

УДК 578.233.33+578.233.36

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ СИНТЕЗА ГЛИЦИВИРА И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ В ХОДЕ СИНТЕЗА ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ ENV-ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1

© А.А. Фандо^{1*}, В.В. Фоменко², Н.Б. Рудомётова¹, Н.И. Комарова², Л.И. Карпенко¹,
Н.Ф. Салахутдинов²

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559 (Россия), e-mail: fando_aa@vector.nsc.ru

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, пр. Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090 (Россия)

Несмотря на более чем 40-летнюю историю эпидемии, ВИЧ-инфекция все еще остается глобальной угрозой. Несмотря на достигнутые успехи антиретровирусной терапии (АРТ), не удается остановить распространение ВИЧ. Одна из главных причин связана с тем, что распространение препаратов для лечения ВИЧ-инфекции сопровождается формированием устойчивости вируса и необходимостью создания более эффективных препаратов. Исследователи постоянно ведут активный поиск новых лекарственных агентов. В данной работе были апробированы новые модифицированные методики синтеза глицивира, включающие изменение времени выдержки реакционной смеси, варьирование количества исходных реагентов, добавление катализаторов, замена растворителя, замена конденсирующего агента. Было получено десять вариантов глицивира, для каждого из которых с помощью МТТ-теста определена 50% цитотоксическая концентрация в отношении клеточной линии TZM-bl и противовирусная активность с использованием env-псевдовирuсов ВИЧ-1. Наибольшей активностью против env-псевдовирuсов ВИЧ-1 обладал образец **10**, при синтезе которого была использована полная замена пентахлорида фосфора и пиридина на более доступные и менее токсичные метилхлороформат и триэтиламин в среде хлороформа. Эти изменения, внесенные в оригинальную методику синтеза глицивира, позволяют получать препарат, наиболее приближенный по биологической активности к глицивиру, но при этом замечать в ходе синтеза высокотоксичные реагенты на менее токсичные и дешевые.

Ключевые слова: глицивир, env-псевдовирuсы ВИЧ-1, 50%-ная ингибирующая концентрация.

Сокращения: ЮНЭЙДС – Объединенная программа Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИД, ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека первого типа, СПИД – синдром приобретенного иммунного дефицита, МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, CC_{50} – 50%-ная цитотоксическая концентрация, IC_{50} – 50%-ная ингибирующая концентрация, SI – индекс селективности, ENF – энфувиргид.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Введение

Согласно данным ЮНЭЙДС, в настоящее время 38.4 млн человек в мире инфицированы вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1). По темпам заболеваемости ВИЧ-инфекцией Российская

Фандо Анастасия Алексеевна – стажер-исследователь, e-mail: nastyafando@gmail.com, fando_aa@vector.nsc.ru
Фоменко Владислав Викторович – кандидат химических наук, научный сотрудник, e-mail: fomenko@nioch.nsc.ru
Рудомётова Надежда Борисовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru

Окончание на С. 388.

Федерация занимает лидирующие места среди стран Европы и Средней Азии. Применяемые антиретровирусные препараты позволяют продлить и улучшить социально-активную жизнь людей с ВИЧ-положительным статусом, а также остановить переход заболевания в стадию СПИД. Длительный инкубационный период и разная скорость

* Автор, с которым следует вести переписку.

развития инфекционного процесса в организме, высокая частота генетических изменений в процессе репликации ВИЧ и развивающаяся при этом устойчивость (резистентность) к используемым препаратам ставят вопрос по поиску и разработке новых эффективных антиретровирусных препаратов [1–3].

В последние несколько лет все чаще исследователи обращают внимание на возможность создания лекарственных средств на основе химических соединений, входящих в состав растений [4–10]. Привлекательным объектом для дизайна новых противовирусных агентов является глицирризиновая кислота (ГК) (рис. 1). ГК представляет собой основной тритерпеновый гликозид корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и уральской (*Gl. Uralensis* Fisher). В многочисленных экспериментах была показана эффективность ГК в отношении вирусов герпеса человека ВГЧ-6 и ВГЧ-7, цитомегаловируса человека и вирусов гепатита А, В и С [11]. Также известно, что ГК проявляет ингибирующее действие *in vitro* в отношении ДНК- и РНК-вирусов, включая ВИЧ-1 [12–15].

