

Биричевская Л.Л.¹, Винтер М.А.¹, Булатовский А.Б.¹, Зинченко А.И.¹,
Квасюк Е.И.²

Ферментативный синтез 6-тио-2'-дезоксигуанозина и его фосфо- липидного производного

¹ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Республика
Беларусь

²Международный государственный экологический институт имени
А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск,
Республика Беларусь

Лекарственные средства на основе модифицированных компонентов нуклеиновых кислот (нуклеозидов, нуклеотидов и др.) составляют одну из важнейших групп химиотерапевтических препаратов для лечения ряда тяжелых вирусных и онкологических заболеваний. К сожалению, большинство соединений, пригодных для терапии онкозаболеваний, обладают нежелательными свойствами – невысоким терапевтическим индексом, выраженными токсическими эффектами, быстрым катаболизмом в русле крови до неактивных соединений. Одним из подходов в решении этой проблемы является разработка нового поколения лекарственных препаратов («prodrugs») на основе конъюгатов нуклеозидов с липидами.

Нуклеозид 6-тиодезоксигуанозин (6TdG) относительно недавно предложен в качестве нового, перспективного соединения, проявляющего высокую противоопухолевую активность и обладающего уникальным механизмом действия на опухолевые клетки [1].

Целью данной работы являлось биокаталитическое получение 6TdG, а также его фосфолипидного производного – 5'-димиристоилфосфатидил-6-тио-2'-дезоксигуанозина (DMP-6TdG), с использованием ферментов микробного происхождения.

Материалы и методы. В работе использовали рекомбинантную ПНФазу штамма *Escherichia coli* БМ-Д6, рекомбинантную ТФазу штамма *E. coli* TDP и нативную фосфолипазу D (ФЛД) *Streptomyces netropsis* БИМ В-428Д. (Штаммы хранятся в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов).

Синтез модифицированного нуклеозида проводили в реакционной смеси объемом 100 мл, содержащей 0,1 М 2'-дезокситимидин, 0,02 М 6-тиогуанин, 0,01 М К-фосфатный буфер (рН 7,0), 50 ед/мл ТФазы и 100 ед/мл ПНФазы. Смесь инкубировали при 45 °С в течение 60 мин. Динамику процесса накопления продукта реакции в смеси оценивали путем тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе растворителей изопропанол/хлороформ/25% водный аммиак (10:10:1, об./об.).

Синтез фосфатидильного производного 6TdG осуществляли в двухфазной реакционной смеси объемом 20 мл, состоящей из 6,5 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера (рН 6,0) с 0,1М CaCl₂ и 13,5 мл хлороформа. Реакционная смесь содержала 57 мг (200 мкмоль) нуклеозида, 250 мг (390 мкмоль) 1,2-димиристоилфосфатидилхолина и 9 мг сухого препарата ФЛД (3,6 ед. трансфосфатидилирующей активности). Реакцию вели в течение 10 ч при температуре 37 °С и постоянном перемешивании. Ход реакции контролировали при помощи ТСХ в системе растворителей хлороформ/метанол/вода (65:30:5 об./об.). Очистку целевого продукта осуществляли методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе растворителей хлороформ/метанол в соотношении 70:30 по объему. Фракции, содержащие DMP-6TdG объединяли и упаривали с использованием роторного испарителя.

Результаты и их обсуждение. С использованием “в одном флаконе” рекомбинантных ПНФазы и ТФазы *E. coli*, выделенных из сконструированных нами ранее штаммов [2], осуществлен ферментативный синтез 6TdG из 6-тиогуанина и природного нуклеозида 2'-дезокситимидина. При этом не менее 80-90 % модифицированного основания конвертируется в целевой нуклеозид. После выделения конечного продукта из реакционной смеси и его очистки выход составил 330 мг (58 мол.% в пересчете на введенный в реакцию 6-тиогуанин). Структура полученного соединения подтверждена данными УФ-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Фосфолипидное производное – DMP-6TdG, было получено при помощи реакции трансфосфатидилирования, катализируемой микробной ФЛД. В качестве источника фосфатидильных групп служил синтетический фосфолипид 1,2-димиристоилфосфатидилхолин. Конверсия нуклеозида 6TdG в фосфатидил-нуклеозид в реакции составила 65 мол.%. Выделение целевого соединения проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Конечный выход DMP-6TdG составил 78 мг (46 мол.% в расчете на введенный в реакцию нуклеозид).

Выводы. Нами разработан ферментативный способ получения субстанции противоопухолевого нуклеозида 6TdG, отличающийся по сравнению с химическими аналогами простотой, экологичностью и высоким выходом целевого продукта. Впервые получено новое, ранее не описанное соединение – фосфолипид DMP-6TdG, предположительно способное выступать «prodrug»-формой исходного противоопухолевого нуклеозида.

Литература

1. Induction of telomere dysfunction mediated by the telomerase substrate precursor 6-thio-2'-deoxyguanosine / I. Mender [et al.] // *Cancer Discov.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 82–95.
2. Application of recombinant enzymes for the synthesis of pharmaceutically valuable nucleosides and nucleotides / D. V. Burko [et al.] // *Biotechnology in Medicine, Foodstuffs, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology.* – New York: Nova Science Publ., 2010. – P. 1–13.