

GLIKOZYDY NASERCOWE – NOWE TRENDY W CHEMII MEDYCZNEJ SAPONIN I SAPOGENIN

CARDIAC GLYCOSIDES – NEW TRENDS IN MEDICINAL CHEMISTRY OF SAPONINS AND THEIR GENINS

Grzegorz Grynkiewicz^{*1}, Wiesław Szeja²

¹ *Instytut Farmaceutyczny*
ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa
**e-mail: g.grynkiewicz@ifarm.eu*

² *Wydział Chemii Politechniki Śląskiej*
ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Krótki rys historyczny
2. Pompa sodowa; ligandy i inhibitory
3. Antyproliferacyjny potencjał CG i nowe wskazania terapeutyczne
4. Źródła substancji aktywnych CG
5. Perspektywy resyntezy i glikorandomizacji CG

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Grzegorz Grynkiewicz jest absolwentem Wydziału Chemii UW (1962); stopień doktora za dysertację na temat alkaloidów *Lycopodium* (Promotor: J.W. Rodewald, 1968) uzyskał na tym samym wydziale. Od 1969 pracownik naukowy IChO PAN, gdzie otrzymał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych (1979). Otrzymał tytuł profesora nauk chemicznych w 1992 r. Odbił staże naukowe w University College London (UK); Southern Illinois University, Carbondale IL; University of California, Berkeley CA; University of Houston, Houston TX; Texas University MD Anderson Cancer Center, Houston TX (USA); oraz Queen's University Kingston ONT (CAN). Od 1984 pracuje w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie. Zainteresowania zawodowe: chemia związków naturalnych, synteza chemiczna, chemia medyczna i farmaceutyczna, systemy zapewnienia jakości w badaniach nad lekiem, historia badań naukowych i wynalazków technicznych. Czynnny członek towarzystw naukowych: PTChem., PTFarm., Towarzystwo Naukowe Warszawskie, Stowarzyszenie Polskich Wynalazców i Racjonalizatorów. Ważniejsze wyróżnienia indywidualne – Odznaczenie Premiera RP „Zasłużony dla wynalazczości” (2004); Nagroda Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2006); Medal „Merite d'Invention” Międzynarodowej Wystawy Wynalazków w Brukseli (2009); Medal PTChem., im. Stanisława Kostaneckiego (2014).

Prof. dr hab. inż. Wiesław Szeja od 1966 roku jest zatrudniony na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Obecnie pracuje na stanowisku profesora zwyczajnego w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii. Odbił kilkumiesięczne staże jako profesor wizytujący (CNRS w Grenoble, Francja i Texas University MD Anderson Cancer Center, Houston Teksas, USA). Jego obecne zainteresowania naukowe obejmują m.in. badania nad nowymi metodami otrzymywania glikozydów, funkcjonalizacji związków naturalnych o udokumentowanej aktywności biologicznej, projektowanie i otrzymywanie glikokoniuatów pochodnych związków naturalnych, inhibitorów białek odgrywających kluczową rolę w procesach proliferacji komórek nowotworowych.

ABSTRACT

Plant secondary metabolites – ubiquitous low molecular weight chemicals which are not essentials for the host existence and reproduction but serve many auxiliary functions, are frequently occurring as glycosides, for which particularly abundant examples exist in antibiotic, saponins and flavonoid categories. Cardiac glycosides (CG), originally isolated from *Digitalis* plants, also known as cardiotonic steroids, have particularly extensive record of ethnopharmacological and medicinal use. Although their application in treatment of dropsy is documented since 1875, long time has elapsed before their chemical structure were determined and mechanisms of their toxicity and cardiotonic action were recognized as inhibition of Na⁺ / K⁺ ATP-ase pump. Contemporary molecular pharmacology has revealed that cardiac glycosides are endogenous compounds in variety of animals, where they function as toxins or hormones. Besides, numerous recent studies confirmed anticancer activity of CGs at very low concentrations. These findings have been possible due to advances in ultrasensitive analytical techniques and also due to progress in organic synthesis, particularly total enantioselective syntheses of carbohydrates, which secured availability of individual CG and their analogs for medicinal chemistry studies.

Keywords: cardiac glycosides; digitoxin; digitoxose synthesis

Słowa kluczowe: glikozydy nasercowe; digitoksyna; synteza digitoksozy

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

API	- substancja aktywna leku (ang. <i>active pharmaceutical ingredient</i>)
ASP	- ATP-aza sodowo – potasowa; pompa sodowa (adenozynotryfosfataza zależna od jonów sodowych i potasowych)
ATP	- adenozynotryfosforan
CG	- glikozydy nasercowe (ang. <i>cardiac glycosides; cardiotonic glycosides</i>)
SAR	- zależność aktywności biologicznej od struktury (ang. <i>structure-activity relationship</i>)
SERCA	- pompa wapniowa; ATP-aza retikulum sarkoplazmatycznego

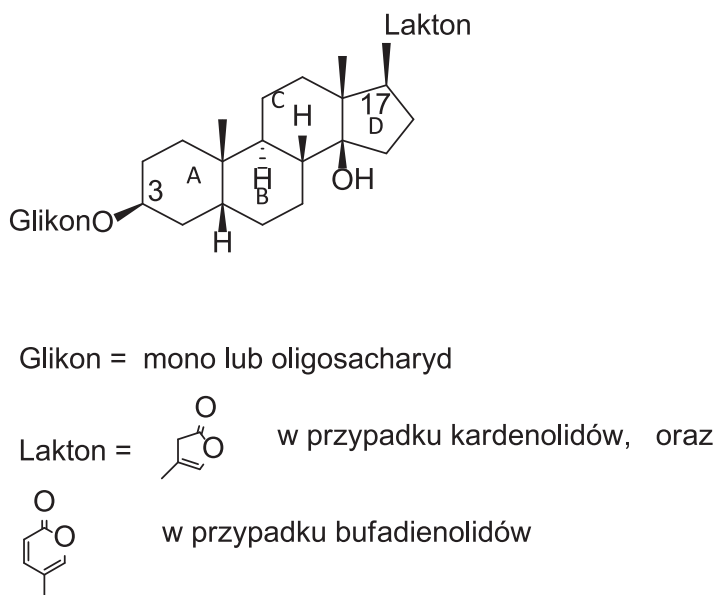
WPROWADZENIE

Określenie „leki” w odniesieniu do substancji pochodzenia naturalnego jest pojęciem niejednoznacznym, w którym treści pochodzące z tradycji etnomedycznych łączą się z wiadomościami zaczerpniętymi ze współczesnych nauk o życiu. Dość powszechna jest tendencja do ignorowania faktu, że ze względów formalnych wszelkie definicje i relacje pojęć w tym zakresie muszą uwzględniać aktualny stan prawa farmaceutycznego. Współczesne tendencje rozwoju wiedzy i techniki nie sprzyjają utrzymaniu tradycyjnego, dychotomicznego podziału na „leki naturalne” i „leki syntetyczne”. Zdecydowana większość znanych leków ma związki strukturalne z substancjami pochodzenia naturalnego, a ponadto znaczna ich część wywodzi swe struktury z inspiracji modelowymi procesami biochemicznymi. Problemy metodyczne i techniczne nieuchronnej transformacji tradycyjnych leków pochodzenia naturalnego w substancje API o rygorystycznie określonych strukturach i właściwościach wygodnie jest śledzić na przykładzie glikozydów metabolitów wtórnych, takich jak glikozydy nasercowe, gdzie odwieczny problem zależności aktywności biologicznej od struktury (SAR) w odniesieniu do natywnej cząsteczki i jej rozłącznych fragmentów: glikonu i aglikonu ciągle stanowi gorący temat w projektowaniu nowych leków.

