INSTITUTE OF APPLIED MECHANICS, RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES,
MOSCOW

UDC 579 872:579 222.2, BBC 28.072
03 - life sciences

SYNTHESIS OF BIOSAFE HYDROXY DERIVATIVES OF THE POTENTIALLY
ANTITUMOR DRUG ARTEMISININ BY BASIDIOMYCETES

Ph.D. I. A. Parshikov

Abstract. The processes of hydroxylation of a potentially antitumor artemisinin preparation by basidiomycetes were studied. The fungi were grown on sucrose-malt broth in the presence of artemisinin, for 14 days. The transformation products were extracted with ethyl acetate. The extracts were analyzed by HPLC. Each culture of fungus had transformed artemisinin into a single metabolite. The transformation products were identified using mass spectrometry and NMR methods. 5 β -hydroxyartemisinin was isolated from the incubation medium *Pycnoporus sanguineus* in a yield of 92.1% and 7 β -hydroxyartemimisinin was isolated from the incubation medium *Funalia trogii* in 89.7% yield.

Keywords: artemisinin, hydroxylation, fungi, metabolism

ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЙ МЕХАНИКИ РАН, г. МОСКВА

УДК 579 872:579 222.2, ББК 28.072
03 - биологические науки

СИНТЕЗ БИОБЕЗОПАСНЫХ ГИДРОКСИПРОИЗВОДНЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНО
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА АРТЕМИЗИНИНА
БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

Кандидат биологических наук И. А. Паршиков

Реферат. Были изучены процессы гидроксирования потенциально противоопухолевого препарата артемизинина базидиальными грибами. Грибы выращивались на сахарозо-солодовом бульоне в присутствии артемизинина, в течение 14 дней. Продукты трансформации экстрагировали этилацетатом. Экстракты были проанализированы с помощью ВЭЖХ. Каждая культура грибов превращала артемизинин в единственный метаболит. Продукты трансформации идентифицировали с использованием методов масс-спектрометрии и ЯМР. 5 β -гидроксиартемизинин был выделен из инкубационной среды *Pycnoporus sanguineus* с выходом 92,1% и 7 β -гидроксиартемизинин был выделен из инкубационной среды *Funalia trogii* с выходом 89,7%.

Ключевые слова: артемизинин, гидроксирование, грибы, метаболизм

Введение. Артемизинин (qinghaosu) является натуральным продуктом, получаемым из лекарственной травы *Artemisia annua* (Рис.1), которая уже давно используется в традиционной китайской медицине для лечения лихорадок. Целая серия сильных противомалярийных препаратов была получена из артемизинина [1]. Однако, в последнее время появились работы, которые показывают возможность применения артемизинина в качестве эффективного сред-

ства обладающего антиопухолевой активностью [1, 2]. Артемизинин и его производные показали высокую противоопухолевую активность как по отношению к чувствительным к лекарственным средствам раковым клеткам, так и к резистентным линиям раковых клеток [2]. Однако, несмотря на эффективность действия артемизинина, остаются проблемы, связанные с водорастворимостью этого соединения и с побочными эффектами, связанными с поражениями в

стволе головного мозга. Эти проблемы вынуждают проводить поиск новых и эффективных производных артемизинина. Кроме того, повышение растворимости лекарства позволит снизить его дозировку, что соответственно приведет к увеличению биобезопасности используемого препарата.

К сожалению, химический синтез производных артемизинина является утомительным и дорогостоящим. Использование микробиологической трансформации позволяет заменить утомительные синтетические манипуляции химиков-органиков с материнской химической структурой более дешевыми и простыми методами. На сегодняшний день с помощью методологии микробной трансформации были разработаны эффективные процессы получения производных артемизинина, которые не затрагивали основной скелет материнской молекулы. Ранее, с помощью микробиологической трансформации были получены гидроксильированные производные артемизинина в четвертой позиции углеродного атома [3, 5], пятой позиции [4], шестой позиции [3, 5] и седьмой позиции [5-7] молекулы, однако все процессы шли не региоселективно и наблюдалось образование нескольких продуктов трансформации.

Здесь мы сообщаем о региоселективном гидроксильировании артемизинина базидальными грибами *Pycnoporus sanguineus* CS 20 и *Funalia trogii* CS 63 в пятой и седьмой позиции, с образованием только одного продукта трансформации с высокими выходами. В этой работе нас интересовало получение гидроксипроизводных артемизинина с целью повышения его растворимости, с одной стороны и получение единственного продукта, с другой стороны, что сможет значительно повысить эффективность процесса и исключит дополнительную стадию выделения нужного продукта из смеси метаболитов.

