

Из хроматограммы видно, что в образце под номером 1 не наблюдается протекания реакции, так как проба была взята до внесения фермента. Но в образцах 2–5 визуализируется продукт реакции, предположительно гипоксантин, так как рибозо-1-фосфат не поглощает ультрафиолетовый свет. Таким образом, можно судить о том, что ксантозинфосфорилаза проявляет каталитические свойства в реакции фосфорилиза инозина.

В результате выполненного исследования был сконструирован штамм *E. coli* pET42a-харА, продуцирующий рекомбинантную ксантозинфосфорилазу. Также была доказана активность данного фермента в отношении инозина. В дальнейшей работе планируется очистить белок и количественно определить его продуцирующую способность.

ЛИТЕРАТУРА

1. NAD⁺ in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications / E. F. Fang [et al.] // Trends in Molecular Medicine. 2017;23:10:899–916.
2. Yoshino J. NAD⁺ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR / Yoshino J, Joseph BA, Imai S // Cell Metabolism. 2018;27:3:513–528.
3. New function for *Escherichia coli* xanthosine phosphorylase (харА): genetic and biochemical evidences on its participation in NAD⁺ salvage from nicotinamide / Dong W [et al.] // BMC Microbiology. 2014;14:29:1471–2180.
4. Hammer-Jespersen K. A second purine nucleoside phosphorylase in *Escherichia coli* K-12. II. Properties of xanthosine phosphorylase and its induction by xanthosine / Hammer-Jespersen K, Buxton RS, Hansen TD // Molecular and General Genetics. 1980;179:2:341–348.
5. Could nested PCR be applicable for the study of microbial diversity / Quan ZX [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009;25:8:1447–1452.

СИНТЕЗ ТРИГИДРОКСИ-ИНОЗИНА SYNTHESIS OF TRIHYDROXY-INOSINE

Е. С. Деусова, М. А. Ханчевский, Е. И. Квасюк
E. S. Deusova, M. A. Khancheuski, E. I. Kvasyuk

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
liza20010226@gmail.com
Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus*

Нуклеозиды, имеющие в своём составе остатки «разорванного» углеводного фрагмента в виде диальдегида или триола обладают необычным строением и называются секо-нуклеозидами. Они обладают широким спектром биологической активности, которая до настоящего времени изучена недостаточно. Это связано с высокой реакционной способностью альдегидных и гидроксильных групп, приводящей к неоднозначности структуры соединений. В работе представлены два подхода к синтезу тригидрокси-инозина из инозина. Показано, что метод окисления диольной группировки нуклеозидов с помощью ионообменной смолы в IO₄⁻-форме имеет преимущества перед традиционным методом, использующим NaIO₄.

Nucleoside derivatives with broken sugar moiety like dialdehydes or trioles have unusual structures and are called seco-nucleosides. They have different types of biological activity which till this time have not been studied enough. It is a result of the high reactivity of aldehydes and hydroxyl groups and the unusual structure of compounds. This article presents two approaches for the synthesis of trihydroxy-inosine from inosine. It was shown that the method for oxidation of diol groups of ribonucleosides using the ion exchange resin in IO₄⁻-former has preferences to the method which used NaIO₄ as a reagent.

Ключевые слова: инозин, инозин-диальдегид, тригидрокси-инозин, синтез, биологическая активность.

Keywords: inosine, inosine-dialdehyde, trihydroxy-inosine, synthesis, biological activity.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-41-44>

Создание новых эффективных лекарственных препаратов является одним из приоритетных направлений в современной фармацевтической индустрии. Разработка инновационного лекарственного препарата всегда начинается с поиска нового биологически активного соединения с последующим подтверждением его эффективности и безопасности.

В терапии онкологических заболеваний значительную роль играют препараты на основе нуклеозидов и их модифицированных аналогов. Нуклеозиды и нуклеотиды, широко распространенные в природе сложные органические вещества, выполняющие в живом организме самостоятельно или в комплексе с другими биомолекулами различные функции. Аналоги азотистых оснований и нуклеозидов реализуют свои цитотоксические эффекты, имитируя собой естественные эндогенные нуклеозиды [1].