1. KRÓTKI RYS HISTORYCZNY

Udokumentowane dzieje glikozydów nasercowych, jako leku są znacznie dłuższe niż historia nowoczesnej chemii farmaceutycznej i medycznej oparta na stosowaniu substancji spełniających określone kryteria czystości chemicznej. Dość powszechnie za wydarzenia początkujące okres rozwoju chemii związków naturalnych w zastosowaniach medycznych uznaje się datowane na 1811–7 wydzielenie morfiny z opium i odkrycie kolejnych alkaloidów [1]. Lekarz z Birmingham, William Withering, stosujący z powodzeniem wyciągi z liści naporstnicy purpurowej (Foxglove, *Digitalis purpurea* L) w stanach zagrażających życiu opuchlin i obrzęków (ang. dropsy; obecnie klasyfikowane jako konsekwencje niewydolności mięśnia sercowego) już od 1775 roku, ogłosił 10 lat później fundamentalną monografię [2], która miała radykalny wpływ na ówczesną praktykę medyczną oraz pozostała do dziś klasycznym tekstem w dziedzinie medycyny i farmacji. Chociaż liście i nasiona naporstnicy (*Digitalis purpurea* L; angielska nazwa – *foxglove*) szybko stały się jednym z podstawowych surowców farmaceutycznych, izolacja substancji aktywnych okazała się zadaniem znacznie przekraczającym ówczesne możliwości technik separacyjnych i analitycznych. W 1835 roku francuskie *Societe de Pharmacie* wyznaczyło nagrodę (500 franków) za wyodrębnienie aktywnych składników z surowca roślinnego, a w pięć lat później wyznaczoną sumę podwojono. Substancje o akceptowalnej czystości chemicznej i krystalicznym charakterze pojawiły się w laboratoriach pod koniec XIX stulecia: digitoksyna (Nativelle, 1869; Schmiedeberg 1875); ouabaina

(Arnaud, 1888); strofantyna (Fraser, 1890), a poprawne struktury i ich wzajemne korelacje poznano dopiero w latach 30. XX wieku: konwalotoksyna (Karrer, 1929); digoksyna (Smith, 1930); scilareny (Stoll, Ruzicka, Reichstein, 1930–1940) [1–5]. Gromadzoną stopniowo wiedzę o budowie CG udało się podsumować drogą korelacji chemicznych, w grupach związków naturalnych należących do kategorii steroidów i sacharydów, jeszcze przed upowszechnieniem współczesnych narzędzi badawczych, takich jak rentgenografia, inne spektralne metody badań strukturalnych i chromatograficzne metody separacji, głównie dzięki temu, że w badaniach nad CG posługiwano się intensywnie metodami immunochemicznymi. Powszechne stosowanie przeciwciał digoksyny, digitoksyny i ouabainy pozwoliło osiągnąć znaczne postępy w badaniach farmakologicznych CG mimo bardzo skromnych środków służących do identyfikacji struktury [6, 7].



Rysunek 1. Ogólny wzór strukturalny glikozydów nasercowych (CG)
Figure 1. General formula of the cardiac glycosides

W grupie naturalnych glikozydów roślinnych formalnie kwalifikujących się do kategorii saponin steroidowych, wyodrębniono ze względu na tradycyjne zastosowanie medyczne, dwie grupy różniące się charakterem podstawnika laktonowego aglikonu (niezbędnego dla aktywności kardiotonicznej) w pozycji 17 beta pierścienia D tetracyklicznego układu steroidowego: kardenolidy z pierścieniem pięcioczłonowym i bufadienolidy z sześcioczłonowym. Podstawnik sacharydowy (glikon) umieszczony w pozycji 3 pierścienia A może zawierać od 1 do 4 reszt monosacharydowych, spośród takich cukrów jak: D-glukoza, L-ramnoza, L-fukoza, D-digitaloza, D-digitoksoza, L-oleandroza, L-tewetoza, etc. Dalsze charakterystyczne cechy strukturalne CG, obok obecności nienasyconego pierścienia lakto-

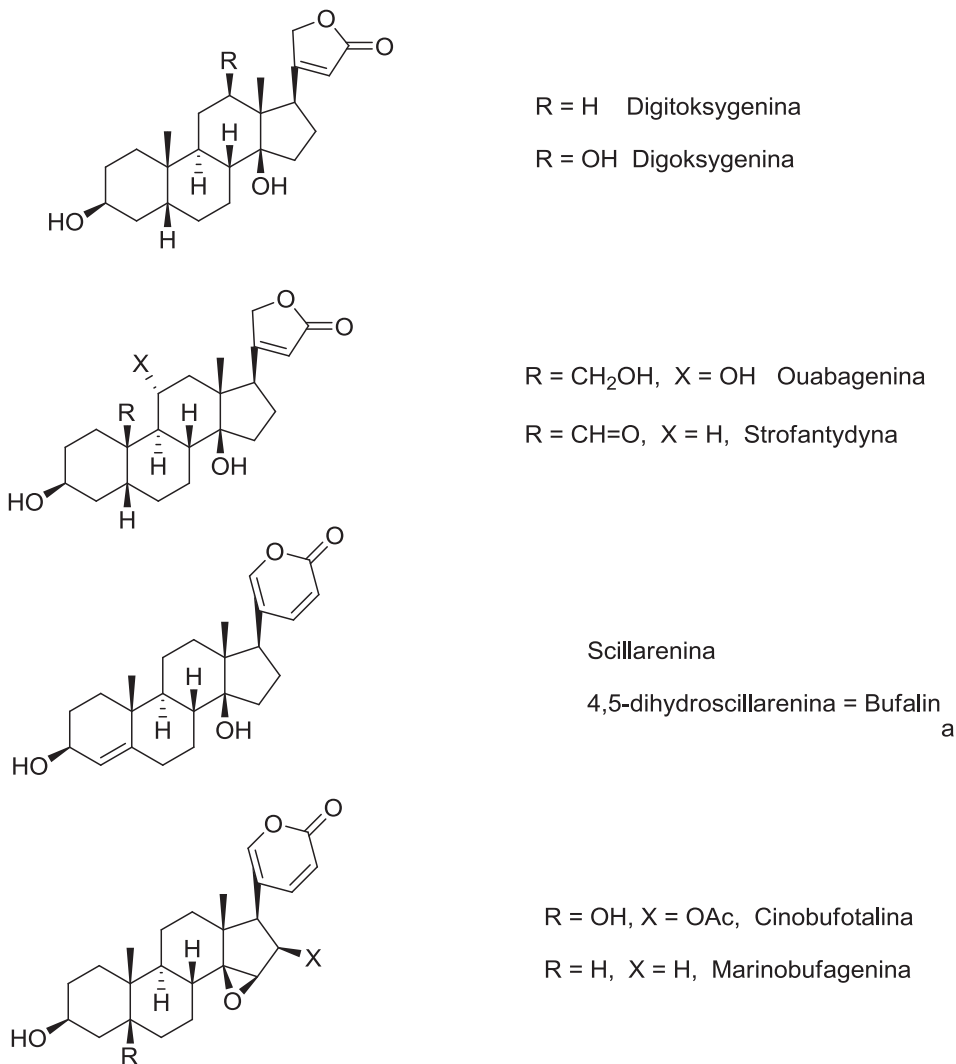
nowego, to również determinujące aktywność biologiczną – typ złącza pierścieni: A/B – *cis* ; B/C – *trans* i C/D – *cis*, ($5\beta,14\beta$ -androstan) oraz *beta-* (β -) stereochemia wiązań glikozydowych [4, 5]. Związki tego typu znajdujemy oprócz naporstnicy w wielu innych roślinach, szczególnie w rodzinach *Apocyanaceae*; *Asclepiadaceae*; *Scrophulariaceae* (kardenolidy), oraz *Crassulaceae*; *Iridaceae*; *Liliaceae* i *Ranunculaceae* (bufadienolidy). Rozpoznanie ich działania inotropowego, które jest podstawą terapii różnych rodzajów niewydolności mięśnia sercowego, zawdzięczamy pracom C.-A. Nativelle i O. Schmiedebergera, którzy pracując niezależnie we Francji i Niemczech, najwcześniej dysponowali stosunkowo czystymi, krystalicznymi próbkami digitoksyny, wyizolowanej we własnych laboratoriach z liści naporstnicy [6–9]. Preparaty naporstnicy wpływają korzystnie na mechaniczne i elektryczne aspekty działania mięśnia sercowego, zwiększając jego wydolność. Wskazanie do ich stosowania stanowią: ostra i przewlekła niewydolność serca oraz migotanie przedsionków. Najczęściej stosowanym lekiem z tej grupy jest digoksyna, stosowana doustnie w postaci tabletek, w dawce dobowej od 0,250 do 0,375 mg. Niepożądaną cechą charakterystyczną CG jest jednak ich wysoka toksyczność – za granicę bezpieczeństwa uznaje się stężenie w surowicy na poziomie 2 ng/mL [8, 9].



