ЛИТЕРАТУРА

1. *Tepper, J.* Clinical radiation oncology. 5th Edition / J. Tepper, R. Foote, J. Michalski. – Elsevier, 2020. – P. 2300.

2. *Климанов, В.А.* Радиобиологическое и дозиметрическое планирование лучевой и радионуклидной терапии. Часть 1. Радиобиологические основы лучевой терапии. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование дистанционной лучевой терапии пучками тормозного и гамма-излучения / В.А. Климанов. – Москва: НИЯУ МИФИ, 2011. – 400 с.

3. *Towns P.* Practical issues in treating heavy patients on a LINAC treatment couch / Towns P. // Journal of applied clinical medical physics. – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 45 – 56.

4. *Тарутин, И.Г.* Применение линейных ускорителей электронов в высокотехнологичной лучевой терапии / И.Г. Тарутин, Е.В. Титович. – Минск: Беларуская навука, 2015. – 175 с.

5. *Океанов, А.И.* Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2009 – 2018 гг. / А.И. Океанов, П.И. Моисеева, Л.Ф. Левина, А.А. Евмененко, Т.Б. Ипатий, Суконко О.Г. – Минск: Национальная библиотека Беларуси. – 2019.

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННОГО НУКЛЕОЗИДА 8-БРОМАДЕНОЗИНА И ЕГО ФОСФОЛИПИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО

SYNTHESIS OF THE MODIFIED NUCLEOSIDE 8-BROMADENOSINE AND ITS PHOSPHOLIPID DERIVATIVE

Л. Л. Биричевская[1], М. А. Винтер[1], А. К. Дорошевич[2], М. А. Ханчевский[2], Е. И. Квасюк[2], А. И. Зинченко[1,2]

L. L. Birichevskaya[1], M. A. Vinter[1], A. A. Doroshevich[2], M. A. Khancheuski[2], E.I. Kvasyuk[2], A. I. Zinchenko[1,2]

[1]Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ г. Минск, Республика Беларусь
l.birichevskaya@mbio.bas-net.by

[1]Institute of Microbiology of the NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Модифицированный нуклеозид 8-бромаденозин обладает высокой реакционной способностью и может служить базовым соединением для синтеза большого числа пуриновых антиметаболитов, потенциально обладающих терапевтическими свойствами в отношении ряда опухолевых и вирусных заболеваний. В данной работе 8-бромаденозин получен простым и экологичным способом путем обработки исходного нуклеозида аденозина водным раствором брома. С помощью реакции ферментативного трансфосфатидилирования впервые осуществлен синтез фосфолипидного производного указанного нуклеозида – 5›-(1,2-димиристоилфосфатидил)-8-бромаденозина. Новое соединение предположительно может являться нетоксичным предшественником биологически активной формы лекарственных антиметаболитов.

Modified nucleoside 8-bromoadenosine possessing high reactive capacity may serve as a basic compound for the synthesis of a large number of purine antimetabolites showing potentially therapeutic activities toward several tumor and viral diseases. In this study, 8-bromoadenosine was produced by a simple eco-friendly procedure following the treatment of nucleoside precursor adenosine with aqueous bromine solution. In the course of enzymatic transphosphatidylation reaction, the first synthesis of phospholipid derivative of the above-mentioned nucleoside – 5′-(1,2-dimyristoyl phosphatidyl)-8-bromoadenosine was accomplished. Novel compounds may presumably act as non-toxic progenitors of bioactive antimetabolites to be used in drug formulas.

Ключевые слова: фосфолипаза D, энзиматическое трансфосфатидилирование, 8-бромаденозин, фосфатидилнуклеозид.

