

## ПОЛУЧЕНИЕ ФОСФАТИДИЛАЦИКЛОВИРА С ПОМОЩЬЮ МИКРОБНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ D

**Биричевская Л.Л.<sup>1</sup>, Винтер М.А.<sup>1</sup>, Герловский Д.О.<sup>2</sup> Литвинко Н.М.<sup>2</sup>,  
Михайлопуло И.А.<sup>2</sup>, Зинченко А.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск,  
l.birichevskaya@mbio.bas-net.by*

<sup>2</sup>*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск*

Препараты на основе модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов играют значительную роль в химиотерапии онкологических и вирусных заболеваний [2, 5].

Ацикловир (9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин) – ациклический аналог гуанозина – является эффективным агентом, обладающим активностью против вирусов группы герпеса (ВПГ, вируса ветряной оспы, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр). Кроме высокой противовирусной активности, особенность ацикловира заключается в его избирательном ингибировании синтеза вирусной ДНК (по сравнению с клеточными), что объясняет отсутствие цитотоксичности для клеток млекопитающих.

Ацикловир доступен в различных формах, таких как таблетки, суспензии, внутривенные инъекции и глазные мази. Серьезной проблемой остается низкая биодоступность препарата (10–30%), связанная с плохой растворимостью, и быстрый метаболизм в организме (период полувыведения составляет 2,5–3 ч.). Как следствие, для достижения желаемых терапевтических эффектов необходимо использование высоких доз ацикловира, что может сопровождаться нежелательными побочными явлениями.

Для преодоления указанных проблем, активно ведется поиск новых, усовершенствованных форм препарата и разработка способов его адресной доставки в клетки-мишени, в том числе в составе липосом и липидсодержащих наночастиц [4, 6, 8, 10] для перорального введения, как наиболее удобных для пациентов и медицинского персонала.

Одним из таких подходов является разработка так называемых «prodrugs» [13] – лекарственных препаратов нового поколения на основе конъюгатов фармацевтически значимых нуклеозидов с липидами, в т.ч. фосфолипидами. Такие конъюгаты характеризуются большей биодоступностью, улучшенными фармакокинетическими параметрами, меньшей токсичностью и могут служить депо-формами лекарственных субстанций [2, 11, 12]. Так, Цибульской и соавт. показано, что внутрибрюшинное и пероральное введение диацилглицерофосфатов клофарабина и флударабина приводит к пролонгированному высвобождению нуклеозидов и длительной их циркуляции в системном кровотоке животных [16]. Группой под руководством Хостетлера получен ряд фосфатидильных производных противовирусных нуклеозидов, в том числе ацикловира, и показана их высокая ингибирующая активность в

отношении вирусов гепатита В, ВИЧ и герпеса, а также значительное увеличение концентрации действующего вещества в печени, лимфоидной ткани и макрофагах [7, 9]. Тем не менее, механизмы всасывания в ЖКТ и возможность перорального применения таких препаратов недостаточно ясны и требуют детального изучения.

Существующие методы химического конъюгирования фосфолипидов с нуклеозидами сложны и характеризуются невысокими выходами целевых продуктов [16]. Ранее нами была показана возможность использования более простого и эффективного биотехнологического метода, предложенного японскими учеными [15], для синтеза фосфолипидных производных ряда нуклеозидов [1, 3].

**Целью работы** явилось получение 5'-фосфатидильного производного ацикловира при помощи реакции трансфосфатидилирования, катализируемой фосфолипазой D (ФЛД) *Streptomyces netropsis*.

**Методы исследования.** Источником ацикловира служил препарат «Ацикловир-Белмед» в виде таблеток с содержанием действующего вещества 400 мг (производства РУП «Белмедпрепараты»). В качестве источника фосфатидилхолина использовали высокоочищенный соевый лецитин Lipoid S100 («Lipoid», Германия). Биокатализатором в реакции трансфосфатидилирования служила ФЛД штамма *S. netropsis* БИМ В-428Д. Культивирование штамма-продуцента и получение сухого ферментного препарата осуществляли, как описано нами в работе [3].

