

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ СИНТЕЗА НОВЫХ АНАЛОГОВ РИБАВИРИНА

И.В. Фатеев, аспирант, *И.Д. Константинова, научн.сотруд.,
В.И. Швеи, профессор

кафедра Биотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

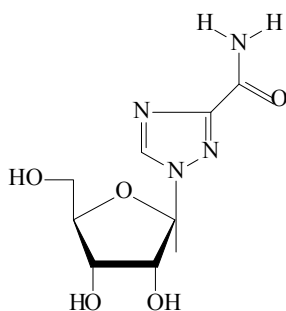
*Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Р

азработан эффективный биотехнологический способ получения аналогов рибавирина из 3-амино-1,2,4-триазола по реакции трансгликозилирования, осуществляемой с помощью рекомбинантных ферментных препаратов нуклеозидфосфорилаз.

Ключевые слова: модифицированные нуклеозиды, рибавирин, нуклеозидфосфорилазы, реакция трансгликозилирования.

Рост числа и распространенность вирусных заболеваний стимулирует ученых к поиску новых средств профилактики и интенсивной терапии в экстремальных ситуациях в периоды эпидемий. Лекарственные препараты на основе модифицированных нуклеозидов представляют наиболее востребованный класс соединений, поскольку обладают широким спектром биологической активности в отношении РНК- и ДНК-вирусов [1–3]. Выраженный ингибирующий эффект в отношении ДНК-содержащих вирусов, в том числе вирусов группы герпеса, покс- и аденовирусов, проявляет группа модифицированных нуклеозидов: 5-бром-2'-дезоксидеозидин, 1-β-D-арабинозилцитозин, 9-β-D-арабинозиладенин (видарабин) [1]. Для терапии герпесной инфекции широко используются ациклические гуанинсодержащие нуклеозиды, например, ациклогуанозин (ацикловир) и фамвир [2]. К числу наиболее известных препаратов относится рибавирин – 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид – противовирусный препарат с широким спектром действия в отношении многих РНК- и ДНК-вирусов [3]:



Рибавирин (1)

В медицинской практике рибавирин применяется для комбинированной терапии вирусных инфекций, лечения ряда особо

опасных заболеваний человека, включая бронхолиты у детей первого года жизни, респираторно-синтициальную вирусную инфекцию, различные формы герпетических поражений организма и хронический вирусный гепатит С, а также лечение геморрагической лихорадки с почечным синдромом и Крымско-Конго геморрагической лихорадки. Исследования по получению новых аналогов рибавирина с более высоким индексом терапевтической активности активно продолжаются в настоящее время. Его аналоги левовирин и тарибавирин (Valeant Pharmaceuticals, США) – кандидаты для клинического изучения при ряде вирусных инфекций.

Целью настоящего исследования была разработка биотехнологического способа получения новых аналогов рибавирина с последующим изучением их биологической активности в системах *in vitro* на репродукцию вирусов, вызывающих опасные и особо опасные инфекции человека.

В современной фармацевтической промышленности для получения модифицированных нуклеозидов в промышленных условиях используется многостадийный химический синтез, во многих случаях ключевой стадией является образование N-гликозидной связи. Однако, в процессе синтеза образуются смеси стерео- и регио-изомеров, что значительно осложняет выделение целевых продуктов. Кроме того, существующие методы требуют больших затрат сырья и реагентов, утилизации экологически небезопасных токсических отходов химического производства, что не отвечает требованиям современной биоиндустрии.

Для синтеза модифицированных нуклеозидов используется современный эффектив-

ный биотехнологический способ получения лекарственных препаратов с использованием ферментов нуклеозид-фосфорилаз (схема 1) [4].

В процессе реакции происходит перенос углеводного остатка от природного пуринового или пиримидинового нуклеозида на природное или модифицированное гетероциклическое основание. Нуклеозидфосфорилазы бактериальных клеток – пури́ннуклеозидфосфоори́лаза (ПНФ) и уридинфосфоори́лаза

(УФ) – в присутствии неорганического фосфата катализируют обратимый фосфорилиз нуклеозидов. Эти ферменты обладают довольно низкой субстратной специфичностью и широко используются в синтезе природных и модифицированных аналогов нуклеозидов [4]. В качестве донора рибозы (дезоксирибозы) обычно используют природные нуклеозиды: гуанозин, тимидин, уридин, аденозин.