Keywords: phospholipase D, enzymatic transphosphatidylation, 8-bromoadenosine, phosphatidyl nucleoside.

https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-20-23

Введение. Интерес к 8-галогенпроизводным пуриновых нуклеозидов и, в частности, к 8-бромаденозину, обусловлен широкими возможностями для их использования в качестве биологически активных антиметаболитов в терапии опухолевых и вирусных заболеваний. Высокая реакционная способность атома брома к реакциям нуклеофильного замещения позволяет использовать 8-бромаденозин в качестве исходного соединения для

синтеза большого числа пуриновых антиметаболитов, содержащих в составе молекулы разнообразные заместители в положении С8 пуринового гетероциклического основания. Таким образом, исходя из 8-бромаденозина, могут быть синтезированы производные аденозина, содержащие в положении С8 разнообразные природные и синтетические аминокислоты, алкильные и арильные радикалы, алифатические и ароматические амины, серу - и селен-содержащие фрагменты, флуоресцентные зонды, радиоактивно меченые соединения, а также пуриновые циклонуклеозиды, содержащие С8–С2′ или С8–С3′ ангидро связи [1]. Полученные соединения, под действием ферментов – нуклеозид и нуклеотидкиназ, превращаются в клетках в соответствующие С8 замещённые нуклеозид-5′-трифосфаты, которые и являются активными антиметаболитами. Модифицированные по положению С8 пуриновые нуклеозид-5′-трифосфаты способны внедряться в растущие цепочки нуклеиновых кислот и ингибировать механизмы транскрипции в опухолевых или поражённых вирусом клетках.

Замещённые в положении С8 пуриновые нуклеозиды представляют интерес также и для получения их 5′-фосфатов, фосфонатов, липофильных производных монофосфатов, которые являются потенциальными соединениями для использования в медицине, молекулярной биологии и биотехнологии.

Что касается соединений, используемых и потенциально пригодных для терапии онкозаболеваний, то большинство из них обладают нежелательными свойствами – невысоким терапевтическим индексом, выраженными токсическими эффектами, быстрым катаболизмом в русле крови до неактивных соединений, что ограничивает их клиническое применение. Одним из подходов в решении этой проблемы является разработка нового поколения лекарственных препаратов («prodrugs») на основе конъюгатов антивирусных и противоопухолевых нуклеозидов с липидами, в том числе фосфолипидами. Такие коньюгаты характеризуются большей биодоступностью, устойчивостью в русле крови, улучшенными фармакокинетическими параметрами и меньшей токсичностью [3].

Существующие методы химического коньюгирования фосфолипидов с нуклеозидами сложны и характеризуются невысокими выходами целевых продуктов. Ранее нами была показана возможность использования более простого и эффективного биотехнологического подхода для синтеза фосфолипидных производных ряда природных и модифицированных нуклеозидов [4], основанного на использовании бактериальной фосфолипазы D.

Фосфолипаза D (ФЛД; ЕС 3.1.4.4) – фермент, который катализирует гидролиз фосфодиэфирной связи фосфолипидов, образуя фосфатидную кислоту и спиртовой остаток. В дополнение к гидролитической активности, ФЛД также может катализировать замещение полярных групп фосфолипидов по процессу, называемому трансфосфатидилированием.

ФЛД широко распространены в природе, однако, наибольшее практическое значение имеют ферменты этого класса, продуцируемые микроорганизмами. Как указано выше, большинство из изученных ФЛД, кроме реакции гидролиза, способно переносить фосфатидильный остаток на первичную или, в особых условиях, на вторичную спиртовую группу большого числа соединений. Благодаря доступности ФЛД из растений и микроорганизмов и достаточно высокой эффективности реакции трансфосфатидилирования, этот подход может быть использован для получения в препаративном количестве разнообразных фосфолипидов, в том числе фосфатидилнуклеозидов.

Материалы и методы. ***В работе 8-бромаденозин (2) получали*** действием раствора брома в воде на раствор аденозина (**1**) в натрий ацетатном буфере. Аденозин (**1**) растворяли при нагревании в 0.25 М натрий ацетатном буфере с pH 4.3 и охлаждали до комнатной температуры. К полученному раствору при интенсивном перемешивании с помощью магнитной мешалки порциями добавляли предварительно полученный раствор брома в воде. Каждая следующая порция раствора брома в воде добавлялась после обесцвечивания предыдущей добавленной порции раствора брома. После добавления последней порции реагента окрашенную в вишнёвый цвет реакционную смесь перемешивали 3–4 часа, в течение которых в ней образовывался осадок. Контроль за полнотой протекания реакции осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии.