Foto 1. Naporstnica purpurowa (*Digitalis purpurea*); Foto 2 – Naporstnica wełnista (*Digitalis lanata*)
Photo 1–2. Flowering foxglove plants – *Digitalis purpurea* (left) and *Digitalis lanata* (right)

Klasyczna farmakologia CG, oparta początkowo na obserwacji efektów ich działania na narządy i preparaty tkankowe, stopniowo wspomagana metodami pozwalającymi ocenić wiązalność i powinowactwo do hipotetycznych celów receptorowych, takie jak użycie znakowanych radioaktywnymi atomami glikozydów,

została szczegółowo opisana i podsumowana w obszernej dwutomowej monografii [6, 7]. Późniejsze badania, z przełomu XX i XXI wieku, można już określić, jako pochodzące z okresu nowoczesnej farmakologii molekularnej, posługującej się w swoich badaniach strukturalnych precyzyjnymi metodami obrazowania o wysokiej rozdzielczości, przede wszystkim wyznaczaniem parametrów makrocząsteczki wraz z jej ligandami, z rentgenowskich badań monokryształów odpowiednio przygotowanych preparatów białkowych. Potwierdzenie struktur poszczególnych ligandów z grupy CG odbywało się niejako po drodze do określania topologii miejsc wiążących białek receptorowych [10–13].



Rysunek 2. Przykładowe struktury aglikonów (genin) CG
 Figure 2. Exemplary structures of cardiac glycoside aglycons (genins)

2. POMPA SODOWA; LIGANDY I INHIBITORY

Ocenia się, że około 23% ATP jest zużywane przez organizm ludzki w stanie spoczynku przez jeden tylko enzym: Na^+ , K^+ -ATPazę (ASP; EC 3.6.1.37; popularnie określany jako pompa sodowa), integralny składnik błon komórkowych wyższych eukariotów odpowiedzialny za utrzymywanie transbłonowego gradientu jonów sodowych. Jest to białko o charakterze heterooligomeru, złożone z podjednostek, którym nadano symbole: α , β , oraz FXYD [14–16]. Fragment α stanowi jednostkę katalityczną hydrolizy ATP, której zewnątrzkomórkowe powierzchnie obszarów transbłonowych tworzą jednocześnie miejsce wiążące dla glikozydów nasercowych. Podjednostka β jest białkiem regulatorowym, również transbłonowym, zawierającym kilka miejsc glikozylacji. Poznano cztery izoformy α i trzy β występujące u ludzi i tworzące kombinacje ASP, które znacznie różnią się dystrybucją tkankową (także w różnych fazach rozwoju) oraz specyficznością substratową i aktywnością. Większość form ASP zawiera dodatkową podjednostkę transbłonową FXYD, która stanowi kolejny czynnik różnicujący na poziomie tkanek i organizmu, wnosząc do kombinatoryki molekularnej enzymu aż siedem izoform [17].

Odkrycie ATPazy zależnej od obecności i stężenia jonów sodowych i potasowych w neuronach skorupiaków w latach sześćdziesiątych przez J.C. Skou, zostało uhonorowane nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 1997 roku [18]. Obecnie wiadomo, że ekspresja enzymu jest szczególnie intensywna w komórkach nabłonkowych (epitelialnych) organów o szczególnie intensywnej wymianie jonowej, takich jak serce i nerki. W jednym cyklu katalitycznym, pompa ASP wymienia trzy wewnątrzkomórkowe jony sodu na dwa zewnątrzkomórkowe jony potasu, kosztem hydrolizy jednej cząsteczki ATP. Hamowanie aktywności enzymu pośrednio wpływa na zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytosolu i jest przyczyną efektu inotropowego obserwowanego dla mięśnia sercowego w wyniku podania CG. Różnica powinowactwa miejsc aktywnych ATP-azy do jonów sodowych i potasowych jest konsekwencją dwu różnych stanów konformacyjnych enzymu, z których jeden dodatkowo ulega autofosforylacji przez hydrolizowaną cząsteczkę ATP. W jednej z konformacji miejsce wiążące enzymu jest zwrócone w stronę cytoplazmy i wykazuje powinowactwo do kationów sodowych (K_d *ca* 0,6 mM) a w drugiej jest skierowane na zewnątrz komórki a miejsce wiążące kationy wykazuje silne powinowactwo (K_d *ca* 0,2 mM) do jonów potasu [14–16]. Wydajność enzymu wynosi ok. 200 cykli na sekundę. Adenozynotrifosfataza zależna od jonów sodu i potasu (ASP) jest obecnie uznana za potencjalny cel molekularny dla różnorodnych interwencji terapeutycznych i jako taka stała się przedmiotem intensywnych badań strukturalnych. Początkowo dokładniejsze badania miejsc aktywnych enzymu prowadzono metodami autoradiografii z użyciem ligandów znakowanych izotopami radioaktywnymi, później metodą rezonansu magnetycznego, z użyciem ligandów zawierających jądra NMR-aktywne (^2H , ^{13}C , ^{19}F) [6, 14], natomiast najnowsze generacje wyników pochodzą już z nowoczesnych pomiarów rentgenowskich, które potwierdziły zasadnicze dedukcje wywiedzione wcześniej z eksperymentów biochemicznych

[18–20]. Wymagało to pokonania wielu trudności technicznych, poczynając od uzyskania izoform białka w stanie homogenym, wyindukowania i ustabilizowania pożądanej konformacji oraz uzyskania odpowiedniego do pomiaru monokryształu makrocząsteczki z odpowiednio rozmieszczonymi jonami i ligandami organicznymi. Dla ASP mamy dotychczas do dyspozycji zaledwie cztery wyniki rentgeno-strukturalne, podczas gdy dla lepiej poznanej pompy wapniowej SERCA dostępne są wyniki z ponad 20 pomiarów, różnych stanów konformacyjnych, co pozwala na znacznie bardziej precyzyjny opis działania enzymu. Ouabaina, stosunkowo trwałe chemicznie monoramnozyd kardenolidowy, była pierwszym i pozostaje najlepiej zbadanym ligandem ASP o powinowactwie na poziomie nanomolowym, także w postaci modyfikowanych chemicznie pochodnych. Klasyczna farmakologia CG postuluje zbliżone aktywności kardi toniczne dla różnych glikozydów z tej grupy oraz uwzględnia znaczącą aktywność odpowiednich genin. Jednak dopiero dostępność poszczególnych izoform białek katalitycznych ASP umożliwiła precyzyjne pomiary w tym zakresie [20–23] i ujawniła różne profile powinowactwa i aktywności poszczególnych ligandów z grupy CG [24, 25].