**Аналитический синтез** 5'-фосфатидильного производного ацикловира осуществляли при 37°C в реакционной смеси (1 мл), включающей 0,33 мл буферной фазы и 0,67 мл хлороформной фазы, и содержащей 0,2 М натрий-ацетатный буфер (рН 6,0), 0,1 М CaCl<sub>2</sub>, 0,15 мг сухого препарата ФЛД, а также 10 мкмоль нуклеозида и 30 мкмоль фосфатидилхолина.

Ход реакции контролировали при помощи ТСХ на пластинах Silica gel 60 F<sub>254</sub> («Merck», Германия) в системах растворителей хлороформ/метанол/вода (10:7:0,5 по объему) и хлороформ/метанол/25% водный аммиак (8,5:3,5:0,4 по объему).

**Препаративный синтез** 5'-фосфатидильного производного ацикловира проводили в двухфазной реакционной смеси объемом 10 мл, состоящей из 4 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера (рН 6,0) и 6 мл хлороформа. Реакционная смесь содержала 56 мг аптечного препарата ацикловира (22,4 мг в пересчете на нуклеозид), 240 мг фосфатидилхолина, 0,15 М CaCl<sub>2</sub> и 2,4 мг препарата ФЛД). По окончании реакции (2 ч) хлороформный слой отделяли и упаривали с использованием роторного испарителя при 40 °С.

Очистку целевого продукта осуществляли на колонке с силикагелем L60 («Merck», Германия), элюируя фосфолипиды изократической системой растворителей хлороформ/метанол/вода (10:7:0,5 по объему). Хроматографические пики обнаруживали с помощью УФ-детектора (контроль

поглощения при длине волны 206 нм и 254 нм). Фракции, содержащие хроматографически чистое (по ТСХ) целевое соединение, объединяли и упаривали.

**Результаты и обсуждение.** Химические методы многостадийного синтеза фосфолипидных производных нуклеозидов известны [7, 16]. Нами впервые была изучена возможность получения фосфолипидного производного ацикловира ферментативным методом, предложенным японскими исследователями с использованием микробной ФЛД [15].

Аналитический синтез 5'-фосфатидилацикловира осуществляли в реакционной смеси объемом 1 мл, состоящей из двух несмешивающихся фаз – буферной и хлороформной. Наличие раздела двух фаз обеспечивает значительное увеличение активности ФЛД. Трансфосфатидилирующая активность фермента в препарате при синтезе 5'-фосфатидилацикловира в указанных условиях составила 0,24 мкмоль/мин·мг. Анализ динамики накопления целевого продукта в реакционной смеси показал, что выход его достиг максимума через 5 ч. протекания реакции и составил 76–77 мол.% (в пересчете на введенный нуклеозид). Дальнейшая инкубация приводила к достаточно быстрому снижению количества фосфолипидного конъюгата в реакционной смеси и увеличению концентрации нуклеозида, что указывает, по-видимому, на гидролиз целевого продукта ФЛД с образованием фосфатидной кислоты и исходного нуклеозида.

Для получения образца 5'-фосфатидилацикловира был проведен препаративный синтез липонуклеотида в реакционной смеси объемом 10 мл. При этом выход реакции (по данным ТСХ) за 2,5 ч составил 72 мол.%. После выделения целевого продукта и очистки на колонке с силикагелем получено 62 мг фосфатидилацикловира (выход 70 мол.% в пересчете на введенный в реакцию нуклеозид). Структура вещества подтверждена УФ-спектроскопией.

**Заключение.** В настоящем исследовании впервые осуществлен ферментативный синтез конъюгата известного противовирусного нуклеозида – ацикловира с фосфатидилхолином. Биокатализатором служила ФЛД *S. netropsis*. Получено 62 мг 5'-фосфатидилацикловира с выходом 70 мол.% в расчете на введенный в реакцию нуклеозид. Полученный образец далее будет использован для исследования его субстратных свойств и ингибиторной активности в отношении панкреатической фосфолипазы A<sub>2</sub>, с целью оценки перспектив применения в качестве новой «prodrug»-препаративной формы.