При получении образца субстанции 5′-фосфатидильного производного 8-бромаденозина донором фосфатидильных групп служил 1,2-димиристоил-фосфатидилхолин (ДМФХ, «Chem-Impex», США), акцептором – модифицированный нуклеозид 8-бромаденозин (синтезирован в данной работе). Получение сухого ферментного препарата ФЛД осуществляли, как описано нами ранее [5].

Аналитический синтез ДМФ-8-бромаденозина проводили в двухфазной реакционной смеси объемом 1 мл, включающей 0,67 мл хлороформной фазы и 0,33 мл водно-буферной фазы, содержащей 0,2 М натрий-ацетатный буфер (pH 6,0), 0,1 М $CaCl_2$, 0,45 мг биокатализатора (сухого ферментного препарата ФЛД), а также 10 мкмоль нуклеозида и 20 мкмоль ДМФХ.

Препаративный синтез ДМФ-8-бромаденозина проводили в двухфазной реакционной смеси объемом 30 мл, сформированной хлороформом (20 мл) и водной фазой (10 мл), состоящей из 0,2 М натрий-ацетатного буфера (pH 6,0) с 0,1М $CaCl_2$. Реакционная смесь содержала 100 мг (290 мкмоль) нуклеозида, 400 мг (600 мкмоль) ДМФХ и 15 мг сухого препарата ФЛД (6 ед. активности). Реакции осуществляли при температуре 37ºС и постоянном интенсивном перемешивании, их ход контролировали при помощи ТСХ на пластинах Silica gel 60 F_{254} («Merck», Германия) в системе растворителей хлороформ/метанол/вода в соотношении 65:30:5 по объему.

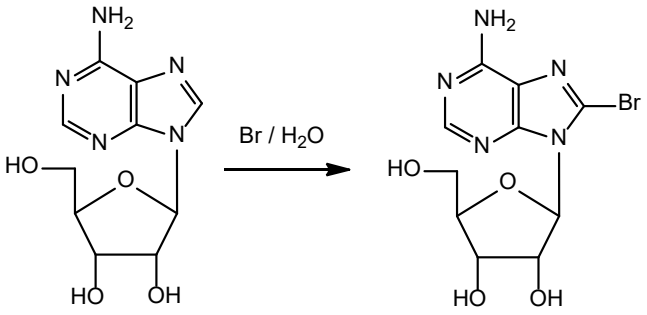
Для обнаружения веществ на хроматограммах использовали флуоресценцию при УФ-облучении, а также специфический реагент на фосфолипиды (реагент Васьковского). Нуклеозид элюировали водой, а фосфолипидное производное – этанолом. После измерения поглощения элюатов при длине волны 264 нм, выход продукта рассчитывали методом пропорции, либо используя известный коэффициент молярной экстинкции нуклеозида. При этом учитывали тот факт, что изучаемые модификации в углеводной части молекулы нуклеозидов практически не

сказываются на величине молярных коэффициентов экстинкции этих соединений. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре PB 2201A («Solare», Беларусь).

Трансфосфатидилирующую активность ФЛД определяли за время, при котором выход продукта не превышал 15–20% и рассчитывали как количество продукта в мкмолях, образовавшегося в результате реакции за 1 мин на 1 мг сухого ферментного препарата.

Результаты и обсуждение. Наиболее распространённым способом синтеза 8-бромаденозина или его производных является обработка исходных соединений, в частности аденозина, реагентами, содержащими активный атом брома. К таким реагентам относятся системы на основе раствора брома в таких растворителях как вода, четырёххлористый углерод, диметилформамид, смесь уксусной кислоты и пиридина, смесь раствора натрия уксуснокислого и диоксана, а также различные буферные растворы на основе солей фосфорной или уксусной кислот. К менее распространённым реагентам относятся N-бромсукцинимид, смесь мета-хлорпербензойной и бромистоводородной кислот, натриевая соль монобромизоциануровой кислоты в воде и другие реагенты [2].

В данной работе 8-бромаденозин (**2**) получали действием раствора брома в воде на раствор аденозина **1** в натрий ацетатном буфере (рис. 1).