3. ANTYPROLIFERACYJNY POTENCJAŁ CG I NOWE WSKAZANIA TERAPEUTYCZNE

Współczesny opis aktywności biologicznej popularnych leków nasercowych pochodzenia naturalnego (CG) musi uwzględniać również fakty nieoczekiwane z punktu widzenia podręczników farmakognozji z ubiegłego wieku. Po pierwsze, retrospektywne badania epidemiologiczne wykazały, że wśród pacjentów leczonych glikozydami naparstnicy, zgony z powodu chorób nowotworowych zdarzały się wyjątkowo rzadko [26]. Po drugie wykazano niezbitie, że organizmy ssaków wytwarzają substancje z grupy CG, które mają funkcje hormonalne [27–29]. W fizjologii człowieka taką rolę odgrywają ouabaina i marinobufagenina, uznane za endogenne steroidy kardi toniczne, których zasadniczym miejscem wytwarzania jest kora nadnerczy. Związki te mają zdolność hamowania aktywności ASP, ale i w niższych stężeniach wpływają na liczne procesy fizjologiczne niezależnie od tej aktywności. Obecnie szczególne zainteresowanie wzbudza potencjał CG, jako związków wykazujących selektywną cytotoksyczność i hamujących proliferację, choć bezpośrednie zastosowanie leków kardiologicznych w onkologii może okazać się problematyczne ze względu na toksyczność systemową i związany z nią niski indeks terapeutyczny. Nie ulega jednak wątpliwości, że CG zasługują na uwagę, jako związki wiodące w badaniach nad nowymi terapiami, także w zastosowaniach do prewencji i terapii chorób nowotworowych [30–32]. Część badań farmakologicznych prowadzonych w tym kierunku zdołała już osiągnąć fazę weryfikacji klinicznej [33–35].