Механизм действия может быть связан либо с ингибированием ферментов, либо с подменой эндогенных нуклеозидов в качестве субстратов в ходе синтеза молекул нуклеиновых кислот, что приводит к повреждению ДНК и РНК, нарушению метилирования ДНК и других процессов [2]. Следует подчеркнуть, что для реализации своего фармакодинамического эффекта аналогам нуклеозидов необходимо выполнить множество условий:

- достичь опухолевых клеток в достаточной концентрации (доставка);
- по пути не быть разрушенными (стабильность);
- проникнуть через мембрану внутрь опухолевой клетки (как правило, посредством белков-переносчиков);
- превратиться в свои активные формы (биоактивация);
- прореагировать с молекулярной мишенью (фармакодинамическая активность) [3].

Вплоть до настоящего времени, подавляющее большинство модифицированных нуклеозидов были получены химическими методами. Большое число разработанных с этой целью синтетических подходов можно объединить в три основных направления: (1) синтез, в котором используются производные сахаров или имитаторов сахаров в качестве гликозилирующих агентов, (2) химические превращения природных нуклеозидов и (3) рациональная комбинация обоих указанных выше подходов. Несмотря на весьма впечатляющий прогресс, достигнутый в развитии химических методов, получение многих противовирусных и противоопухолевых лекарств, а также биологически активных соединений, продолжает оставаться серьезной проблемой, что обуславливает высокую стоимость препаратов и, как следствие, ограничивает широкие биологические исследования и терапевтическое применение.

Большинство аналогов нуклеозидов и нуклеотидов, которые используются в настоящее время в качестве противоопухолевых и/или противовирусных лекарственных препаратов, обладают модифицированным углеводным фрагментом или гетероциклическим основанием. К таким соединениям относятся цитарабин, флударабинфосфат, неларабин, клофарабин, лейкладин и др. Анализ структурных особенностей таких соединений, получивших название антиметаболиты, показывает важность наличия в них измененного углеводного фрагмента. Так замена рибозы на арабинозу приводит к возникновению противоопухолевой или противовирусной активности у арабинозо-содержащих нуклеозидов, имеющих природные гетероциклические основания. Наглядными примерами таких соединений являются цитарабин и арабинозид аденина. С другой стороны, изменение в структуре гетероциклического основания приводит к нарушению комплементарного взаимодействия между ними в процессах транскрипции и трансляции, что приводит к подавлению вирусной инфекции. Примером таких соединений являются такие противовирусные соединения, как бромвинилдезоксисуридин, йоддезоксисуридин, и противоопухолевое соединение фтордезоксисуридин. Интерес представляют также препараты нового поколения на основе аналогов нуклеозидов и нуклеотидов с одновременно модифицированными углеводными и гетероциклическими основаниями, к которым относятся неларабин, флударабинфосфат, клофарабин и др. Двойная модификация природных нуклеозидов приводит к соединениям, которые обладают уже не цитостатической, а цитотоксической активностью.

Среди соединений с высокой противовирусной активностью находятся ряд производных пуринового гетероциклического основания – гуанина, которые содержат разрушенные углеводные фрагменты. К таким противовирусным агентам относятся ацикловир **1**, валацикловир **2** и ганцикловир **3** (Рис. 1). Эти производные формально относятся уже не к аналогам нуклеозидов, а к классу алкилированных гетероциклических оснований. Их отличительной особенностью, в отличие от природных нуклеозидов, является повышенная лабильность связи пуринового основания с оставшимся от углевода фрагментом. Недостатком этих соединений является их низкая растворимость в воде.

