



ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ НАН
БЕЛАРУСИ

IV БЕЛОРУССКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ КОНГРЕСС
«СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ И
МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ»

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ФОСФОЛИПИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЛАМИВУДИНА И ТЕЛБИВУДИНА

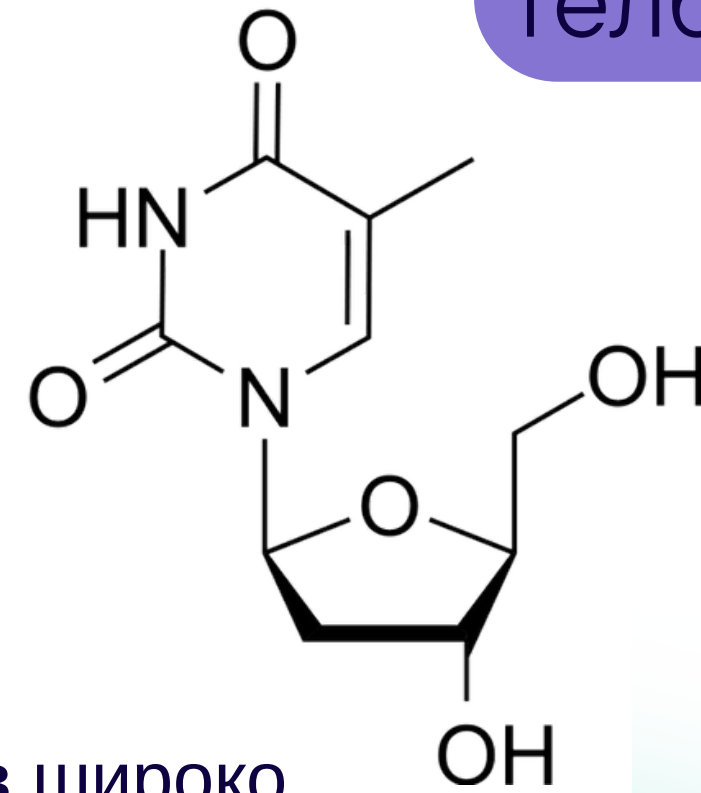
Отраслевая лаборатория
молекулярных био- и нанотехнологий

Я. П. Кононович, Л. Л. Биричевская

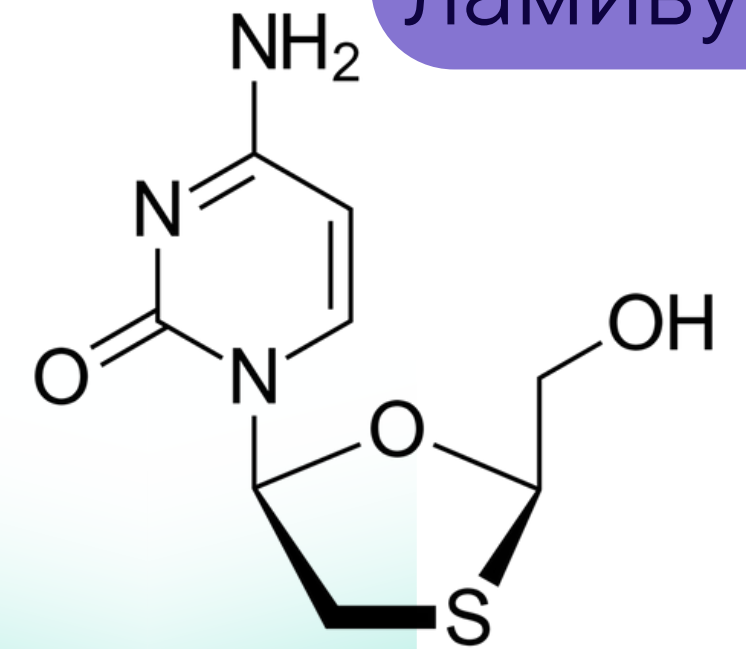


Введение

Модифицированные аналоги природных **нуклеозидов** широко применяются для терапии и профилактики вирусных заболеваний. Классическим примером таких соединений являются **ламивудин** (аналог дезоксицитидина) и **телбивудин** (L-энантиомер природного тимидина) – известные препараты для лечения **гепатита В** и **ВИЧ-инфекции**. Одним из возможных вариантов для создания лекарственных препаратов нового поколения с улучшенными свойствами на основе модифицированных нуклеозидов является их конъюгация с **фосфолипидным остатком**.