Производные ГК (рис. 1) так же, как и сама кислота, обладают высокой биологической активностью. В медицинской практике нашла применение моноаммониевая соль глицирризиновой кислоты, торговое название глицирам. Этот препарат применяется в качестве противовоспалительного и противоаллергического средства, а также для лечения бронхиальной астмы у детей и кожных воспалительных заболеваний [16].

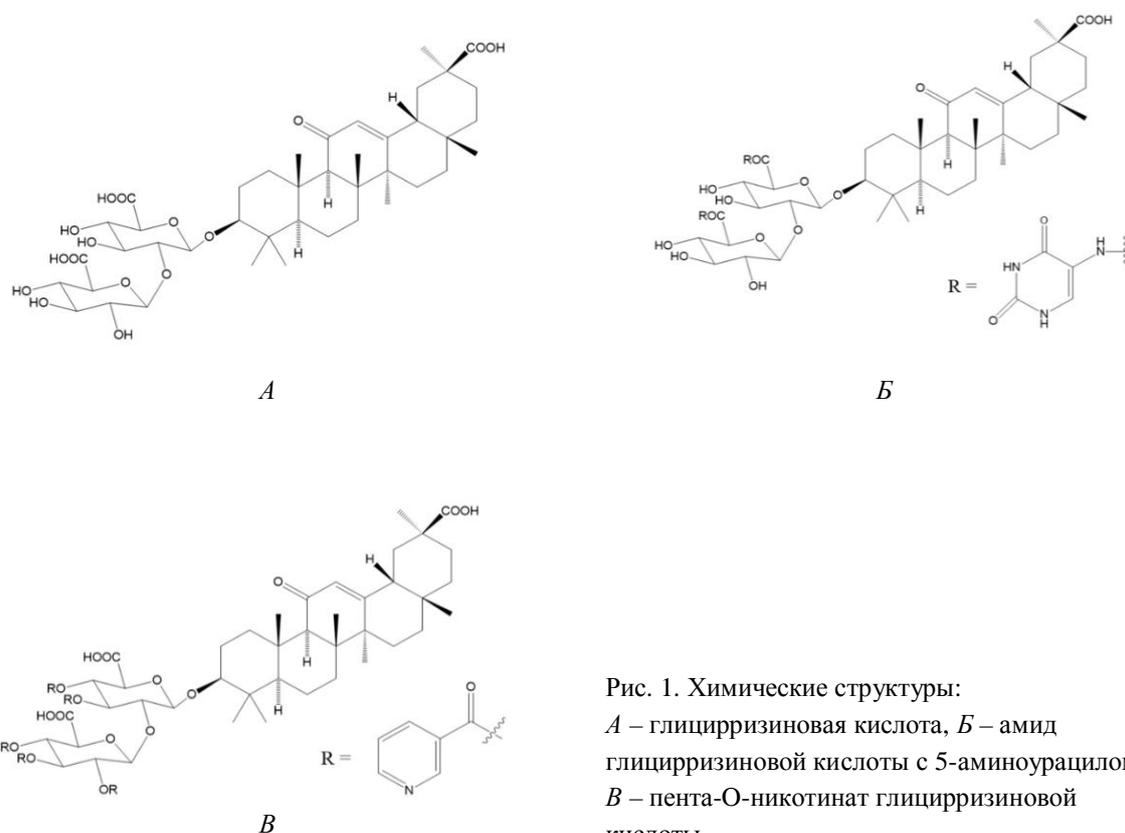


Рис. 1. Химические структуры:
 А – глицирризиновая кислота, Б – амид глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом,
 В – пента-О-никотинат глицирризиновой кислоты

Исследования производных ГК по отношению к ВИЧ ведутся давно. Была показана эффективность амида глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом на модели первично инфицированных ВИЧ-1 лимфоидных клетках МТ-4. Препарат продемонстрировал выраженную анти-ВИЧ-активность, превосходящую противовирусный эффект от глицирризиновой кислоты, а также показал почти в 540 раз меньшую токсичность, чем азидотимидин [17]. Еще одним важным производным ГК является ее пента-О-никотинат, который стал прототипом высокоэффективных ингибиторов репродукции ВИЧ ди- и/или триникотинаты глицирризиновой кислоты. Эффективность пента-О-никотината и ди- и/или триникотинатов ГК была показана на первично инфицированных ВИЧ-1 лимфоидных клетках МТ-4, а также в отношении AZT-резистентного штамма ВИЧ-1 [18].