Материалы и методы исследования

Грибы *P. sanguineus* CS 20 и *F. trogii* CS 63 были получены из коллекции микроорганизмов биологического факультета независимого университета (г. Сан-Николас-делос-Гарза, штат Нуэво-Леон, Мексика) Микроорганизмы поддерживали на агаровых косяках, как описано ранее [8].

Микроорганизмы выращивали в течение 48 часов на круговой качалке (200-220 обо-

ротов в минуту) при 28°C в колбах (2500 мл), содержащих 500 мл среды следующего состава (г/л): сахароза – 15,0; солодовый экстракт (Difco, США) – 20,0; пептон (Fisher, Atlanta, GA, США) – 10,0; вода водопроводная, pH 6,0. Артемизинин (Mediplantex, Vietnam) (Рис. 1) растворяли в метаноле в концентрации 250 мг/10,0 мл и в каждую колбу добавляли 10,0 мл этого раствора, конечная концентрация артемизинина в каждой колбе составляла 500 мг/л. Культуры были инкубированы еще 14 дней на качалке при температуре 28°C. Через 14 дней биомассу отделяли фильтрацией через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Филтрат упаривали на роторном вакуумном испарителе при 50°C до 0,1 объема и экстрагировали этилацетатом в делительной воронке (экстрагировать можно и неупаренный филтрат). Экстракт упаривали в вакууме досуха и использовали для выделения продуктов трансформации [5].

Сухой остаток растворяли в метаноле и анализировали с использованием ВЭЖХ [5]. Экстракты были исследованы на хроматографе Waters 2690 (Waters, США), укомплектованном испарительным детектором рассеяния света PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, Amherst, MA, США) и колонкой Waters XTerra RP18 5 мкм (7,8 100 mm). Распылитель и испаритель ELS-детектора были установлены при температурах 70°C и 80°C соответственно, скорость потока газа (азот) – 1,0 SLM с постоянной времени 1. Элюентом служила подвижная фаза вода/метанол, градиент метанола повышали в течение 20 мин с 40 % до 90 %, затем снова снижали до 40 % в течение 5 мин при скорости потока 0,7 мл/мин, объем инъекции составлял 10 мкл [5]. Метаболиты выделяли с помощью полупрепаративной флэш-хроматографии [4] на Силикагеле 60 (200-400 меш, Natland International Corp., США) с использованием системы растворителей этилацетат-гексан в градиентном режиме, начиная с концентрации 10 % этилацетата и повышая до 40 %. Отбор фракций проводили по 50 мл со скоростью потока 30 мл/мин.

МСВР снимали на приборе Micromass Q-ToF Micro (Waters, США) [5]. ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C спектры записывали в растворе CDCl₃ на приборе Bruker DPX 300 (Bruker AG, Fallanden, Швейцария), работающих на

частотах 400 и 100 МГц, соответственно [5]. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Chemapol IV (Rudolph, США) с использованием поляризметрической трубки длиной 10 мм, объемом 0,05 мл ($\lambda = 589$ нм). Данные элементарного анализа были получены с помощью анализатора CHNS/O Perkin Elmer модель 2400 Series II (PerkinElmer, Boston, MA, США). Тпл определяли с помощью прибора FP62 Mettler-Toledo (Mettler-Toledo, Columbus, OH, США). ИК-спектры регистрировали с использованием спектрометра Thermo Scientific Nicolet IR 300 FT-IR (Thermo, San Jose, CA, США) на пластинах из германия.

Результаты исследования и их обсуждение

ВЭЖХ анализ экстрактов полученных из культур *P. sanguineus* CS 20 и *F. troglitii* CS 63 показали наличие только одного метаболита в каждой культуре, с временем удерживания 14,8 и 13,2 мин соответственно, остаточный артемизинин присутствовал в следовых количествах и имел время удерживания 19,1 мин.

Анализ МСВР обоих метаболитов показал, что каждый из них имел значение m/z 321,1314 $[M+Na]^+$. Дополнительные 16 единиц массы по сравнению с исходным артемизинином объясняются присутствием кислорода гидроксильной группы. Присутствие дополнительного атома кислорода также было подтверждено данными элементного анализа, который подтверждал молекулярную формулу $C_{15}H_{22}O_6$ каждого метаболита.

Метаболит I, полученный из культуры *P. sanguineus* CS 20 имел время удерживания 14,8 мин с общей площадью пика 92,1% (как определено с помощью ELS-детектора). Полученное соединение имело оптическое вращение $[\alpha]^{27D} + 64^\circ$ (c 1,0, метанол) и Тпл 145-146°C. ИК-спектр показал широкую полосу поглощения в области $\nu_{\max}$ 3300 cm^{-1} , что характерно для гидроксильной группы.