телбивудин



ламивудин



Вирус гепатита В

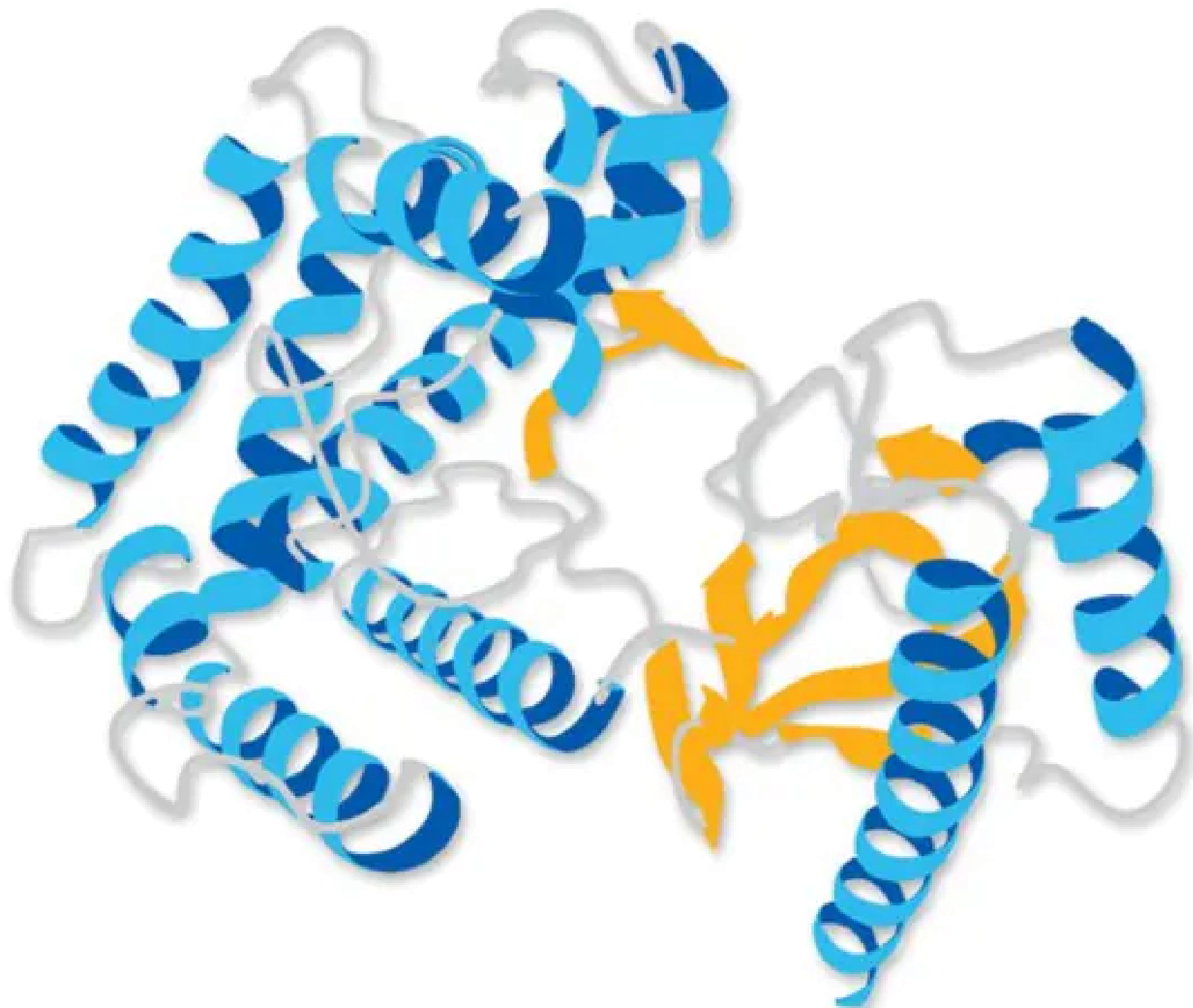
Цель работы

**Изучить возможность ферментативного синтеза
фосфолипидных производных ламивудина и телбивудина
путём реакции трансфосфатидилирования,
катализируемой микробной фосфолипазой D (ФЛД).**

Перспективы



Препараты, созданные с использованием фосфолипидных фрагментов, обладают преимуществом контролируемого высвобождения активной формы лекарственного соединения. Посредством ферментативного или химического расщепления фосфолипидного конъюгата исходное лекарственное средство высвобождается контролируемым образом, продлевая его терапевтический эффект и снижая частоту приема. Кроме того, поверхностные свойства носителей на основе фосфолипидов можно модифицировать для достижения адресной доставки лекарственного средства к конкретным тканям или клеткам, тем самым сводя к минимуму нецелевые эффекты и улучшая терапевтические результаты.



Фосфолипаза D

Фосфолипаза D - универсальный инструмент для синтеза новых производных фосфолипидов. Она действует в мягких условиях реакции, обладает высокой специфичностью и работает с различными субстратами. Ферментативный синтез характеризуется высокой чистотой целевого продукта, что во многих случаях делает его предпочтительным методом по сравнению с химическим синтезом. Используя различные субстраты и условия реакции, исследователи успешно синтезируют разнообразные наборы производных фосфолипидов.