1 2

Рис. 1 – Схема синтеза 8-бромаденозина

Синтез 8-бромаденозина (2). Аденозин **1** (1 г, 3.74 ммоль) растворяли при нагревании в 50 мл 0.25 М раствора натрий ацетатного буфера с pH 4.3 и затем охлаждали до комнатной температуры. К полученному раствору при интенсивном перемешивании с помощью магнитной мешалки порциями в течение 20–30 минут добавляли свежеприготовленный раствор брома (0,72 г, 4,50 ммоль, 0,23 мл) в 20 мл воды. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3–4 часа, в течение которых в реакционной смеси выпадал осадок. Реакционную смесь оставляли на ночь в холодильнике, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре охлаждённой до 0–4°C водой (3х3 мл) и перекристаллизовывали из кипящей дистиллированной воды с добавкой раствора натрия бисульфита для получения бесцветного раствора, который охлаждали до комнатной температуры и выдерживали в холодильнике в течение 18–20 часов. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре охлаждённой дистиллированной водой (2х2 мл) и этиловым спиртом (2х3 мл), сушили при комнатной температуре на воздухе, а затем в вакууме до постоянного веса. Получили 0,9 г 8-бромаденозина (**2**). Выход продукта составил 70%. UV (pH 1): $\lambda_{макс}$ = 264 нм.

Аналитический синтез ДМФ-8-бромаденозина осуществляли в реакционной смеси (1 мл) стандартного состава, содержащей 10 мкмоль нуклеозида, 20 мкмоль ДМФХ и 0,45 мг сухого препарата ФЛД. Количество ферментного препарата было увеличено по сравнению с используемым нами количеством для синтеза фосфолипидных производных других нуклеозидов, поскольку в ранее изученной реакции с участием 8-бромаденозина и природного ФХ рассчитанная активность ФЛД оказалась невысокой.

Ход реакции контролировали при помощи ТСХ на пластинах Silica gel 60 F_{254} («Merck», Германия) в системе растворителей хлороформ : метанол : вода (65:30:5 по объему). Хроматографирование пластин проводили 2-3 раза, поскольку из-за крайне плохой растворимости препарата 8-бромаденозина, не сразу удавалось достичь удовлетворительного разделения веществ. Трансфосфатидилирующая активность фермента в препарате при синтезе 5′-фосфатидил-8-бромаденозина в указанных условиях составила 0,148 мкмоль/мин·мг.

Анализ динамики накопления целевого продукта в реакционной смеси (рис. 2) показал, что его выход достиг максимума через 3 ч протекания реакции и составил 52 мол.% (в расчете на введенный нуклеозид).

Препаративный синтез ДМФ-8-бромаденозина проводили в двухфазной реакционной смеси объемом 30 мл, состоящей из 10 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера (pH 6,0) с 0,1М $CaCl_2$ и 20 мл хлороформа. Реакционная смесь содержала 100 мг (290 мкмоль) нуклеозида, 400 мг (600 мкмоль) ДМФХ и 15 мг сухого препарата ФЛД (6 ед. активности). Выход целевого продукта (конверсия) за 3 ч составил 43 мол.%.

По окончании реакции хлороформный слой отделили; экстракцию фосфолипидов из оставшейся на разделе фаз «таблетки» проводили, ресуспендируя ее в смеси хлороформа и метанола с последующим центрифугированием (2 повтора). Все полученные растворы, содержащие фосфолипиды, объединили и упарили. Очистку целевого продукта осуществляли методом препаративной ТСХ на пластинах PLC Silica gel 60 F_{254}, 1 мм («Merck», Германия) в системе растворителей хлороформ : метанол в соотношении 6 : 4 по объему. ДМФ-8-бромаденозин элюировали с пластин смесью хлороформа и метанола в соотношении 1 : 1 по объему.