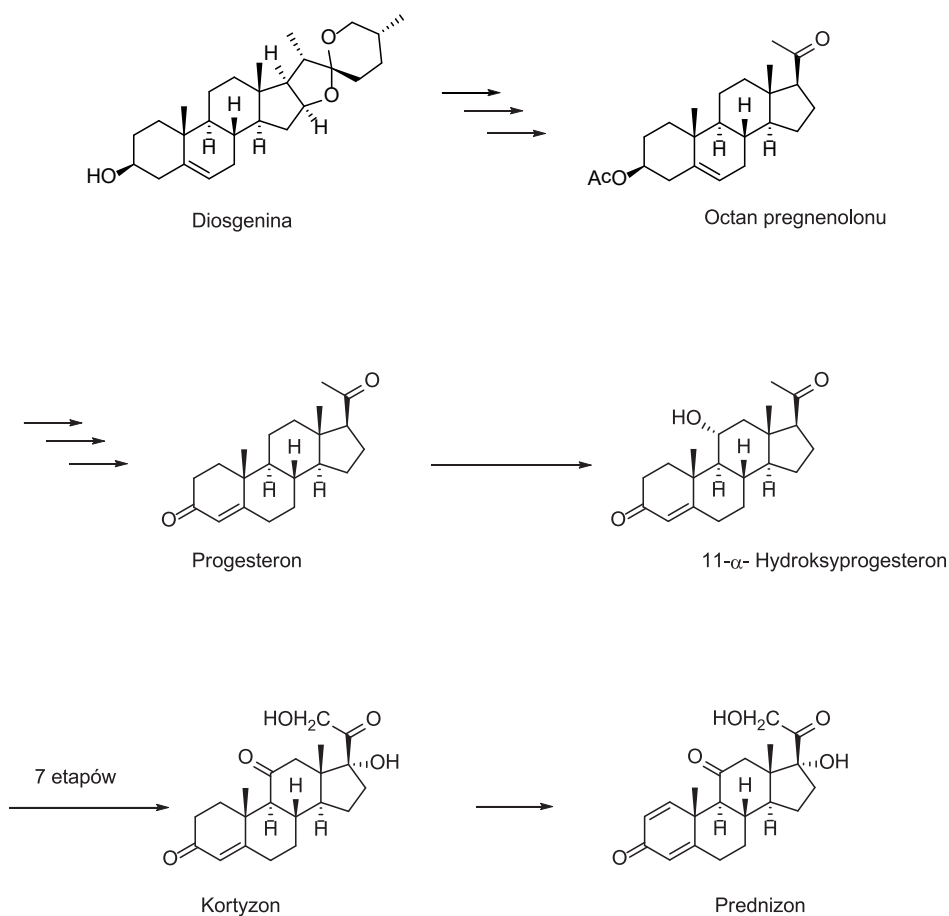
4. ŹRÓDŁA SUBSTANCJI AKTYWNYCH CG

Tradycja etnofarmakologiczna wyprzedziła zastosowanie CG w nowoczesnej medycynie o stulecia, więc źródła substancji aktywnych rozpoznawano długo i starannie. Obecnie znamy co najmniej 13 rodzin roślin zawierających glikozydy steroidowe a w samej tylko *Apocyanaceae* zidentyfikowano ponad 30 rodzajów roślin, w których stwierdzono obecność CG [36], a więc można uznać że występowanie tych metabolitów wtórnych rozciąga się na setki gatunków, spotykanych w większości rejonów globu. Stwierdzono również, że bufadienolidy występują w skórce wielu rodzajów żab z gatunku *Bufo* zamieszkujących różne kontynenty. Uznaje się, że w obu królestwach organizmów toksyny te pełnią funkcje obronne przed napastnikami a ich biosynteza jest odgałęzieniem biosyntezy steroli zapoczątkowanego cyklizacją skwalenu [37]. Obecnie, poza tradycyjnym źródłem CG, jakim jest napastrnica purpurowa, przemysłowe znaczenie dla produkcji preparatów leczniczych układu krążenia mają: cebula morska (*Scilla maritima* L), z której izoluje się scilareny i hodowlana napastrnica wełnista *Digitalis lanata* przy czym nie ustają próby pozyskiwania tych glikozydów w doświadczalnych hodowlach tkankowych oraz innymi metodami biotechnologicznymi. Podobnie jak w przypadku innych związków naturalnych, które przeszły pomyślnie weryfikację kliniczną i zostały zarejestrowane jako leki, kolejnym progiem staje się dostępność substancji aktywnej (API) w skali technicznej dyktowanej przez popyt rynkowy na preparaty ją zawierające. Chociaż potrzeby rynku leków krążeniowych na CG są dobrze znane i stabilne (światowy rynek poszczególnych leków z grupy CG-digoksyny, digitoksyny, proscylarydyny, oscyluje w ostatnich latach w zakresie pojedynczych ton), uruchomienie nowych wskazań terapeutycznych w obszarze onkologii może je zwielokrotnić. Przykłady takich nowoczesnych leków pochodzenia naturalnego jak taksol lub galantamina, których roślinne źródła były od początku ograniczone wskazują, że włączenie metod częściowej lub totalnej syntezy chemicznej w oczekiwaniu na optymalne ekonomicznie rozwiązania biotechnologiczne, staje się w pewnym momencie jedyną opcją. Historia rozwoju przemysłowej farmacji hormonów sterydowych doskonale ilustruje jak dostępność odpowiednich surowców przemysłowych determinuje rozwój całych działów medycyny. Badania prowadzone w latach 30. ubiegłego wieku w Niemczech (A. Butenandt i in.), Szwajcarii (L. Ruzicka i in.) i USA (W.M. Allen, P.S. Hench, E.C. Kendall), które zaowocowały poznaniem sterydów o czynności hormonalnej, wygenerowały potrzebę zastosowań medycznych tych niezwykle aktywnych biologicznie związków, podczas gdy ich pozyskiwanie z materiałów zwierzęcych związane było z ogromnymi problemami technicznymi. Dla przykładu, w latach 30. XX w. wyodrębnienie 10 miligramów testosteronu wymagało przeróbki 100 kg jąder byka, 15 mg androsteronu uzyskano z 15 tys. litrów moczu, do izolacji 1 mg progesteronu użyto jajniki 2 500 świń a pozyskanie 75 mg kortyzonu i 55 mg hydrokortyzonu pochłonęło nadnercza z 20 tysięcy krów [38]. Choć wiadano, że poszukiwane związki są strukturalnie spokrewnione ze stosunkowo łatwo dostępnym cholesterolem, ówczesne metody syntezy chemicznej nie rokowały szybkich

sukcesów w zastosowaniu go, jako materiału wyjściowego do syntez w skali przemysłowej. Do entuzjastów pomysłu wykorzystania saponin steroidowych a także CG jako surowców do syntezy najbardziej wówczas pożądaney substancji hormonalnej – kortyzonu, należał T. Reichstein, wówczas docent prywatny Politechniki Federalnej w Zurichu [39, 40], który nawet wytypował odpowiednie do tego celu źródło roślinne (skrętnik; *Strophantus kombe*) ale w Europie nie było dostępu do takich surowców w odpowiedniej skali. Rozwiązanie problemu niezależnych od produkcji zwierzęcej źródeł hormonów steroidowych zawdzięczamy R.E. Markerowi, który działając praktycznie bez wsparcia instytucjonalnego i bez pomocy ze strony przemysłu farmaceutycznego znalazł odpowiedni surowiec chemiczny do syntezy – diosgeninę, wskazał źródła botaniczne, z których związek ten może być pozyskiwany w skali wielotonowej, a wreszcie opracował w skali technicznej proces przemiany diosgeniny w uniwersalny półprodukt do syntezy steroidów, znany obecnie jako degradacja Markera [41, 42]. Obecnie, do szczególnie wydajnych źródeł diosgeniny, pozyskiwanej metodami tradycyjnymi, należą pataty meksykańskie (*Dioscorea mexicana*; *Dioscorea villosa*; *Dioscorea composita*) i agawa sizalowa (*Agawa sizalana*) a rośliną budzącą obecnie szczególne zainteresowanie jako obiekt eksperymentalnych procesów biotechnologicznych jest żółty imbir chiński (*Dioscorea zingiberensis*) [43]. Niezależnie od swej kluczowej roli surowcowej, diosgenina budzi poważne zainteresowanie także jako związek biologicznie aktywny, którego działania: antydrobnoustrojowe, antyoksydacyjne, przeciwzapalne i immunomodulujące, roszą zastosowania w medycynie prewencyjnej [44].

Zasadnicze etapy degradacji Markera polegają na acetolizie spiroketalu diosgeniny bezwodnikiem octowym w 200°C oraz następnie na utlenianiu utworzonego pierścienia dihydrofuranowego trójtlenkiem chromu. Otrzymany w tej sekwencji półprodukt stał się podstawą do przemysłowej syntezy kortykosteroidów, które uzyskały szerokie zastosowania medyczne, a także prekursorem syntetycznych środków antykoncepcyjnych (aktywnych przy podaniu doustnym w odróżnieniu od hormonów naturalnych), takich jak norethindrone, norgestrel, mestranol i 17 α -etynyloestradiol, które odegrały decydującą rolę w kształtowaniu współczesnej demografii i obyczajowości społeczeństw postindustrialnych [45, 46].

Potencjał diosgeniny, jako surowca przemysłowego dużej skali, jest jednak znacznie większy niżby to wynikało z powyższego schematu. W zasięgu współczesnych metod syntezy są także aglikony CG. Mimo, że istnieje klasyczna synteza totalna digitoksygeniny opracowana przez G. Storka [47] a temat ten nie przestaje być wyzwaniem dla chemików sfery akademickiej, którzy z powodzeniem demonstrują nowe rozwiązania metodyczne [48, 49] to przyszłe procesy technologiczne otrzymywania kardenolidów będą raczej wykorzystywać metody inżynierii genetycznej i biotechnologii, lub poznane już transformacje chemiczne, umożliwiające wykorzystanie zaawansowanych prekursorów wytwarzanych z łatwo dostępnej diosgeniny [38, 50, 51].