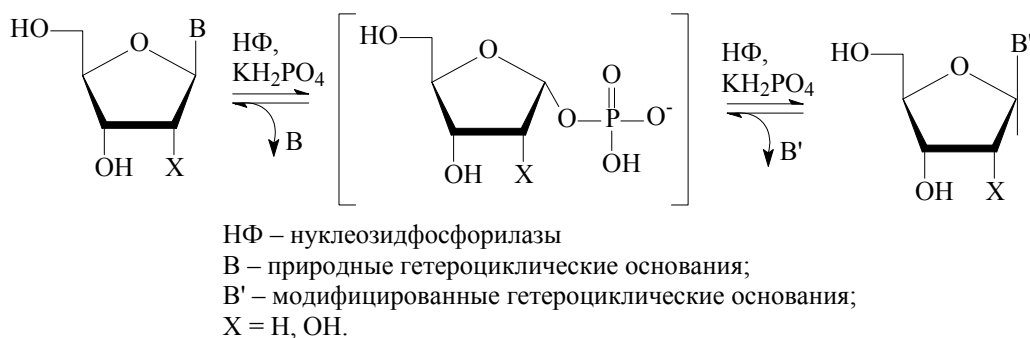


Схема 1. Принципиальная схема реакции трангликозилирования.

Нами ранее был разработан химико-ферментативный способ получения рибавирина (1) с использованием реакции трангликозилирования, осуществляемой пури́ннуклеозидфосфоори́лазами, иммобилизованными на водонерастворимом полимерном носителе [5, 6]. Высокий интерес к созданию новых противовирусных препаратов обеспечивает постоянное внимание к синтезу и

изучению биологической активности новых аналогов рибавирина, модифицированных либо по гетероциклическому основанию (1,2,4-триазол-3-карбоксами́ду), либо по углеводному остатку [7–9].

С целью получения структурных аналогов рибавирина нами были разработаны методы синтеза новых аналогов 3-амино-1,2,4-триазола (2)–(4) (схема 2).