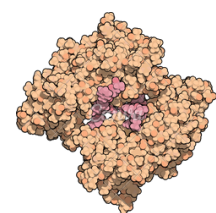
На изображении:

MilliporeSigma™ Фосфолипаза D, *Streptomyces chromofuscus*

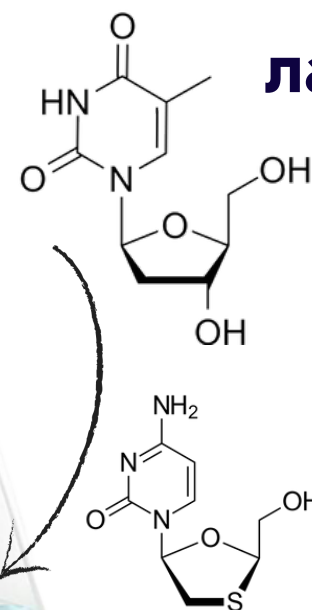
37°C

Материалы и методы

ферментный препарат



**телбивудин/
ламивудин**



водная фаза

органическая фаза



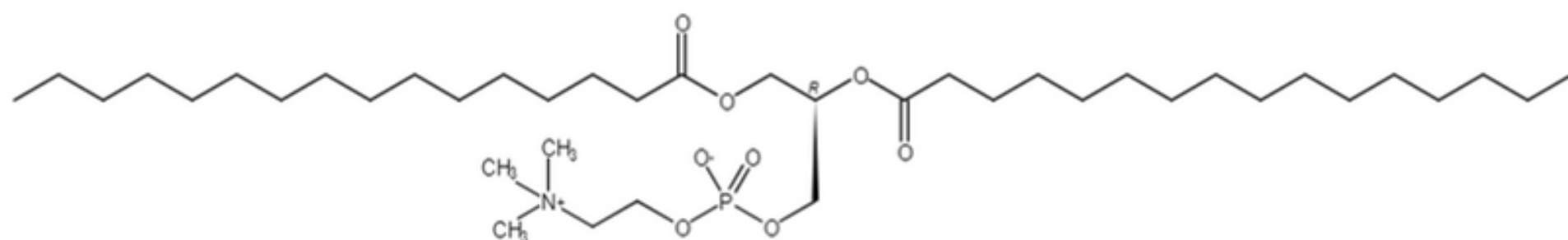
фосфолипиды C6/C16

Синтез осуществляли при 37°C в двухфазной реакционной смеси объемом 1 мл, сформированной 670 мкл хлороформа и 330 мкл 0,2 М натрий-ацетатного буфера (pH 6,0) с 0,15 М CaCl₂. Реакционная смесь содержала 10 мкмоль нуклеозида, 20 мкмоль фосфолипида 1,2-дипальмитоилфосфатидилхолина (C16:0) или 1,2-дигексаноилфосфатидилхолина (C6:0) (Larodan AB, Швеция) и 0,09-0,12 мг сухого ферментного препарата ФЛД *Streptomyces netropsis*.

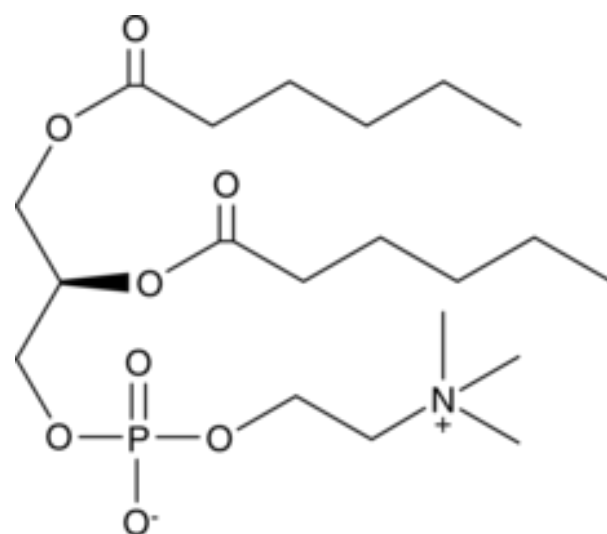
Ход реакции контролировали при помощи ТСХ на пластинах в системе растворителей хлороформ – метанол – аммиак (7:2:0,1 об.). Концентрации веществ определяли спектрофотометрически, используя известные коэффициенты молярной экстинкции нуклеозидов.