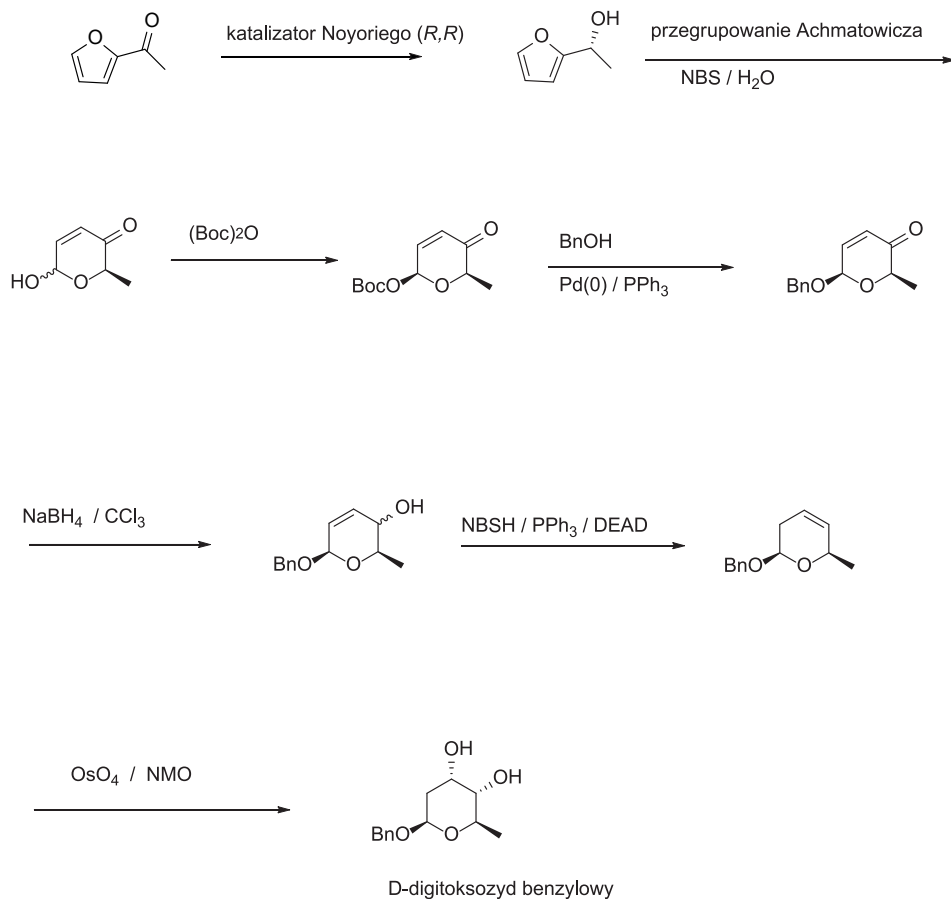


Schemat 1. Diosgenina jako źródło półsyntetycznych hormonów sterydowych

Scheme 1. Diosgenin as an industrial source of semi-synthetic steroidal hormones

Zupełnie inaczej przedstawia się sprawa ze składnikami cukrowymi CG, których dostępność dawno przestała być problemem ograniczającym techniczne zdolności wytwórcze glikozydów pochodzenia naturalnego, między innymi za sprawą postępów w enancjoselektywnej syntezie totalnej piranozydów. D-Glukoza jest jednym z najłatwiej dostępnych, odnawialnych, chiralnych syntonów wielofunkcyjnych. Podobnie L-ramnoza, choć kosztowniejsza jest łatwo dostępnym surowcem biotechnologicznym. Digitoksoza jest znacznie trudniej dostępna ze źródeł naturalnych, natomiast współczesnymi metodami totalnej, katalitycznej syntezy enancjoselektywnej można otrzymać oba jej enancjomery z prostych pochodnych furanu. Kluczowym etapem syntezy jest przegrupowanie Achmatowicza – oksydacyjna transformacja pierścienia furanowego w układ dihydropiranyowy – prekursor prostych i modyfikowanych monosacharydów. (Schemat 2) [52–55] Ilustracja przedstawia otrzymywanie prostego digitoksozydu benzylu ale warto dodać że poniższy

schemat został zrealizowany także dla mono glikozydu CG, przy użyciu digitoksygeniny zamiast alkoholu benzyłowego, w trzecim etapie zaprezentowanej sekwencji.



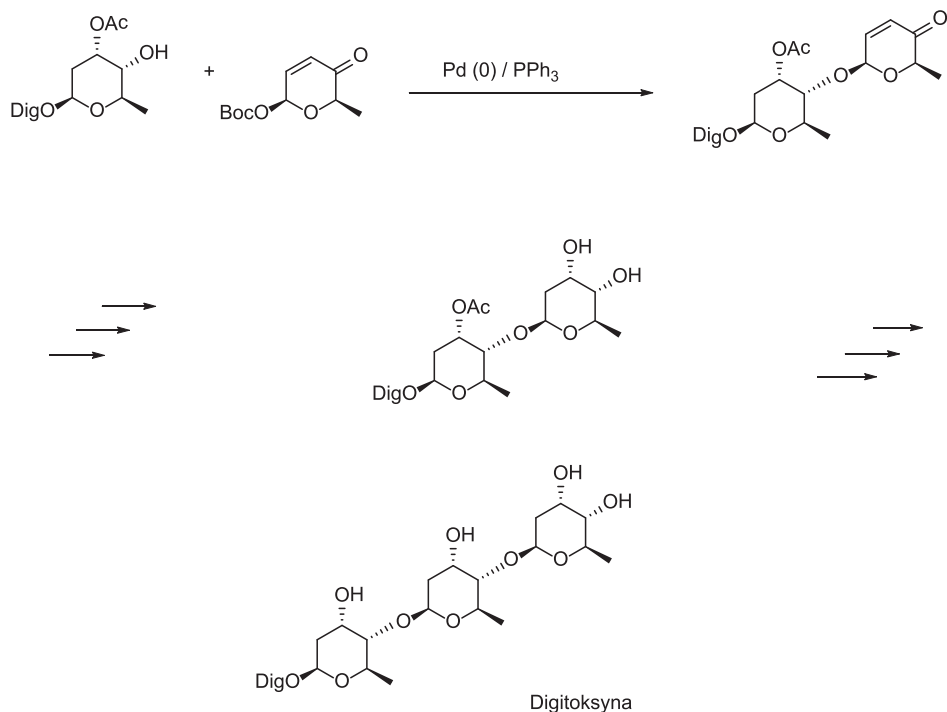
Schemat 2. Synteza glikozydów digitoksozy z acetylfuranu

Scheme 2. Synthesis of D-digitoxose glycoside from acetylfuran

5. PERSPEKTYWY RESYNTAZY I GLIKORANDOMIZACJI CG

Znany około 400 naturalnych glikozydów nasercowych, których odrębność od innych saponin roślinnych polega na charakterystycznym, laktonowym podstawniku. Mimo, że tylko niewielka część tego zbioru związków naturalnych została dotychczas szczegółowo scharakteryzowana pod względem farmakologicznym, zachodzi uzasadnione przypuszczenie, że zarówno dla wskazań kardiologicznych, jak i dla nowych zastosowań terapeutycznych, na przykład w onkologii, konieczne będą liczne modyfikacje budowy i funkcji struktur kanonicznych, w dążeniu do optymalizacji działań farmakodynamicznych a zwłaszcza właściwości farmakokinetycznych,

zgodnie z założeniami chemii i bioinformatyki medycznej. Podobnie jak w innych grupach metabolitów wtórnych o charakterze glikozydowym, takich jak antybiotyki, polifenole, flawonoidy czy lignany, pierwszy etap eksploracyjnych modyfikacji CG metodami chemicznymi powinien mieć charakter przemiany sekwencyjnej deglikozylacji – reglikozylacji, której celem jest zmiana właściwości fizykochemicznych i biologicznych natywnego metabolitu przez wymianę glikonu na jednostkę o zaplanowanych cechach. W odróżnieniu od glikozylacji biologicznych, które stanowią powszechną i podstawową funkcję biochemii komórki, realizowaną przez setki wyspecjalizowanych enzymów (np. glikozylotransferaz), realizacja koniugacji chemicznej cukrów z wielofunkcyjnymi akceptorami przy pomocy metod laboratoryjnych, mimo wielu dziesiątek lat doskonalenia metod aktywacji grupy anomerycznej, oraz regio i stereoselektywności jej sprzęgania, pozostaje w licznych przypadkach procesem o problematycznej skuteczności [56]. Na przykład w klasycznej chemii cukrów, dramatyczny przypadek trudności w kontrolowaniu stereoselektywności reakcji glikozydowania stanowiło użycie syntonów 2-deoksypiranozylowych, takich jak reszty digitoksozy, które są pozbawione elementów strukturalnych pełnych heksosów (np. podstawników estrowych w poz. 2 piranozy), które stabilizują określoną topologię stanu przejściowego reakcji glikozydowania [57, 58]. Ilustracją tego stanu rzeczy jest historia syntez digitoksyny, zapoczątkowana przez K. Wiesnera w latach 60. ubiegłego wieku. Oba podejścia: osobne przygotowanie syntonu trisacharydowego i kolejne glikozydowania odczynnikami monosacharydowym, przeprowadzane przy użyciu klasycznej procedury Koenigsa-Knorra były żmudne ze względu na konieczność zabezpieczeń, nieselektywne względem centrum anomerycznego i niewydajne [59]. Nowoczesne podejście do tego samego celu syntetycznego wykorzystuje z powodzeniem reagenty pochodzące z totalnej syntezy, zaprezentowane na poprzednim schemacie. Monodigitoksozyd digitoksygeniny, selektywnie zabezpieczony w pozycji C-3, poddaje się katalitycznej glikozylacji anomerycznym węglanem heks-2-en-4-ulozy, która w sekwencji znanych transformacji zostaje przekształcona w kolejną jednostkę D-digitoksozy. Kluczowe etapy otrzymywania docelowego trisacharydu digitoksygeniny, według O'Dohertego [60] przedstawiono poniżej. Jest oczywiste, że podejście to umożliwia także radykalne modyfikacje strukturalne glikonu, łącznie z krotnością reszt składających się na łańcuch oligosacharydowy.