Комарова Нина Ивановна – ведущий инженер,
 e-mail: komar@nioch.nsc.ru

Карпенко Лариса Ивановна – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин,
 e-mail: lkarpenko@ngs.ru, karpenko@vector.nsc.ru

Салахутдинов Нариман Фаридович – доктор химических наук, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией,
 e-mail: anvar@nioch.nsc.ru

В лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН им. Н.Н. Ворожцова был получен препарат глицивир, являющийся смесью с различным соотношением моно-, ди-, три- и тетраникотинатов глицирризиновой кислоты с преобладанием триникотинатов глицирризиновой кислоты, который эффективно ингибирует проникновение *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 в клетки-мишени. Однако его противовирусные свойства ниже, чем у коммерческого антиретровирусного препарата маравирок (из класса антагонистов рецепторов CCR5), применяемого в клинической практике. Существовавшая методика синтеза глицивира требовала применения токсичных и дорогих реагентов [19].

Цель данной работы – апробация ряда модификаций методики синтеза глицивира, которые были направлены на снижение экономических затрат, использование менее токсичных компонентов в ходе синтеза, а также проверка противовирусной активности полученных препаратов в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1.

Экспериментальная часть

Синтез исследуемых препаратов. Приведена базовая методика получения глицивира [19], в которую вносили изменения. Модифицированные методики, описанные в разделе Результаты, в дальнейшем использовали для синтеза.

Двугорлую колбу емкостью 100 мл, снабженную эффективной магнитной мешалкой, помещали в глицериновую баню, снабженную термометром. В колбу добавляли пиридин (35 мл), затем 5 г никотиновой кислоты и реакционную смесь нагревали до 40–45 °С (температура бани) при постоянном перемешивании. Затем к полученной суспензии при интенсивном перемешивании быстро добавляли пентахлорид фосфора (2.8 г) (для уменьшения обводнения). Далее смесь нагревали до 60 °С и перемешивали при этой температуре в течение 2 ч (примерно через 30–40 мин цвет реакционной смеси изменялся со светлого на темно-коричневый). Затем колбу с реакционной смесью помещали на ледяную баню и перемешивали до ~10–15 °С, при перемешивании добавляли глицирризиновую кислоту (1.5 г). Колбу с реакционной смесью помещали в баню с глицерином, нагревали до 55 °С при постоянном перемешивании и выдерживали при этой температуре 3 ч. Поскольку при охлаждении образовывалось значительное количество осадка, необходимо использовать магнитную мешалку и магнит, обеспечивающие достаточный крутящий момент (что достигается использованием редкоземельного магнитного мешалника). При нагревании значительная часть осадка растворялась. По окончании реакции колбу вынимали из бани и давали остыть до ~30–40 °С. Затем суспензию выливали в стакан емкостью 150 мл и добавляли ~15 мл колотого льда, приготовленного из дистиллированной воды; дистиллированную воду использовали для переноса осадка, оставшегося на стенках колбы. Содержимое стакана перемешивали и добавляли концентрированную соляную кислоту, разведенную равным объемом холодной воды (~60 мл разбавленной кислоты на стакан) до достижения слабокислого значения рН (~6). Смесью оставляли на ночь (~12 ч) для полного осаждения и отфильтровывали светло-коричневый осадок. Этот осадок неоднократно промывали дистиллированной водой (5–15 мл) и тщательно сушили на фильтре. В процессе сушки осадка образовывались крупные конгломераты, которые для ускорения высушивания приходилось измельчать. Высушенный осадок (~1.8 г) растворяли в смеси 11 мл хлороформа и 2.2 мл метанола (хлороформ : метанол = 5 : 1 по объему). Процесс растворения был медленным и занимал 1–2 ч при интенсивном перемешивании. Растворенный раствор фильтровали, а оставшийся осадок отбрасывали после дополнительной промывки 1 мл смеси хлороформа и метанола (как указано выше). К отфильтрованному раствору добавляли диэтиловый эфир (12 мл), вызывая интенсивное осаждение. Смесью перемешивали и оставляли на 1 ч для полного образования осадка. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали 1.5 мл диэтилового эфира и сушили на фильтре. Выход продукта составил 1.630 г.