Результаты

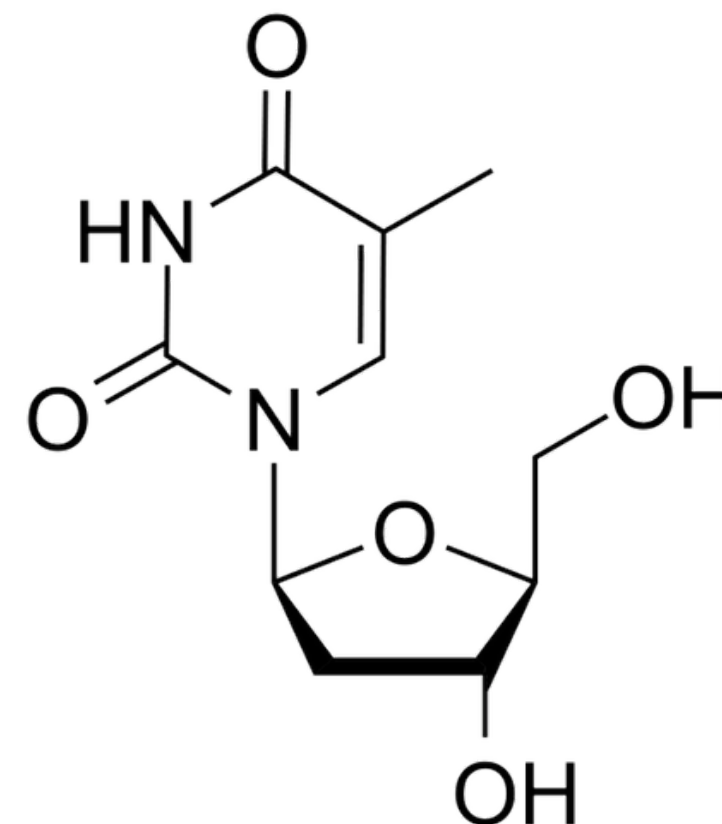
Получены новые соединения ламивудина и телбивудина с фосфолипидными остатками C6 и C16



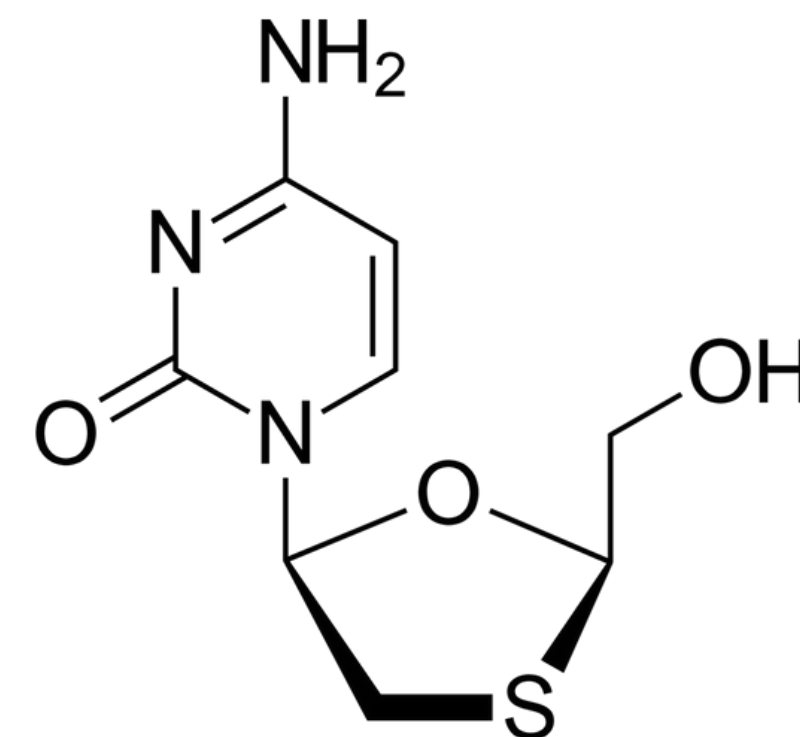
C16 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine