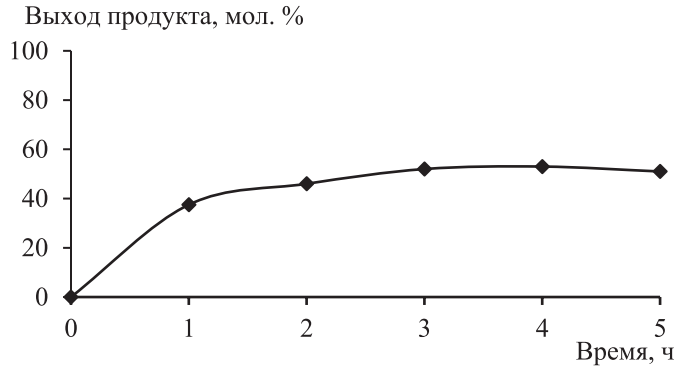


Рис. 2 – Динамика накопления ДМФ-8-бромаденозина в реакции, катализируемой ФЛД S. netropsis

Получено 16 мг (23 мкмоль) субстанции ДМФ-8-бромаденозина с выходом 8 мол.% в расчете на введенный в реакцию нуклеозид. Чистота полученного соединения составила более 95 % по данным ТСХ (рис. 3). Структура вещества подтверждена данными УФ-спектроскопии. УФ-спектр спиртового раствора: $\lambda_{макс}$ – 264 нм, $\lambda_{мин}$ – 247 нм. Полученное соединение также положительно окрашивается реактивом Васьковского.

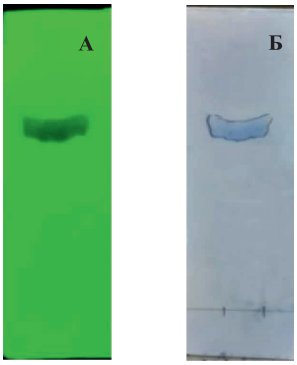


Рис. 3 – Тонкослойная хроматограмма раствора субстанции ДМФ-8-бромаденозина. Визуализация в УФ-свете (А) и с помощью реагента Васьковского (Б)

Низкий выход целевого продукта при получении образца субстанции ДМФ-8-бромаденозина обусловлен относительно невысокой степенью первоначальной конверсии 8-бромаденозина в липонуклеотид, но главным образом – большими потерями вещества на этапах выделения и очистки. Выделение осложнялось плохой растворимостью исходного нуклеозида в воде, повышенным мицеллообразованием в реакционной смеси в ходе достаточно продолжительной реакции ферментативного синтеза, а также эффектом «желирования, гелеобразования» при растворении в хлороформе суммарной фракции фосфолипидов, что затрудняло адсорбцию фосфолипидов на силикагеле и возможность осуществить эффективную очистку целевого соединения.

Формирование гелей при растворении свойственно для модифицированных нуклеозидов пуринового ряда. При получении фосфолипидных производных таких нуклеозидов на предыдущих этапах работы (в особенности конъюгатов с синтетическим ДМФХ) мы также сталкивались с эффектом «гелеобразования» при растворении липонуклеотидов в органических растворителях в процессе их очистки. Для ДМФ-8-бромаденозина указанный эффект проявился наиболее ярко.

Таким образом, в данной работе простым и экологичным способом, путем обработки исходного нуклеозида аденозина водным раствором брома, получен модифицированный нуклеозид 8-бромаденозин. С помощью реакции ферментативного трансфосфатидилирования впервые осуществлен синтез фосфолипидного производного указанного нуклеозида – 5›-(1,2-димиристоилфосфатидил)-8-бромаденозина. Новое соединение предположительно может являться нетоксичным предшественником биологически активной формы лекарственных антиметаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mieczkowski, A.* Preparation of cyclonucleosides / A. Mieczkowski, V. Roy, L. A. Agrofoglio // Chem. Rev. – 2010. – Vol. 110. – P. 1828–1856.

2. *Maity, J.* Facile access to bromonucleosides using sodium monobromoisocyanurate (SMBI) // J. Maity [et al.] // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. – 2017. 68:1.39.1–1.39.9. doi: 10.1002/cpnc.24.

3. Overcoming the delivery barrier of oligonucleotide drugs and enhancing nucleoside drug efficiency: The use of nucleolipids / X. Zhou [et al.] // Med. Res. Rev. – 2019. DOI: 10.1002/med.21652

4. *Биричевская Л.Л.* Биосинтез, свойства и применение фосфолипазы D *Streptomeces netropsis* БИМ В-235: автореф. дис. канд. биол. наук / Институт микробиологии НАН Беларуси. – Минск, 2010. – 24 с.