиде составляет 1 : 1.

Проведенные эксперименты по определению условий реакции трансфосфатидилирования позволили предложить следующую методику синтеза ФФА. Реакционную смесь (14,4 мл), содержащую 50 мг (3,6 ммоль) кинетинрибозида, 9,65 мл хлороформа, 1,152 мл 2,5 М Na-ацетатного буфера (рН 6,0), 350 мг фосфатидилхолина, 0,72 мл 2 М CaCl<sub>2</sub> и 2,8 мл фильтрата культуральной жидкости, содержащего фосфолипазу D, перемешивали при 37 °С в течение 18 ч. Выход реакции синтеза ФФА составил >95 мол. %. Целевой продукт из конечной реакционной смеси выделяли, используя методику, описанную в [5], с последующей очисткой с помощью флэш-хроматографии.

Структура целевого продукта доказана на основании анализа данных ТСХ (рисунок), УФ-спектроскопии ( $\lambda = 268$  нм) и спектров <sup>1</sup>H ЯМР в дейтерохлороформе в присутствии тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. На хроматограмме наблюдается только один фосфолипидный продукт, что указывает на фосфатидилирование кинетинрибозида по первичной гидроксильной группе. Дополнительным доказательством этого факта является спектр <sup>1</sup>H ЯМР, в котором наблюдается сдвиг сигнала протонов H5' в слабое поле на 0,3 м. д. по сравнению со спектром кинетинрибозида. В спектре ЯМР также присутствуют сигналы, характерные для фосфатидильной группы (протоны метильных групп жирных кислот, протоны глицеринового остатка) и групп, соответствующих протонам кинетинрибозида, в соотношении, эквивалентном их наличию в разных группах молекулы. Ниже приводятся данные спектра. <sup>1</sup>H ЯМР ( $\delta$ , м. д., J, Гц): 0,85 с (6H, 2(CH<sub>3</sub>)), 1,23с (42H, 21(CH<sub>2</sub>)), 1,47с (4H, 2( $\beta$ -CH<sub>2</sub>)), 1,99с (4H, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>), 2,20с (4H, 2( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>)), 2,51с (2H, CH<sub>2</sub>-sn1), 3,81с (2H, H5'), 3,9с (2H, CH<sub>2</sub>-sn3), 4,06с (2H, H4'), 4,22д (1H, 1H, H3', J = 4,2 Гц), 4,3 (1H, H2'), 4,61д (1H, OH3', J = 5,1 Гц), 4,7с (1H, OH2'), 5,08с (1H, CH-sn2), 5,29м (4H, (-CH=CH-) и -CH<sub>2</sub>-NH), 5,95д (1H, H1', J = 5,8 Гц), 6,22д (1H, -CH=, J = 3,2 Гц), 6,32м (1H, -CH=), 7,49м (1H, =CH-O), 8,16с (1H, NH), 8,23с (1H, H-8), 8,41с (1H, H-2).

**Заключение.** Таким образом, в настоящей работе экспериментально обоснована возможность использования препарата фосфолипазы D *S. netropsis* для препаративного синтеза ранее неизвестного конъюгата фосфолипида с фармакологически перспективным нуклеозидом – кинетинрибозидом. Имеются основания полагать, что такая депонированная форма кинетинрибозида будет способствовать его стабильности в русле крови и повышению адресности доставки в клетки-мишени.



Тонкослойная хроматограмма кинетинрибозида (1) и реакционной смеси до (2) и после синтеза ФФА в течение 0,5 (3), 8 (4) и 17 (5) ч. Пятна кинетинрибозида и ФФА визуализированы при освещении УФ-светом

## Литература

- Alexander R. L., Kucera G. L. // Curr. Pharm. Des. 2005. Vol. 11, N 9. P. 1079–1089.
- Galmarini C. M., Popowycz F., Joseph B. // Curr. Med. Chem. 2008. Vol. 15, N 11. P. 1072–1082.
- Малекин С. И., Кругляк Ю. Л., Хромова Н. Ю. и др. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23, № 8. С. 648–654.
- Шастина Н. С., Мальцева Т. Ю., Дьякова Л. Н. и др. // Биоорганическая химия. 2013. Т. 39, № 2. С. 184–193.
- Birichevskaya L. L., Eroshevskaya L. A., Kisel M. A., Zinchenko A. I. // Chem. Nat. Compd. 2006. Vol. 42, N 1. P. 32–35.
- Birichevskaya L. L., Kvach S. V., Sivets G. G. et al. // Biotechnol. Lett. 2007. Vol. 29, N 4. P. 585–591.
- Shuto S., Itoh H., Sakai A. et al. // Bioorg. Med. Chem. 1995. Vol. 3, N 3. P. 235–243.
- Damjanovic J., Iwasaki Y. // J. Biosci. Bioeng. 2013. Vol. 116, N 3. P. 271–280.
- Griffaut B., Bos R., Maurizis J. C. et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2004. Vol. 34. P. 271–275.
- Cheong J., Goh D., Yong J. W. H. et al. // Mol. Biosyst. 2009. Vol. 5. P. 91–98.
- Cabello C. M., Bair W. B., Ley S. et al. // Biochem. Pharmacol. 2009. Vol. 77. P. 1125–1138.

12. McDermott S. P., Eppert K., Notta F. et al. // *Blood*. 2012. Vol. 119, N 5. P. 1200–1207.
13. Rajabi M., Gorincioi E., Santaniello E. // *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*. 2012. Vol. 31, N 6. P. 474–481.
14. Береснев А. И., Ерошевская Л. А., Квач С. В., Зинченко А. И. // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук*. 2013. № 3. С. 73–77.
15. Vaskovsky V. E. Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. // *J. Chromatogr.* 1975. Vol. 114, N 1. P. 129–141.

A. I. VASILKEVICH, M. A. KISEL, L. A. EROSHEVSKAYA, A. N. RYMKO, A. I. ZINCHENKO

vasilkevich@iboch.bas-net.by; kisel@iboch.bas-net.by; ljarosha@yandex.ru; ingecate@mail.ru; zinch@iboch.bas-net.by

**SYNTHESIS OF KINETIN RIBOSIDE PHOSPHATIDYL DERIVATIVE  
USING *STREPTOMYCES NETROPSIS* PHOSPHOLIPASE D**

**Summary**

Herein, the environmentally friendly synthesis of the earlier unknown phospholipid analog of kinetin riboside was carried out using phospholipase D of *Streptomyces netropsis*. Kinetin riboside and soybean lecithin served as substrates. A maximum degree of nucleoside conversion to 5'-phosphatidyl derivative of kinetin riboside at 37°C to 6 h exceeds 95%. The structure of target product was confirmed by UV and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.