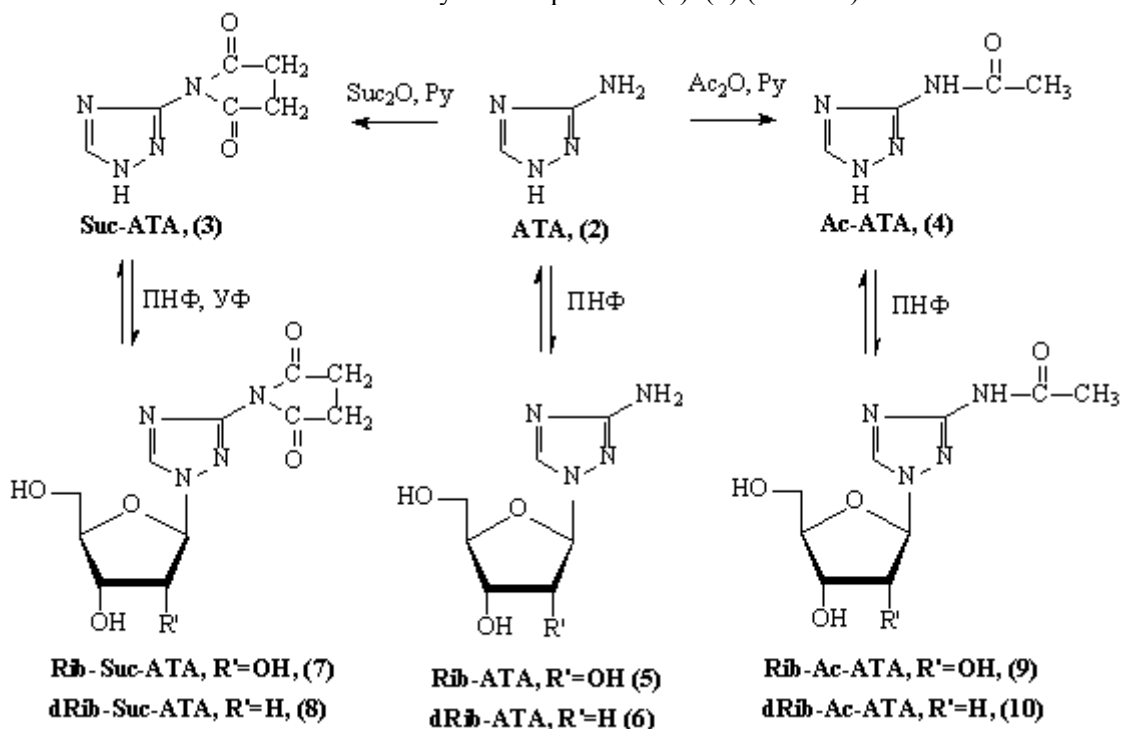


Схема 2. Схема синтеза аналогов рибавирина.

Аналоги 3-амино-1,2,4-триазола (Ac-ATA, **4** и Suc-ATA, **3**) получали взаимодействием 3-амино-1,2,4-триазола (ATA, **2**) с уксусным или янтарным ангидридом в пиридине. Синтезированные соединения получены с хорошими выходами и охарактеризованы данными ВЭЖХ, масс-спектрометрии и ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Для осуществления биотехнологического синтеза аналогов рибавирина нами использовались генно-инженерные ферменты: пуриннуклеозидфосфорилаза из штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERPUPHO1 [10] и уридинфосфорилаза из штамма-продуцента *E. coli* B21L(DE3)/pERURPHO1 [11].

На следующем этапе работы мы пытались синтезировать новые аналоги рибавирина из 3-амино-1,2,4-триазола (**2**) и его производных **3** и **4**. Было показано, что все три соединения являются субстратами для ферментов нуклеозидфосфорилаз. Однако ацилированное производное **4** оказалось нестабильным в условиях реакции и постепенно гидролизовалось до исходного 3-амино-1,2,4-триазола (**2**). Так как реакция протекает длительное время, данный метод синтеза нецелесообразен из-за образования трудноразделимой смеси оснований и соответствующих нуклеозидов. Кроме того, сам исходный 3-амино-1,2,4-триазол (**2**), как показали эксперименты, является очень плохим субстратом; за неделю образовывалось всего 2-3% продукта.

В связи с этим было решено нарабатывать рибозное и дезоксирибозное производное только для Suc-ATA (**3**). В случае использования в реакции трансгликозилирования в качестве донора рибозы нуклеозида инозина максимальное отношение содержания в смеси нуклеозида **7** к исходному основанию **3** составляло 1.2, тогда как при использовании в качестве донора рибозы уридина это соотношение достигало 5.7. Большая глубина протекания реакции была достигнута за счет вывода из реакционной смеси урацила путем его осаждения из раствора при охлаждении.

Вследствие этого нам пришлось вести процесс получения нуклеозида **7** полунепрерывным способом, периодически отфильтровывая урацил и добавляя уридин и ферменты в течение 65 суток. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. Разделение компонентов реакционной смеси проводили колоночной хроматографией на обращенно-фазовом сорбенте, что позволило получить продукт с

выходом 34% и чистотой не менее 98%.

Далее мы изучили возможность получения 2'-дезоксирибозного нуклеозида **8**. На первом этапе перед нами стоял вопрос о выборе оптимального субстрата. Возможными источниками 2'-дезоксирибозы являются природные нуклеозиды тимидин, 2'-дезоксисуридин и 2'-дезоксигуанозин. Из-за равновесности процесса ферментативного синтеза нуклеозидов, использование в качестве донора дезоксирибозы 2'-дезоксисуридина оказалось предпочтительнее в силу того, что, во-первых, образующийся в процессе фосфорилиза урацил выпадает в осадок и сдвигает равновесие процесса в сторону образования целевого продукта, во-вторых, использование 2'-дезоксисуридина обеспечивает более легкое разделение компонентов реакционной смеси, чем при применении 2'-дезоксигуанозина. Разделение компонентов реакционной смеси проводили так же, как и в предыдущем случае. После объединения фракций, содержащих целевой продукт, растворитель удаляли лиофилизацией. Разработанная методика синтеза производного **8** позволяет получать продукт с выходом 29% и чистотой не менее 98%.