C6 1,2-Dihexanoyl-sn-glycero-3-Phosphatidylcholine

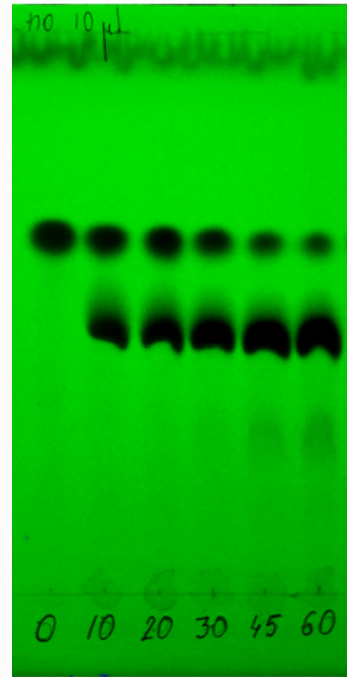


2'-Deoxy-L-thymidine

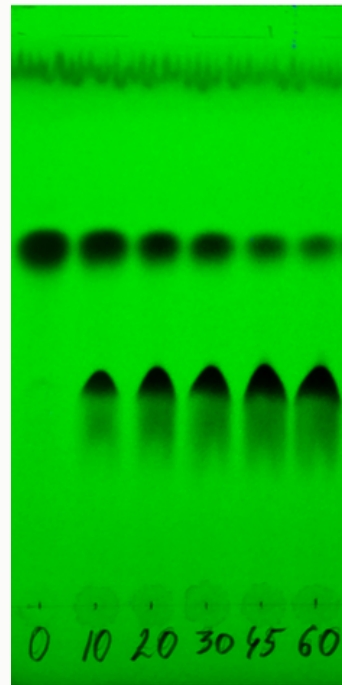


2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidine

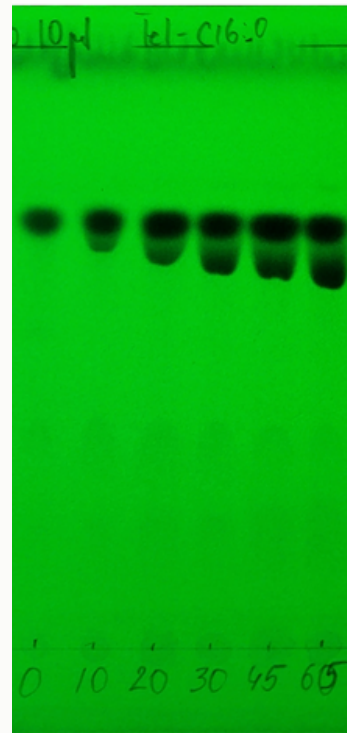
Выход реакций



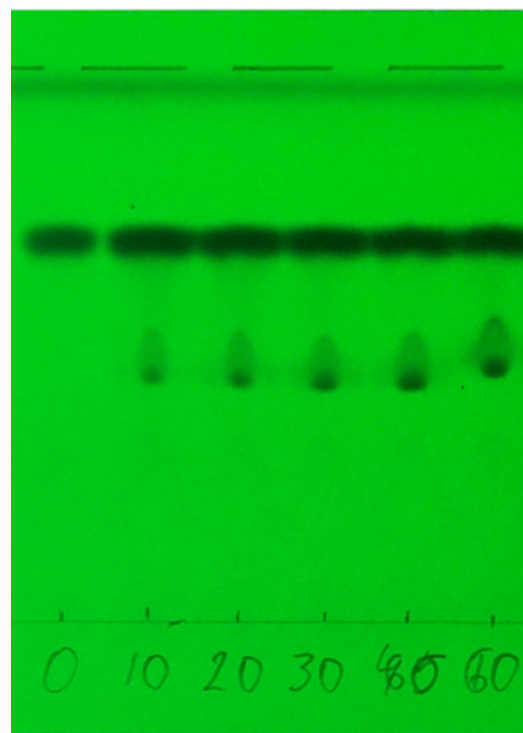
Ламивудин-С16



Ламивудин-С6



Телбивудин-С16



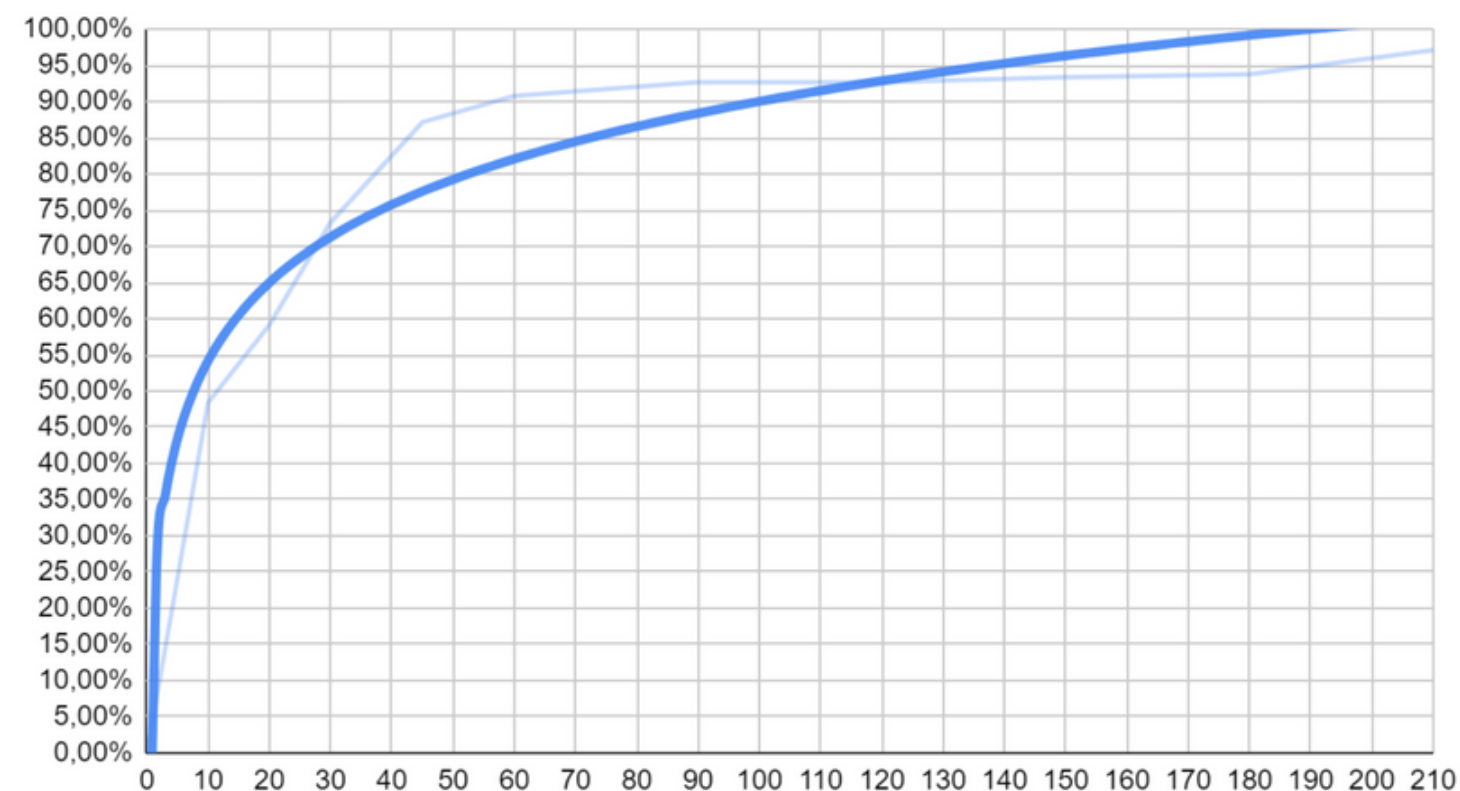
Телбивудин-С6

Конверсия в целевой продукт за 3,5 часа достигла 97,1% в реакции синтеза С16:0-ламивудина, 