Schemat 3. Synteza digitoksyny (Dig oznacza digitoksygeninę)

Scheme 3. Synthesis of digitoxin (Dig stands for digitoxigenin)

Rozwój beta-selektywnych metod glikozylacji w serii 2-deoksy piranoz, tak istotny dla chemii glikozyłowanych związków naturalnych, zasługuje na specjalną uwagę gdyż ilustruje zarówno szeroki rozwój chemii nienasyconych cukrów [61] jak i ogromne postępy katalizy związkami metali przejściowych [62]. Dobrze znana transformacja glikali do heks-2-enozydów, zwana przegrupowaniem Ferriera [63 R] jest na ogół alfa-selektywną glikozylacją ale już wymiana ligandów anomerycznych katalizowana kompleksami palladu ma najczęściej charakter beta-preferencyjny, co szczególnie przekonująco zademonstrowano na estrach anomerycznych heks-2-en-4-uloz. Także katalizowane palladem reakcje dekarboksylacji 4-O-węglanów przebiegające z migracją 4 ----> 1 reszty alkoksylowej, stanowią przykład wysoce stereo selektywnej glikozydacji beta [64].

Ciekawą formą przewycięzenia tradycyjnych trudności technicznych związanych z chemiczną glikozylacją jest metoda glikorandomizacji zaproponowana przez Thorsena. Pomysł polega na uzyskaniu pochodnych wybranych aglikonów, które zawierają w swej strukturze ugrupowanie alkoksyaminowe. Takie związki są zdolne do reakcji w łagodnych warunkach z hemiacetalami, włączając w to niezabezpieczone cukry redukujące, co stanowi prostą drogę do zróżnicowanych strukturalnie zbiorów pochodnych *N*-glikozyłowych, nadających się do bezpośredniego testowania aktywności biologicznej [65, 66]. Innym sposobem łączenia aglikonów

i glikonów CG, zapewniającym kombinatoryczne możliwości tworzenia bibliotek nowych związków jest popularna metoda ligacji chemicznej przez dipolarną cykloaddycję syntonów: acetylenowego i azydkowego, znana pod opisowym określeniem „click chemistry” [67]. Należy też przypomnieć, że aglikony CG od dawna znajdowały zastosowanie w inżynierii genetycznej do znakowania wybranych fragmentów kwasów nukleinowych, które mogą być po wykonaniu zamierzonych transformacji rozpoznane przez specyficzne przeciwciała, które w przypadku digoksygeniny i digitoksygeniny są dosyć łatwo dostępne [6].

UWAGI KOŃCOWE

Ewolucja wyposażyła szereg roślin, i niektóre gatunki płazów, w zdolność biosyntezy ochronnych metabolitów wtórnych z grupy steroidów – silnych toksyn o charakterystycznych cechach strukturalnych (CG), kompatybilnych z biosyntezą endogennych steroli i ich pochodnych saponinowych [5, 9]. Niezależnie od allelopatycznych relacji międzygatunkowych i środowiskowych (pomiędzy roślinami wytwarzającymi CG i roślinożercami), związki te odgrywają szczególną rolę w medycynie jako inhibitory aktywności powszechnie obecnego w komórkach enzymu transbłonowego – pompy sodowej, co ma zastosowanie w leczeniu niewydolności serca i innych niedomaganiach układu krążenia. Leki pochodzące od glikozydów naparstnicy, mające ponad 200-letnią tradycję zastosowań medycznych, są obecnie przedmiotem podwójnej transformacji: rozpoznano ich funkcje hormonalne i regulacyjne, co uzasadnia traktowanie ich jako związki wiodące dla nowych leków w innych obszarach terapeutycznych, szczególnie w onkologii. Taka zmiana wskazań terapeutycznych dla znanych leków (drug repositioning) jest jedną z wiodących strategii współczesnego przemysłu farmaceutycznego [68], co sygnalizuje nowe otwarcia w dziedzinie surowców dla tej grupy związków. Źródła naturalne CG są dość liczne, lecz mało wydajne a perspektywy pozyskiwania konkretnych kardenolidów lub bufadienolidów metodami biotechnologicznymi wydają się ciągle dość odległe. Natomiast współczesne metody syntezy chemicznej oferują liczne możliwości selektywnego pozyskiwania zarówno wybranych metabolitów z tej grupy jak i syntezy ich mimetyków zaprojektowanych de novo z wykorzystaniem uprzednio zgromadzonej wiedzy biochemoinformatycznej.