Простота и универсальность данного подхода позволили масштабировать процесс синтеза и наработать экспериментальные партии модифицированных нуклеозидов для проведения биологического тестирования на противовирусную активность.

Экспериментальная часть

В работе использовали растворы генно-инженерных ферментов в 10 мМ KH_2PO_4 -буфере (pH 7.0): пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ), выделенной из штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERPUPHO1 [10], и уридин-фосфорилазы (УФ) из штамма-продуцента *E. coli* B21L(DE3)/pERURPHO1 [11], зарегистрированных во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

Были использованы растворители и реактивы фирмы Sigma (США) и Chemapol (Чехия) без дополнительной очистки, трифторуксусная кислота (ТФУ) Acros Organics (Бельгия).

Индивидуальность соединений, ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ на хроматографе Waters 740 (Waters, Германия) с использованием колонки Nova-Pak C_{18} 4 мкм (4.5×150 мм), при элюировании со скоростью 1 мл/мин в системе: элюент А – 0.1%

ТФУ/Н₂O; элюент В – 0.1% ТФУ/Н₂O – CH₃CN, 3 : 7; градиент элюента В: 0% 5 мин, 0–20%, 6–20 мин; детекцию осуществляли при 254 и 215 нм.

Колоночную хроматографию проводили на носителе C₁₈ Octadecyl-Si 100polyol 0.03 мм (Serva, США), размер колонки 30×220 мм.

¹H-ЯМР-спектры регистрировали при 25 °С на импульсном Фурье-спектрометре «Bruker DRX-500» с рабочей частотой 500 МГц. Химические сдвиги протонов приведены относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (0.0 м.д.). Масс-спектры получали на масс-спектрометре Finnigan MAT 900S (ESI).

3-(N-Сукцинимидо)-1,2,4-триазол (3). 1 г (11.9 ммоль) 3-амино-1,2,4-триазола (2) и 1.8 г (17.9 ммоль) янтарного ангидрида растворяли в 10 мл пиридина. Раствор выдерживали 2 ч при 40 °С. Осадок отфильтровывали, промывали пиридином. Сушили в вакууме (5 мм рт. ст.) трое суток при 25 °С. Выход: 0.876 г (44%). Масс-спектр, *m/z*: 184.75 [M + H₂O]⁺. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 2.52 (2H, дд, CH₂), 2.61 (2H, дд, CH₂), 7.81 (1H, с, Н-5), 11.45 (1H, ушир. с, NH).

3-Ацетидамо-1,2,4-триазол (4). 1 г (11.9 ммоль) 3-амино-1,2,4-триазола (2) растворяли в 20 мл пиридина. Добавляли 1.17 мл (12.4 ммоль) уксусного ангидрида. Раствор выдерживали 2 ч при 40 °С. Растворитель удаляли в вакууме (15 мм.рт.ст.), остаток соупаривали с водой. Продукт кристаллизовали из 10 мл изопропанола, отфильтровывали, промывали изопропанолом. Сушили в вакууме (5 мм рт. ст.) трое суток при 25 °С. Выход: 0.923 г (61%). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 2.54 (3H, с, CH₃), 7.44 (1H, ушир. с, NH), 7.56 (1H, с, Н-5).