90,2% – С6:0-ламивудина; при этом активность ФЛД (на мг ферментного препарата) составила 4,2 мкмоль/мин и 2,5 мкмоль/мин соответственно.

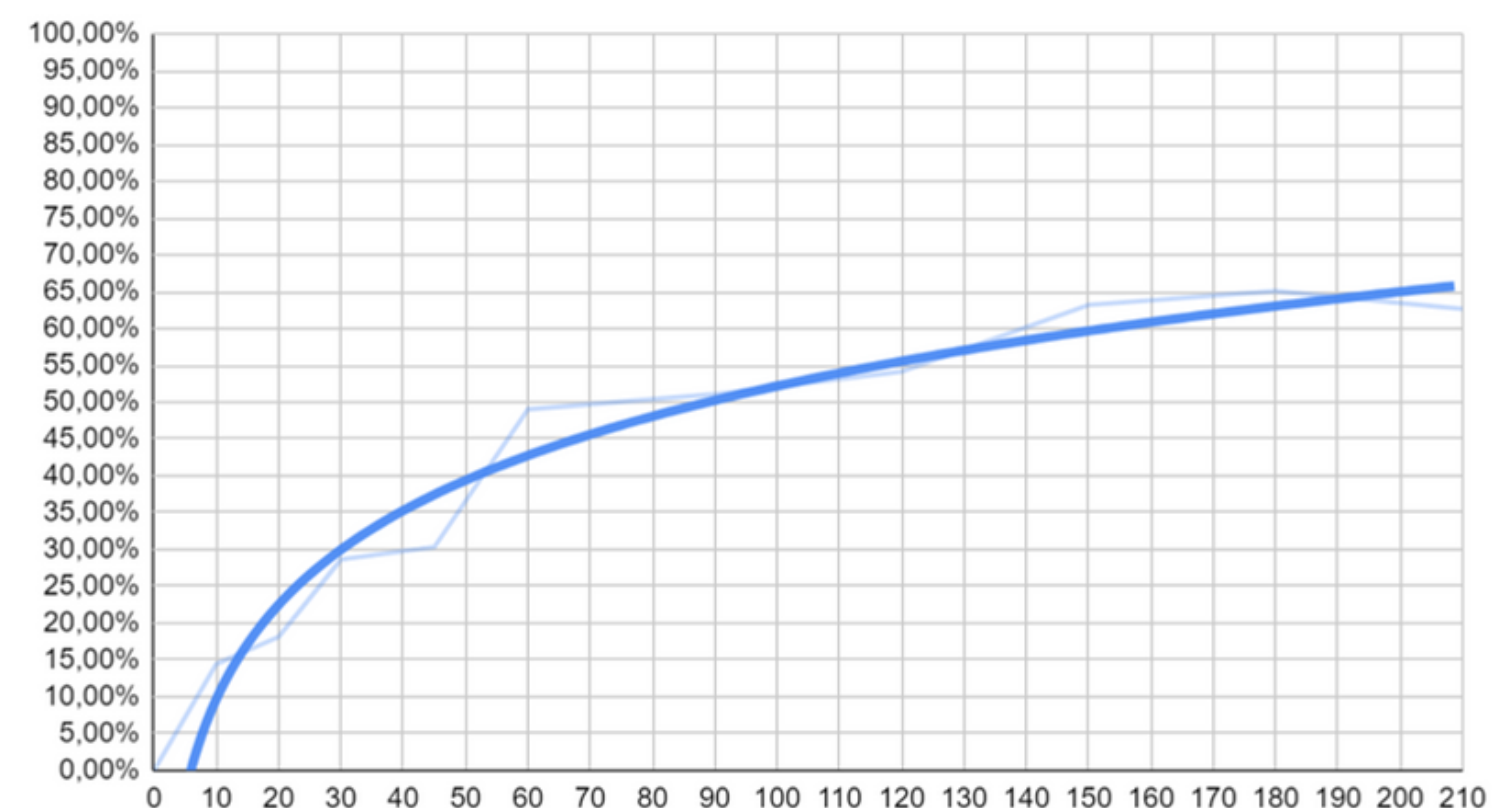
Конверсия телбивудина в С16:0- и С6:0-производные – 62,7% и 34,4%, а активность фермента – 0,83 мкмоль/мин и 0.18 мкмоль/мин. Фермент проявил более высокую активность в отношении фосфолипида с длинноцепочечными жирнокислотными остатками (С16:0), а ламивудин оказался более эффективным акцептором по сравнению с телбивудином.