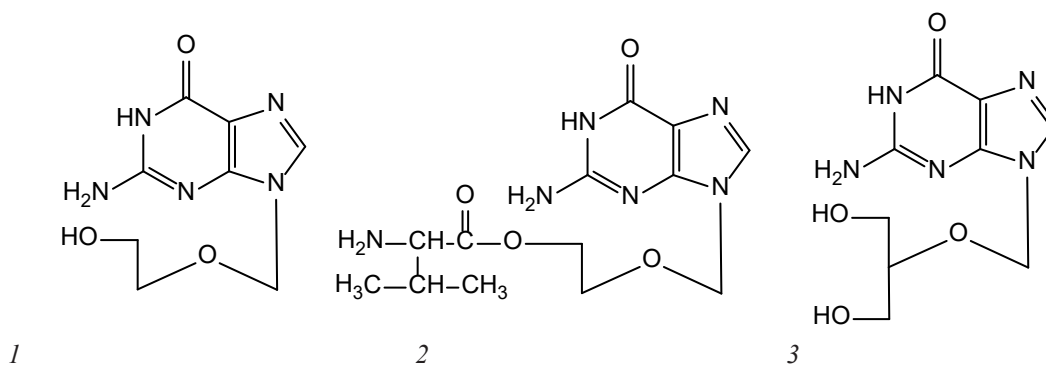


Рис. 1 – Структурные формулы ацикловира **1** валацикловира **2** и ганцикловира **3**

С высокой периодичностью интерес исследователей возвращается к сравнительно давно известным производным нуклеозидов и нуклеотидов, получившим название секо-нуклеозиды и секо-нуклеотиды. Секо-производные представлены двумя типами структур, имеющих вместо рибозы фрагменты её окисления в виде диальдегида или продукта его восстановления – триола. Реакция периодатного окисления 3'-терминальных фрагментов рибонуклеиновых кислот нашла применение при определении первичной структуры РНК, так как эти фрагменты легко отщепляются от цепочки РНК. Присутствие высокоактивных альдегидных групп в молекуле РНК позволяет получать аффинные сорбенты на их основе, или флуоресцентно меченые производные. Однако присутствие диальдегидного фрагмента на основе молекулы нуклеозидов приводит к неоднозначности строения соединений из-за способности альдегидной группы взаимодействовать друг с другом с образованием циклических или полимерных структур. Способность нуклеозид-диальдегидов образовывать такие сложные структуры зависит от природы гетероциклического основания и причина этого в настоящее время достоверно не изучена. Восстановленные продукты – триолы являются устойчивыми соединениями с конкретной и достоверно установленной структурой. Присутствие альдегидных групп в секо-нуклеозидов приводит к способности аналогов взаимодействовать с ферментами обмена нуклеиновых кислот с образованием ковалентных связей, что дезактивирует их, или изменяет их структурную специфичность. Результатом таких взаимодействий является ингибирование процессов, связанных с функционированием этих ферментов, что в конечном результате приводит к проявлению противоопухолевой или противовирусной активностей [4].

Одним из природных нуклеозидов, нашедших применение в медицине, является инозин **4**. Инозин – это нуклеозид, состоящий из гипоксантина, связанного с остатком D-рибофуранозы посредством β -N9-гликозидной связи (Рис. 2). Инозин применяется в настоящее время в качестве стимулятора сердечной деятельности и выпускается под торговым названием «Рибоксин». В последнее время изучение метаболизма инозина при его использовании в иммунотерапии привело к обнаружению ранее не обнаруженных свойств. Инозин является промежуточным соединением в цепи реакций пуриновых нуклеотидов, протекающих при мышечных сокращениях.

Инозин можно рассматривать в качестве предшественника АТФ. Он оказывает анаболическое действие и активизирует метаболизм миокарда. Инозин повышает активность ряда ферментов цикла Кребса, стимулирует синтез нуклеотидов. Применение инозина приводит к торможению процесса деструкции сарколеммы ишемизированных кардиомиоцитов и обеспечивает внутриклеточный транспорт энергии. За счет улучшения микроциркуляции препарат уменьшает размер зоны некроза и ишемии миокарда. Являясь предшественником АТФ, инозин оказывает антигипоксическое и антиаритмическое действие, повышает энергетический баланс миокарда, улучшает коронарное кровообращение, предотвращает последствия интраоперационной ишемии почек и принимает непосредственное участие в обмене глюкозы, способствуя активизации обмена в условиях гипоксии и при отсутствии АТФ. Инозин активирует также метаболизм пировиноградной кислоты, что обеспечивает нормализацию процесса тканевого дыхания. Прием препарата «Рибоксин» приводит к снижению агрегаций тромбоцитов, активации регенерации тканей (особенно миокарда и слизистой оболочки ЖКТ).