PODZIĘKOWANIE

Niniejszy artykuł przygotowano w znacznej części z wykorzystaniem środków pochodzących z Funduszu Działalności Statutowej Instytutu Farmaceutycznego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W. Sneader, *Drug discovery. A history*, J. Wiley & Sons Ltd., Chichester 2005.
- [2] J.K. Aronson, *An account of the Foxglove and its medical uses 1785–1985*, Oxford Press, Oxford 1986 (książka ta zawiera reprint oryginalnego dzieła Williama Witheringa “An Account of the Foxglove and Some of its Medical Uses” z 1785 roku)
- [3] R.P. Walton, *The cardiac glycosides*, [w:] *Pharmacology in medicine*, V.A. Drill (Red.), McGraw-Hill Book Co., New York 1958.
- [4] H.-P. Albrecht, *Mittel bei Herzinsuffizienz: Herzglycoside*, [w:] *Ullmanns Encyclopadie der technischen Chemie*, Tom 12, Verlag Chemie, Weinheim 1976, str. 617.
- [5] D. Deepak, S. Srivastava, N.K. Kahare, A. Kahare, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, 1996, **69**, 71.
- [6] *Cardiac Glycosides: Part I: Experimental Pharmacology*, K. Greeff (Red.), Springer-Verlag, Berlin 1981.
- [7] *Cardiac Glycosides: Part II: Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology*, K. Greeff (Red.), Springer-Verlag, Berlin 1981.
- [8] T. Akera, T.M. Brody, *The pharmacology of the cardiac glycosides*, [w:] *Physiology and pathophysiology of the heart*, N. Sperlakis (Red.), 2nd Ed., Kluwer Academic Publ., Dordrecht 1989.
- [9] P.J. Hauptman, R.A. Kelly, *Circulation*, 1999, **99**, 1265.
- [10] A. Messerschmidt, *Cryst. Struct. Commun.*, 1980, **9**, 1185.
- [11] K. Go, G. Kartha, J.P. Chen, *Acta Cryst. B*, 1980, **36**, 1811.
- [12] K. Go, G. Kartha, *Cryst. Struct. Commun.*, 1981, **10**, 1329.
- [13] W. Kabsch, *Acta Crystallogr D*, 2010, **66**, 125.
- [14] *The sodium pump: structure, mechanism, hormonal control and the role in disease*, E. Bamberg, W. Schoner (Red.), Springer, New York 1994.
- [15] J.C. Skou, M. Esmann, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1992, **24**, 249.
- [16] M. Laursen, J.L. Gregersen, L. Yatime, P. Nissen, N.U. Fedosova, *PNAS*, 2015, **112**, 1755.
- [17] L. Yaime, M. Laursen, J. Preben Morth, M. Esmann, P. Nissen, N.U. Fedosova, *J. Struct. Biol.*, 2011, **174**, 296.
- [18] J.C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **23**, 394.
- [19] H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius, C. Toyoshima, *PNAS (Proc Natl. Acad Sci. USA)*, 2009, **106**, 13742.
- [20] A. Katz, Y. Lifshitz, E. Bab-Dinitz, E. Kapri-Pardes, R. Goldshleger, D.M. Tal, S.D.J. Karlsh, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 19582.
- [21] C. Hauck, T. Potter, M. Bartz, T. Wittwer, T. Wahlers, U. Mehlhorn, G. Scheiner-Bobis, A.A. McDonough, W. Bloch, R.H.G. Schwinger, J. Müller-Ehmsen, *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, **662**, 7.
- [22] W. Schoner, G. Scheiner-Bobis, *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 2007, **7**, 173.
- [23] C. Toyoshima, R. Kanai, F. Cornelius, *Structure*, 2011, **19**, 1732.
- [24] K. Geering, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2008, **17**, 526.
- [25] W. Schoner, *Eur. J. Bioch.*, 2002, **269**, 2440.
- [26] B. Stenkvist, *Anti-Cancer Drugs*, 2001, **12**, 635.
- [27] W. Schoner, G. Scheiner-Bobis, *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 2007, **7**, 173.
- [28] M. Nesher, U. Shpolansky, H. Rosen, D. Lichstein, *Life Sci.*, 2007, **80**, 2093.
- [29] A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro, *Nature Rev. Nephrol.*, 2008, **4**, 378.
- [30] T. Mijatovic, E. Van Quaquebeke, B. Delest, O. Debeir, F. Darro, R. Kiss, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1776**, 32.
- [31] H.-Y.L. Wang, G.A. O’Doherty, *Expert Opinion Therap. Patents*, 2012, **22**, 587.
- [32] K. Bielawski, K. Winnicka, A. Bielawska, *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, **29**, 1493.
- [33] M. López-Lázaro, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2007, **11**, 1043.

- [34] H.A. Elbaz, T.A. Stueckle, W. Tse, Y. Rojanasakul, C. Dinu, *Experimental Hematology and Oncology*, 2012, **1**, 4.
- [35] M. Slingerland, C. Cerella, H.J. Guchelaar, M. Diederich, H. Gelderblom, *Investigational New Drugs*, 2013, **31**, 1087.
- [36] A.A. Agrawal, G. Petschenka, R.A. Bingham, M.G. Weber, S. Rasmann, *New Phytologist*, 2012, **194**, 28.
- [37] P.M. Dewick, *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*, J. Wiley & Sons Ltd., Chichester 2002.
- [38] Al. Jaseem, M. Khan, A. Taha, T. Tiemann, *Medit. J. Chem.*, 2014, **3**, 796.
- [39] S. Sterkowicz, *T. Reichstein, życie i działalność naukowa*, Włocławskie Towarzystwo Naukowe, Włocławek 1995.
- [40] G. Gryniewicz, B.A. Wolucka, *Przemysł Chem.*, 2009, **88**, 826.
- [41] R.E. Marker, E. Rohrmann, *JACS*, 1939, **61**, 3592.
- [42] R.E. Marker, D.L. Turner, Ulshafer, *JACS*, 1940, **62**, 2542.
- [43] Y.L. Zhu, W. Huang, J.R. Ni, H. Li, *Appl. Microbiol. Technol.*, 2010, **85**, 1409.
- [44] K. Patel, M. Gadewar, V. Tahilyani, D.K. Patel, *Nat. Prod. Bioprospect.*, 2012, **2**, 46.
- [45] C. Djerassi, *Steroids*, 1992, **57**, 631.
- [46] B. Asbell, *The pill: a biography of the drug that changed the World*, Random House, New York 1995.
- [47] G. Stork, F. West, Y.H. Lee, R.C.A. Isaacs, S. Manabe, *JACS*, 1996, **118**, 10660.
- [48] K. Mukai D. Urabe, S. Kasuya, N. Aoki, M. Inoue, *Angew Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 5300.
- [49] K. Mukai, S. Kasuya, Y. Nakagawa, D. Urabe, M. Inoue, *Chem Sci.*, 2015, **6**, 3383.
- [50] B. Harjo, C. Wibowo, N.M. Ng, *Chem Eng Res & Design*, 2004, **82**, 1010.
- [51] B. Heasley, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 3092.
- [52] O. Achmatowicz, P. Bukowski, B. Szechner, Z. Zwierzchowska, A. Zamojski, *Tetrahedron*, 1971, **27**, 1973.
- [53] A.Z. Aljahdali, P. Shi, Y. Zhong, G.A. O'Doherty, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2013, **69**, 55.
- [54] A.M. Gomez, F. Lobo, S. Miranda, J. Cristobal Lopez, *Molecules*, 2015, **20**, 8357.
- [55] A. Borovika, P. Nagorny, *J. Carbohydr. Chem.*, 2012, **31**, 255.
- [56] V. Dembitsky, *Chem & Biodivers.*, 2004, **1**, 673.
- [57] C.H. Marzabadi, R.W. Frank, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 8385.
- [57] D. Hou, T.L. Lowary, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 1911.
- [58] *The organic chemistry of sugars*, D.E. Levy, P. Fugedi (Red.), CRC Taylor & Francis, Boca Raton 2006.
- [59] K. Wiesner, T.Y.R. Tsai, H. Jin., *Helv. Chim. Acta*, 1985, **68**, 300.
- [60] M. Zhou, G.A. O'Doherty, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2485.
- [61] W. Priebe, I. Fokt, G. Gryniewicz, [w:] *Glycoscience, Chemistry and Chemical Biology*, B.O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem (Red.), Springer Verlag, Berlin 2008.
- [62] M.J. McKay, H.M. Nguyen, *ACS Catalysis*, 2012, **2**, 1563.
- [63] R.J. Ferrier, O.A. Zubkov, *Org React.*, 2003, **62**, 569.
- [64] S. Xiang, Z. Lu, J. He, K.L. MaiHoang, J. Zeng, X.-W. Liu, *Chem. Eur J.*, 2013, **19**, 14047.
- [65] J.M. Langenhan, N.R. Peters, I.A. Guzei, F.M. Hoffmann, J.S. Thorson, *PNAS* 2005, **102**, 12305.
- [66] J.M. Langenhan, J.S. Thorson, *Curr. Org. Synth.*, 2005, **2**, 59.
- [67] *Click chemistry in glycoscience: new developments and strategies*, Z.J. Witzczak, R. Bielski (Red.), J. Wiley & Sons, Hoboken, NJ 2013.
- [68] J.S. Shim, J.O. Liu, *Int. J. Biol. Sci.*, 2014, **10**, 654.