Элементный анализ полученного препарата: С 61.42; Н 6.09; N 3.96. Расчетные элементные составы: 1. никотиновая кислота: С 58.54; Н 4.09; N 11.38; 2. глицирризиновая кислота С 61.30; Н 7.59; 3. моникотинат: С 62.12; Н 7.06; N 1.51; 4. диникотинат: С 62.78; Н 6.63; N 2.71; 5. триникотинат: С 63.31; Н 6.29; N 3.69; тетраникотинат: С 63.76; Н 6.00; N 4.51. ЯМР ¹H, м.д.: 0.81, 1.11, 1.17 и 1.37 метильные группы в остатке глицирретовой кислоты, широкие сигналы при 7.5, 8.4, 8.7 и 9.1 протонах ароматического ядра никотиновой кислоты. ЯМР ¹³C, м.д.: 16.03, 18.47, 23.17, 28.05 метильные группы в остатке глицирретовой кислоты, 163.95, 127.01, 151.93, 149.83, 123.70, 137.30 остаток никотиновой кислоты.

Определение цитотоксичности синтезированных препаратов методом МТТ-теста. МТТ-тест проводили по методике, описанной в работе [20]. Концентрацию, вызывающую 50% гибель клеток (CC_{50}), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.

Наработка env-псевдовирuсов ВИЧ-1. Для наработки env-псевдовирuсов ВИЧ-1 была проведена трансфекция культуры клеток НЕК293 плазмидой pEnv (pSF162.LS) совместно с backbone плазмидой pSG3Δenv (дефектной по гену env) с использованием липофектамина 3000 (Lipofectamin 3000, Invitrogen) в формате 6-ти планшета в соответствии с протоколом производителя. Через 48 ч после трансфекции культуральную среду, содержащую псевдовирuсные частицы, центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об./мин для удаления клеточного дебриса, и фильтровали через 0.45 мкм фильтр. Затем делали аликвоты по 1 мл и хранили при -80°C . После наработки env-псевдовирuсов ВИЧ-1 определяли их функциональную активность на культуре клеток TZM-bl, по методике, описанной в работе [21].

Оценка ингибирующей активности синтезированных препаратов с использованием env-псевдовирuсов ВИЧ-1. Оценку ингибирующей активности тестируемых препаратов проводили в 96-луночных культуральных планшетах по методике, описанной в [22, 23]. Кратко: в ростовой среде DMEM готовили серийные 2-кратные разведения образцов тестируемых препаратов, затем вносили по 50 мкл env-псевдовирuса в каждую лунку и инкубировали в течение 30–40 мин при температуре 37°C и 5% CO_2 . Затем вносили по 50 мкл трипсинизированной суспензии клеток TZM-bl в количестве 1×10^6 кл/мл. Планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO_2 . Через 48 ч проводили учет сигнала люминесценции, как описано в работе [21]. Процент нейтрализации каждого образца вычисляли как отношение между значениями RLU тестовых лунок (тестируемый образец+псевдовирuс+клетки) и контролем вируса (псевдовирuс+клетки). Статистическую обработку данных и вычисление IC_{50} определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.

Обсуждение результатов

Ранее в работе [19] был описан синтез препарата – глицивира, который является многокомпонентной смесью, содержащей моно-, ди-, три- и тетрациклинаты глицирризиновой кислоты с преобладанием триникотинатов глицирризиновой кислоты. Продемонстрировано, что глицивир ингибирует проникновение env-псевдовирuсов ВИЧ-1 в клетки-мишени. Несмотря на это, нам бы хотелось подобрать условия получения препарата, которые смогли бы увеличить его эффективность и привести к уменьшению значения 50%-ной ингибирующей концентрации. Помимо этого, хотелось бы перейти на использование в синтезе более доступных и дешевых реагентов и растворителей, а также немаловажно упрощение утилизации образующихся в процессе синтеза отходов.

Поэтому был предложен ряд различных поисковых модификаций методики синтеза глицивира, которые были направлены на увеличение эффективности синтеза, снижение экономических затрат и трудоемкости, минимизирование токсичных отходов, возникающих в процессе синтеза. Модификации касались изменения выдержки времени синтеза, добавления катализатора, замены растворителя, соотношения исходных реагентов и другие. Перечень проведенных модификаций оригинальной методики представлен в таблице 1. С использованием каждой из десяти модификаций был осуществлен синтез глицивира и, соответственно, получено десять его вариантов.