Окисление рибонуклеозидов, и инозина **4** в частности, периодатом натрия, йодой кислотой или тетраацетатом свинца приводит к образованию соответствующих нуклеозид-диальдегидов [5]. При кажущейся простоте получения нуклеозид-диальдегидов их выделение в индивидуальном виде представляет определённую проблему из-за высокой реакционной способности альдегидных групп. Восстановление альдегидных групп приводит к соответствующим нуклеозид-триолам (тригидрокси-нуклеозидам), которые являются устойчивыми соединениями. Среди нуклеозид-диальдегидов повышенный интерес исследователей приобрёл инозин-диальдегид **5**, который проявляет противоопухолевую активность [4]. Биологическая активность тригидрокси-нуклеозидов в настоящее время изучена лишь фрагментарно.

В этой связи целью настоящего исследования являлось осуществление синтеза и выделение в индивидуальном состоянии тригидрокси-инозина **6**. Синтез соединения **6** проводили по схеме, представленной на рисунке 2. Контроль за протеканием реакции и содержанием промежуточного инозин-диальдегида **5** и конечного продукта тригидрокси-инозина проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Kieselgel 60 F₂₅₄» фирмы «Merck» (Германия) в системе растворителей хлороформ / метанол (4:1 об/об). Визуализацию соединений на пластинках осуществляли их просмотром в ультрафиолетовом свете, а также с помощью смачивания пластинок ТСХ раствором нафторезорцина в разбавленной серной кислоте с последующим прогреванием их при 80–100°C до появления окрашенных в характерный цвет пятен.

К раствору инозина в воде добавляли порошок NaIO₄ и полученный раствор перемешивали в темноте при комнатной температуре с помощью магнитной мешалки до полного исчезновения исходного инозина в реакционной среде. Избыток NaIO₄ удаляли добавлением к реакционной среде этиленгликоля. Образовавшийся в ходе реакции NaIO₃ высаждали добавлением раствора BaCl₂. Осадок отфильтровывали, раствор упаривали до небольшого объема и к нему добавляли NaBH₄. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, нейтрализовали раствором HCl и оставляли в холодильнике на 18–20 часов. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали этиловым спиртом. Спиртовый раствор упаривали до небольшого объема, охлаждали, выпавший осадок тригидрокси-инозина **6** отфильтровывали и сушили до постоянного веса.

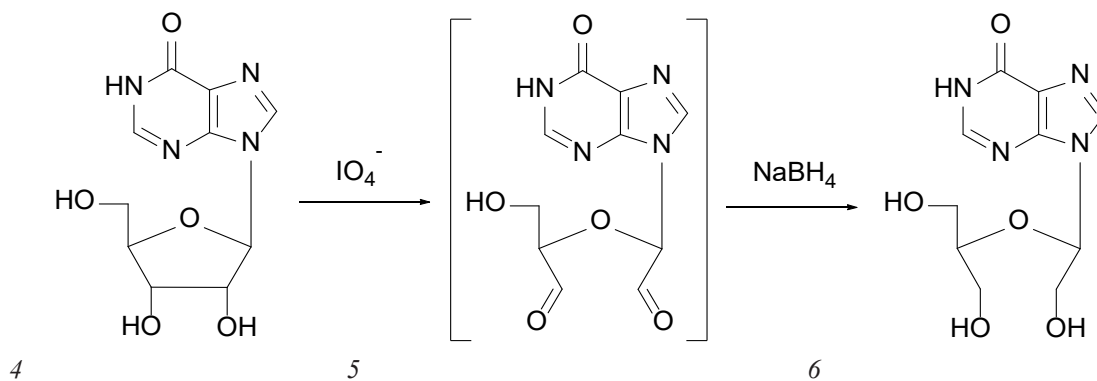


Рис. 2 – Схема синтеза тригидрокси-инозина 6 из инозина 4

В альтернативном методе синтеза тригидрокси-инозина 6 на стадии получения инозин-диальдегида 5 в качестве промежуточного продукта вместо NaIO_4 использовали ионообменную смолу Дауэкс 1×2 (100–200 меш) в IO_4^- -форме.