Работа выполнена в рамках задания «Энзиматический синтез липонуклеотидов и установление их резистентности к действию панкреатической фосфолипазы A<sub>2</sub>», утвержденного постановлением Бюро Президиума НАН Беларуси № 116 от 12 марта 2019 г.

## Литература

1. Биричевская Л.Л., Ерошевская Л.А., Кисель М.А., Зинченко А.И. Использование фосфолипазы D нового микробного штамма-продуцента для синтеза фосфолипидных производных модифицированных нуклеозидов // Докл. Нац. акад. наук. Беларуси. 2006. Т. 50, № 4. С. 68–71.
2. Alexander R.L., Kucera G.L. Nucleoside conjugates for the treatment of cancer // Carr. Pharm. Design. 2005. Vol. 11, № 9. P. 1079–1089.
3. Birichevskaya L., Kvach S., Sivets G., Kalinichenko E., Zinchenko A., Mikhailopulo I. A comparison of enzymatic phosphorylation and phosphatidylation of  $\beta$ -L- and  $\beta$ -D-nucleosides // Biotechnol. Lett. 2007. Vol. 29. P. 585–591.
4. Chetoni P., Rossi S., Burgalassi S., Monti D., Mariotti S. Comparison of liposome-encapsulated acyclovir with acyclovir ointment: ocular pharmacokinetics in rabbits // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2004. Vol. 20, № 2. P. 169–177.
5. De Clercq E., Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years // Clin. Microbiol. Rev. 2016. Vol. 29, № 3. P. 695–747.
6. Hassan H., Adam S.K., Othman F., Shamsuddin A.F., Basir R. Antiviral nanodelivery systems: current trends in acyclovir administration // J. Nanomaterials. 2016. Vol. 2016. Article ID 4591634.
7. Hostetler K.Y., Parker S., Sridhar C., Martin M., Li J., Stuhmiller L., Wijk G., Bosch H., Gardner M., Aldern K.A., Richman D.D. Acyclovir diphosphate dimyristoylglycerol: a phospholipid prodrug with activity against acyclovir-resistant herpes simplex virus // PNAS USA. 1993. Vol. 90, P. 11835–11839.
8. Jain S.K., Jain R.K., Chourasia M.K., Jain A.K., Chalasani K.B., Soni V., Jain A. Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2005. Vol. 6, № 1. Article 8.
9. Korba B.A., Xie H., Wright K.N., Hornbuckle W.E., Gerin J.L., Tennant B.C., Hostetler K.Y. Liver-targeted antiviral nucleosides: enhanced antiviral activity of phosphatidyl dideoxyguanosine versus dideoxyguanosine in woodchuck hepatitis virus infection in vivo // Hepatology. 1996. Vol. 23. P. 958–963.
10. Liu H., Pan W.S., Tang R., Luo S.D. Topical delivery of different acyclovir palmitate liposome formulations through rat skin *in vitro* // Pharmazie. 2004. Vol. 59, № 3. P. 203–206.
11. Markovic M., Ben-Shabat S., Keinan S., Aponick A., Zimmermann E.M., Dahan A. Molecular modeling-guided design of phospholipid-based prodrugs // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20. Art. 2210.
12. Markovic M., Dahan A., Keinan S., Kurnikov I., Aponick A., Ben-Shabat S. Phospholipid-based prodrugs for colon-targeted drug delivery: experimental study and *in-silico* simulations // Pharmac. 2019. Vol. 11, № 4. Art. 186.
13. Rautio J., Meanwell N., Di L., Hageman M. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development // Nat. Rev. Drug Disc. 2018. Vol. 17, № 8. P. 559–587.
14. Schwarz J.C., Klang V., Karall S., Mahrhauser D., Resch G.P., Valenta C. Optimisation of multiple W/O/W nanoemulsions for dermal delivery of acyclovir // Int. J. Pharmaceutics. 2012. Vol. 435, № 1. P. 69–75.