Спектр ЯМР 1H , ($CDCl_3$), δ м.д (J , Гц): 5,86 (1H, с, H-12); 4,38 (1H, дд, $J=3,7, 9,5$ Hz, H-5 α); 3,4 (1H, м, H-9); 2,32 (1H, дд, $J=4,7, 6,7$ Hz, H-4 α); 1,86 (1H, м, H-8 α); 1,80 (1H, м, H-7 β); 1,73 (1H, м, H-8 α); 1,66 (1H, дд, $J=5,4, 10,8$ Hz, H-4 β); 1,60 (1H, м, H-6); 1,47 (1H, м, H-5 α); 1,46 (3H, с, CH_3 -13); 1,2 (3H, д, $J=7,0$ Hz, CH_3 -15); 1,12 (1H, м, H-8 β); 1,08 (1H, м, H-7 α); 1,02 (3H, д, $J=5,5$

Hz, CH_3 -14)

Спектр ЯМР ^{13}C , ($CDCl_3$), δ м.д: 173,1 (C, C-10); 107,9 (C, C-3); 93,1 (C, C-12); 79,1 (C, C-12a); 74,2 (CH, C-5); 47,2 (CH, C-5a); 44,7 (CH, C-8a); 37,2 (CH, C-6); 35,2 (CH_2 , C-4); 33,5 (CH_2 , C-7); 33,0 (CH, C-9); 23,4 (CH_2 , C-8); 21,1 (CH_3 , C-13); 19,7 (CH_3 , C-15); 12,5 (CH_3 , C-14)

Данные проведенных анализов были в соответствии со структурой 5 β -гидроксиартемизинина (Рис. 1).

Метаболит II, полученный из культуры *F. troglitii* CS 63 имел время удерживания 13,2 мин с общей площадью пика 89,7 % (как определено с помощью ELS-детектора).

Полученное соединение имело оптическое вращение $[\alpha]^{27D} + 63^\circ$ (c 1,0, метанол) и Тпл 193-195°C. ИК-спектр показал широкую полосу поглощения в области $\nu_{\max}$ 3481 cm^{-1} , что характерно для гидроксильной группы.

Спектр ЯМР 1H , ($CDCl_3$), δ м.д (J , Гц): 5,90 (1H, с, H-12); 3,33 (1H, д.кв, $J=7,5, 6,0$ Hz, H-9); 3,24 (1H, дт, $J=11,0, 5,0$ Hz, H-7 α); 2,40 (1H, ддд, $J=14,5, 13,0, 4,0$ Hz, H-4 α); 2,11 (1H, м, H-8 α); 2,05 (1H, ддд, $J=14,5, 5,0, 4,0$ Hz, H-4 β); 2,00 (1H, ддд, $J=13,0, 4,0, 4,0$ Hz, H-5 α); 1,87 (1H, дт, $J=14,0, 5,0, 5,0$ Hz, H-8 α); 1,52 (1H, м, H-5 β); 1,48 (1H, м, $J=5,0, 10,0$ Hz, H-5 α); 1,42 (3H, с, CH_3 -13); 1,35 (1H, м, $J=4,5, 10,5$ Hz, H-6); 1,19 (1H, м, H-8 β); 1,19 (3H, д, $J=7,5$ Hz, CH_3 -15); 1,09 (3H, д, $J=6,5$ Hz CH_3 -14)

Спектр ЯМР ^{13}C , ($CDCl_3$), δ м.д: 172,5 (C, C-10); 105,9 (C, C-3); 93,9 (C, C-12); 79,2 (C, C-12a); 73,9 (CH, C-7); 48,4 (CH, C-5a); 44,9 (CH, C-6); 42,6 (CH, C-8a); 36,2 (CH_2 , C-4); 33,5 (CH_2 , C-8); 33,0 (CH, C-9); 25,6 (CH_3 , C-13); 25,2 (CH_2 , C-5); 15,9 (CH_3 , C-14); 13,0 (CH_3 , C-15)

Данные проведенных анализов были в соответствии со структурой 7 β -гидроксиартемизинина (Рис. 1).

Артемизинин оказался клинически эффективным средством для лечения как малярии, так и онкологических заболеваний, однако его низкая растворимость в воде не позволяет составить эффективную лекарственную форму для перорального применения, что значительно ограничивает его широкое использование. Кроме того, при высоких дозах артемизинин проявляет некоторые неблагоприятные неврологические побочные эффекты, что было выяснено на

подопытных животных.