Пример 1. Получение тригидрокси-инозина 6 с использованием NaIO_4

Инозин 4 (1г, 3,73 ммоль) растворяли в 40 мл воды и к нему добавляли 957 мг (4,47 ммоль) NaIO_4 . Раствор перемешивали в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа (контроль за ходом реакции осуществляли с помощью ТСХ). Избыток периодата натрия убирали добавлением 1 мл этиленгликоля. В процессе периодатного окисления инозина происходит образования инозин-диальдегида 5 с восстановлением периодата натрия до йодата натрия. Йодат натрия высаждали добавлением насыщенного раствора хлорида бария (932 мг, 4,474 ммоль). Осадок йодата бария отфильтровывали. К фильтрату, содержащему инозин-диальдегид 5, при перемешивании добавляли NaBH_4 (400 мг, 10,52 ммоль), реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа, нейтрализовали добавлением раствора HCl , упаривали до небольшого объема и оставляли в холодильнике на 18–20 часов. Выпавший осадок отфильтровывали и промыли спиртом (4×5 мл). Фильтрат упаривали досуха, к остатку добавляли 5 мл этилового спирта и отфильтровывали выпавший кристаллический осадок тригидрокси-инозина 6. Осадок сушили при комнатной температуре на воздухе, затем в вакууме до постоянного веса. Получили 600 мг тригидрокси-инозина 6. Выход продукта составил 59,6%.

Пример 2. Получение тригидрокси-инозина 6 с использованием ионообменной смолы

Дауэкс 1×2 (100–200 меш) в IO_4^- -форме

К раствору инозина 4 (1г, 3,73 ммоль) в 10 мл воды добавляли 10 мл ионообменной смолы Дауэкс 1×2 (100–200 меш) в IO_4^- -форме и перемешивали суспензию при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем смесь переносили в хроматографическую колонку, смолу промывали водой до отсутствия поглощения УФ-света в элюате. Элюат упаривали до небольшого объема, добавляли к нему порошок NaBH_4 (600 мг, 15,78 ммоль), перемешивали смесь в течение 1 часа и нейтрализовали раствором HCl . Нейтральный раствор упаривали до небольшого объема и оставляли в холодильнике на 18–20 часов. Дальнейшую обработку проводили как описано в примере 1. Получили 650 мг (64,5%) тригидрокси-инозина 6.

Сравнение двух методов получения тригидрокси-инозина 6 свидетельствует о том, что метод окисления диольной группировки нуклеозидов с помощью ионообменной смолы Дауэкс 1×2 (100–200 меш) в IO_4^- -форме имеет преимущества перед традиционным методом, использующим NaIO_4 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Herdewijin P. Modified nucleosides in biochemistry, biotechnology and medicine / Herdewijin P // Vancouver Coastal Health. – 2008. – 900 p.
2. Shelton J. Metabolism, biochemical action, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs / J. Shelton [et al.] // Chemical Revue. 2016;116:14379–14455.
3. Peters GJ. Novel Developments in the Use of Antimetabolites, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids / Peters GJ // Nucleosides and Nucleotides. 2014;33:(4–6):358–374.
4. Peter GW. Mechanism of Action of Inosine Dialdehyde (NSC 118994) in the Inhibition of Proliferation of Tumor Cells in Culture / G. W. Peter [et al.] // Cancer Research. 1977;37:2188–2195.
5. Jones BA. A simple method for the preparation of “ribonucleoside dialdehydes” and some comments on their structure / Jones BA, Markham AF, Walker RT // Journal of Chemical Society. Perkin Transactions 1. 1976;14:1567–1570.