1-β-D-Рибофуранозил-3-(N-сукцинимидо)-1,2,4-триазол (7). Растворяли 0.2 г КН₂РO₄ в 150 мл дистиллированной воды, доводили рН буферного раствора 2 н. КОН до 7.0, доводили полученный объем до 180 мл водой. В буфере растворяли 0.27 г (1.6 ммоль) 3-(N-сукцинимидо)-1,2,4-триазола (3) и 0.36 г (1.5 ммоль) уридина, полученную смесь нагревали до полного растворения исходного соединения (~80 °С), охлаждали до 55 °С. В реакционную смесь добавляли 1.4 мл раствора ПНФ (концентрация белка, определенная по методу Бредфорда – 11 мг/мл, активность 54 ед./мг) и 2.8 мл раствора УФ (концентрация белка, определенная по методу Бредфорда –

9.5 мг/мл, активность 16 ед./мг), раствор термостатировали при 55 °С в течение 65 сут. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. В реакцию периодически добавляли уридин (1 раз в 7 дней по 0.3 г, всего 2.1 г), растворы ПНФ (аналогичным образом, в общей сложности 4.0 мл) и УФ (аналогичным образом, в общей сложности 2.0 мл). Процесс проводили до тех пор, пока содержание исходного 3-(N-сукцинимидо)-1,2,4-триазола (3) не составило 1.8%. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С. Осадок отфильтровывали, промывали водой. Объединённый фильтрат упаривали в вакууме (15 мм рт. ст.), остаток соупаривали с этанолом. Смесь хроматографировали на обращеннофазовом сорбенте, целевое соединение 7 элюировали водой. Фракции объединяли, растворитель удаляли в вакууме (15 мм рт. ст.). Сушили в вакууме (5 мм рт. ст.) трое суток при 25 °С. Выход: 0.166 г (34%). Масс-спектр, *m/z*: 316.88 [M + H₂O]⁺. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 2.41 (2H, дд, CH₂), 2.52 (2H, дд, CH₂), 3.49 (1H, дд, Н-5b'), 3.58 (1H, дд, Н-5a'), 3.81 (1H, тд, Н-4'), 4.10 (1H, дд, Н-3'), 4.30 (1H, дд, Н-2'), 5.67 (1H, д, Н-1'), 8.59 (1H, с, Н-5).

1-(2-Дезокси-β-D-рибофуранозил)-3-(N-сукцинимидо)-1,2,4-триазол (8). Растворяли 0.11 г КН₂РO₄ в 80 мл дистиллированной воды, доводили рН буферного раствора 2 н. КОН до 7.0, доводили полученный объем до 100 мл водой. В буфере растворяли 0.15 г (0.8 ммоль) 3-(N-сукцинимидо)-1,2,4-триазола (3) и 0.37 г (1.6 ммоль) дезоксиуридина, полученную смесь нагревали до полного растворения исходного соединения (~80 °С), охлаждали до 55 °С. В реакционную смесь добавляли 0.5 мл раствора ПНФ (концентрация белка, определенная по методу Бредфорда – 11 мг/мл, активность 54 ед./мг) и 0.45 мл раствора УФ (концентрация белка, определенная по методу Бредфорда – 9.5 мг/мл, активность 16 ед./мг), раствор термостатировали при 55 °С в течение 70 сут. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ. В реакцию постепенно добавляли дезоксиуридин (1 раз в 7 дней по 0.11 г, в общей сложности 1.5 г), растворы ПНФ (аналогичным образом, в общей сложности 4.2 мл) и УФ (аналогичным образом, в общей сложности 2.4 мл). Процесс вели до тех пор, пока содержание исходного 3-(N-сукцинимидо)-1,2,4-триазола (3) не составило 4%. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С. Осадок

отфильтровывали, промывали водой. Объединённый фильтрат упаривали в вакууме (15 мм рт. ст.), остаток соупаривали с этанолом. Смесь хроматографировали на обращеннофазовом сорбенте, целевое соединение **8** элюировали водой. Фракции объединяли, растворитель удаляли в вакууме (15 мм рт. ст.). Сушили в вакууме (5 мм рт. ст.) трое суток при 25 °С. Выход: 0.074 г (29%). Масс-