Динамика накопления продуктов

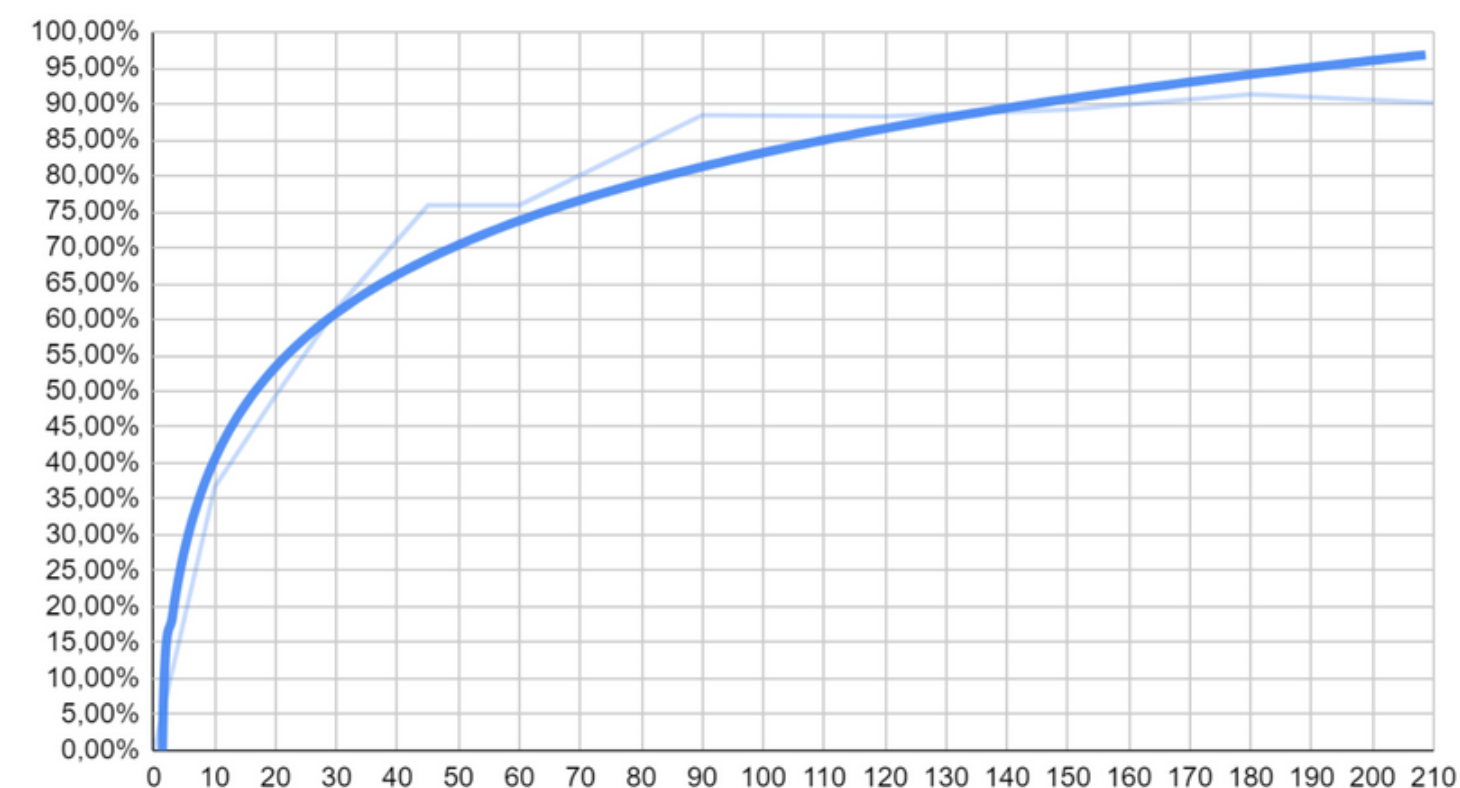
Ламивудин-С16



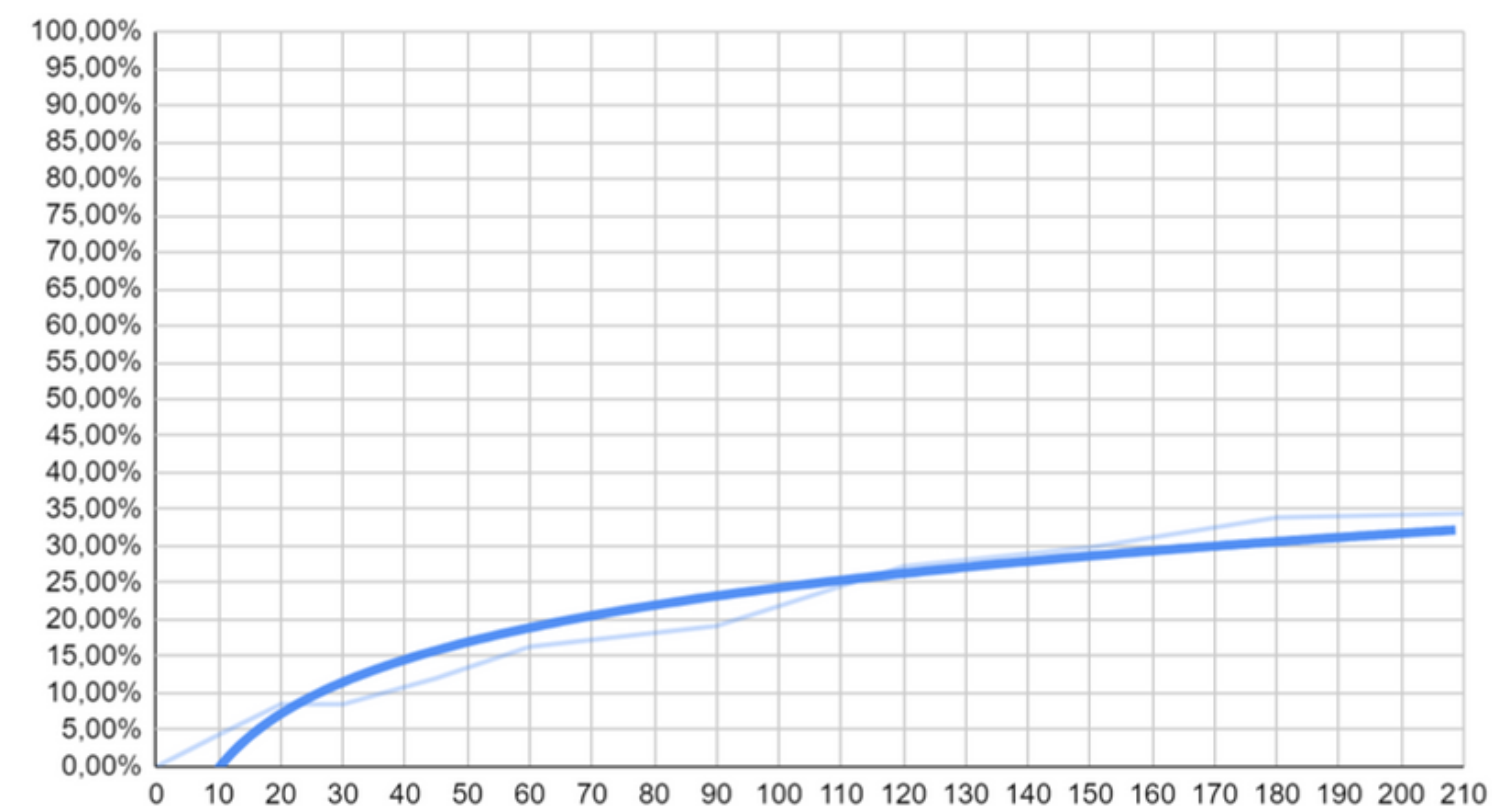
Телбивудин-С16



Ламивудин-С6



Телбивудин-С6



Y-ось: накопление продукта в реакционной смеси в процентном соотношении. X-ось: время реакции, мин

Заключение

Впервые синтезированы различные фосфолипидные конъюгаты противовирусных нуклеозидов ламивудина и телбивудина с использованием микробной ФЛД. Реакция протекает в одну стадию с высоким выходом и перспективна для использования.