В настоящее время очевидна потребность в экономичной, нетоксичной, пероральной форме артемизинина для лечения малярии и онкологических заболеваний. Поскольку химический синтез производных артемизинина полностью не обеспечивает жизнеспособный подход к разработке новых лекарств, мы предлагаем новый, логический подход к синтезу водорастворимых производных артемизинина. Низкие затраты, связанные с микробной трансформацией стимулируют отличный подход для получения гидроксированных производных артемизинина.

Известно, что фармакологическая активность артемизинина по отношению к малярии и онкологическим заболеваниям связана с эндопероксидным фрагментом [2]. Поэтому очевидно, что введение полярной гидроксильной группы в различных положениях углеродных атомов поможет увеличить гидрофильность молекулы артемизинина и повысить растворимость лекарства в воде с сохранением его фармакологической активности. Кроме того, имеются сведения, что введение по месту расположения гидроксильной группы таких радикалов, как этил или н-пропил увеличивает фармакологическую активность молекулы артемизинина [9]. Также ранее было проверено несколько C-7 замещенных производных артемизинина, полученных химически из микробного продукта (7 β -гидроксиартемизинина), которые имели повышенную растворимость в воде и превосходную противомалярийную активность *in vitro* [10]. Пока не известно, как такие заместители будут вести себя в положении C-5 молекулы артемизинина.

Ранее были рассмотрены процессы трансформации артемизинина, с использованием различных микроорганизмов [11], но все процессы шли не региоселективно, с образованием смеси нескольких метаболитов для которой требовалось дальнейшее разделение на индивидуальные вещества.

Для трансформации артемизинина нами были впервые использованы базидиальные грибы белой гнили *P. sanguineus* CS 20 и *F. troglitii* CS 63. Результаты оказались превосходными и каждый гриб продуцировал только один метаболит с высоким выходом продукта трансформации: 5 β -гидроксиартемизинин (92,1%) и 7 β -гидроксиартемизинин (89,7%), соответственно.

Артемизинин

Метаболит I

Метаболит II

Рис 1. Структуры артемизинина и двух метаболитов, образованных *P. sanguineus* CS 20 и *F. troglitii* CS 63

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Ho W. E., Peh H. Y., Chan T. K., Wong W. S. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. // *Pharmacol Ther.* 2014. V. 142. N 1. P. 126-139.

2. Das A. K. Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds. // *Ann. Med. Health Sci. Res.* 2015. V. 5. N 2. P. 93-102.

3. Zhan J., Guo H., Dai J., Zhang Y., Guo D. Microbial transformation of artemisinin by *Cunninghamella echinulata* and *Aspergillus niger*. // *Tetrahedron Lett.* 2002a. V. 43. N 25. P. 4519-4521.
4. Parshikov I. A., Miriyala B., Muraleedharan K. M., Avery M. A., Williamson J. S. Microbial transformation of artemisinin to 5-hydroxyartemisinin by *Eurotium amstelodami* and *Aspergillus niger*. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 33. N 5. P. 349-352.
5. Parshikov I. A., Muraleedharan K. M., Avery M. A., Williamson J. S. Transformation of artemisinin by *Cunninghamella elegans*. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 64. N 6. P. 782-786.
6. Zhan J., Zhang Y., Guo H., Han J., Ning L., Guo D. Microbial metabolism of artemisinin by *Mucor polymorphosporus* and *Aspergillus niger*. // *J. Nat. Prod.* 2002b. V. 65. N 11. P. 1693-1695.
7. Parshikov I. A., Miriyala B., Muraleedharan K. M., Illendula A., Avery M. A., Williamson J. S. Biocatalysis of the antimalarial artemisinin by *Mucor ramannianus* strains. // *Pharm. Biol.* 2005. V. 43. N 7. P. 579-582.
8. Parshikov I. A., Freeman J. P., Williams A. J., Moody J. D., Sutherland J. B. Biotransformation of N-acetylphenothiazine by fungi. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 52. N 4. P. 553-557.
9. Avery M. A., Muraleedharan K. M., Desai P. V., Furtado A. M. M., Tekwani B. L. Structure-relationships of the antimalarial design, synthesis, and CoMFA studies toward the development of artemisinin-based drugs against leishmaniasis and malaria. // *J. Med. Chem.* 2003. V. 46. N 20. P. 4244-4258.
10. Pabbisetty D., Illendula A., Muraleedharan K. M., Chittiboyina A. G., Williamson J. S., Avery M. A., Avery B. A. Determination of antimalarial compound, ARB-89 (7 β -hydroxyartemisinin carbamate) in rat serum by UPLC/MS/MS and its application in pharmacokinetics. // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 889-890. P. 123-129.
11. Parshikov I. A. *Microorganisms in Chemistry of Terpenoids*. Dallas: Primedia E-launch LLC. 2016. 102 p.