спектр, m/z : 300.88 $[M + H_2O]^+$. Спектр 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 2.27 (1H, тд, H-2a'), 2.45 (2H, дд, CH₂), 2.55 (2H, дд, CH₂), 2.63 (1H, тд, H-2b'), 3.51 (1H, дд, H-5b'), 3.59 (1H, дд, H-5a'), 3.81 (1H, тд, H-4'), 4.18 (1H, дд, H-3'), 6.06 (1H, т, H-1'), 8.61 (1H, с, H-5).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 05-04-08013-офи_n).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Smee, D. F. A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models / D. F. Smee, R. W. Sidwell // *Antiviral Res.* – 2003. – V. 57. – P. 41–52.
2. Valacyclovir in the treatment of herpes simplex, herpes zoster, and other viral infections / J. J. Wu, M. H. Brentjens, G. Torres, K. Yeung-Yue, P. Lee, S. K. Tying // *J. Cutan Med. Surg.* – 2003. – V. 7. – P. 372–381.
3. Crotty, S. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? / S. Crotty, C. Cameron, R. Andino // *J. Mol. Med.* – 2002. – V. 80. – P. 86–95.
4. Yokozeki, K. Enzymatic production of ribavirin from pyrimidine nucleosides by *Enterobacter aerogenes* AJ 11125 / K. Yokozeki, T. Tsuji // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.* – 2000. – V. 10. – P. 207–213.
5. Пат. 2230118 РФ, МПК C12 P21/02. Способ получения 1-бета-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (рибавирина) / И. Д. Константинова, Р. С. Есипов, Т. И. Муравьева, С. А. Таран, К. Н. Веревкина, А. И. Гуревич, С. А. Феофанов, А. И. Мирошников. – № 2002122429; заявлено 21.08.2002; опубл. 10.06.2004, Бюл. № 16. – 12 с.
6. Биотехнологический способ получения рибавирина. Действие рибавирина и некоторых его комбинаций на репродукцию вируса осповакцины (*Vaccinia virus*) / И. Д. Константинова, Н. А. Леонтьева, Г. А. Галегов, О. И. Рыжова, Д. В. Чувиковский, К. В. Антонов, Р. С. Есипов, С. А. Таран, К. Н. Веревкина, С. А. Феофанов, А. И. Мирошников // *Биоорг. химия.* – 2004. – № 30. – С. 613–620.
7. Synthesis of 1,2,3-triazolo-carbanucleoside analogues of ribavirin targeting an HCV in replicon / Y. Saito, V. Escuret, D. Durantel, F. Zoulim, R. F. Schinazic, L. A. Agrofoglioa // *Bioorgan. & Med. Chem.* – 2003. – V. 11. – P. 3633–3639.
8. Enantioselective syntheses of carbocyclic ribavirin and its analogs: linear versus convergent approaches / R. Kuang, A. K. Ganguly, T.-M. Chan, B. N. Pramanik, D. J. Blythin, A. T. McPhail, A. K. Saksena // *Tetrahedron Lett.* – 2000. – V. 41. – P. 9575–9579.
9. Новый эффективный способ синтеза производных 1,2,4-триазол-3-карбоксамид и рибавирина / М. В. Чудинов, И. Д. Константинова, О. И. Рыжова, Р. С. Есипов, А. М. Юркевич, В. И. Швец, А. И. Мирошников // *Хим.-фарм. журнал.* – 2005. – Т. 39, № 4. – С. 43–46.
10. Пат. 2179188 РФ, МПК C12 P17/16. Способ получения рекомбинантной пуриннуклеозид-фосфорилазы, рекомбинантная плазмидная ДНК pERPUPHOI и штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERPUPHOI для его осуществления / Р. С. Есипов, А. И. Гуревич, А. И. Мирошников, Д. В. Чувиковский. – № 2000105214; заявлено 03.03.2000; опубл. 10.02.2002, Бюл. № 4. – 12 с.
11. Пат. 2177998 РФ, МПК C12 P17/16. Способ получения рекомбинантной уридин-фосфорилазы, рекомбинантная плазмидная ДНК pERURPHO1 и штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERURPHO1 для его осуществления. / Р. С. Есипов, А. И. Гуревич, А. И. Мирошников, Д. В. Чувиковский. – № 2000105215; заявлено 03.03.2000; опубл. 10.01.2002, Бюл. № 3. – 10 с.