Соединения, полученные в ходе синтеза, были проверены на наличие примесей с помощью аналитической ВЭЖХ [24], и представляют собой как исходный глицивир, так и смесь никотинатов глицирризиновой кислоты с различным соотношением моно-, ди-, три- и тетрациклинатов глицирризиновой кислоты с преобладанием триникотинатов глицирризиновой кислоты (рис. 2).

Далее, необходимо было оценить противовирусные свойства каждого полученного препарата, а также сделать выводы о влиянии модификаций синтеза на цитотоксические свойства и биологическую активность новых вариантов глицивира.

Для начала проводили оценку одного из важных показателей для любого терапевтического средства – цитотоксичности при помощи МТТ-теста на клеточной линии TZM-bl. МТТ-тест показал, что диапазон 50%-ной цитотоксической концентрации для исследуемых препаратов составляет 198.08–1000 мкМ в отношении клеточной линии TZM-bl (табл. 2).

Таблица 1. Перечень внесенных изменений в оригинальную методику синтеза глицивира для каждого исследуемого образца

Порядковый номер образца	Изменения, внесенные в методику синтеза глицивира
1	Повышение выдержки реакционной смеси, вместо 3 до 11 ч
2	Повышение выдержки реакционной смеси, вместо 3 до 19 ч
3	Уменьшение выдержки реакционной смеси, вместо 3 2 ч
4	Увеличение добавляемого пентахлорида фосфора на 10%
5	Добавление стадии отгонки пиридина перед гашением реакционной смеси, а также добавление каталитического количества диметилацетамида
6	Изменение метода перекристаллизации целевого продукта. Раствор хлороформа и метанола 5 : 1, соответственно, заменили на раствор хлороформа и этанола 5 : 1 соответственно
7	Уменьшение объема добавляемого пиридина в 2 раза с заменой на хлороформ, а также добавление каталитического количества диметилацетамида
8	Уменьшение объема добавляемого пиридина в 4 раза с заменой на хлороформ, а также добавление каталитического количества диметилацетамида
9	Уменьшение объема добавляемого пиридина в 2 раза, добавление стадии перекристаллизации из раствора хлороформа с метанолом (соотношение 5 : 1, соответственно) раствором этилацетата с гексаном (соотношение 1 : 3 соответственно), добавление стадии отмывки этанолом на фильтре после перекристаллизации
10	Полная замена пентахлорида фосфора и пиридина на эквивалентные количества метилхлороформиата и триэтиламина в среде хлороформа

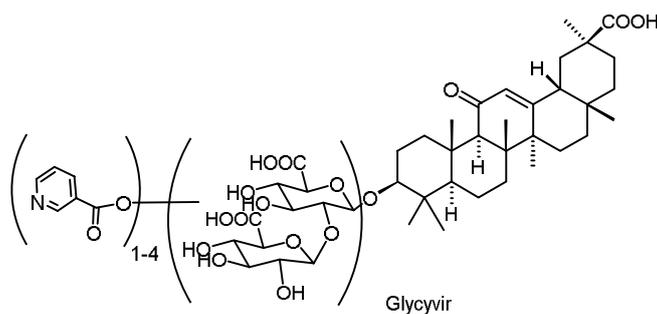


Рис. 2. Структурная формула глицивира

Таблица 2. Цитотоксичность препаратов глицивира отношении клеточной линии TZM-bl

Порядковый номер образца	CC ₅₀ , μМ	Порядковый номер образца	CC ₅₀ , μМ
1	>1000	7	850.42
2	>1000	8	291.89
3	198.08	9	>1000
4	241.49	10	403.6
5	267.28	Глицивир	>1000
6	>1000		

Затем оценивали противовирусную активность препаратов с использованием *env*-псевдовируса ВИЧ-1 субтипа В – SF162.LS [25, 26]. Оценку ингибирующей активности препаратов осуществляли по методике, описанной в [22, 23]. В качестве препарата сравнения был использован клинически одобренный препарат ингибитор проникновения – энфувиртид (ENF) [27–30]. Для каждого препарата был выбран диапазон нетоксичных концентраций, в которых исследовали их противовирусную активность. С помощью построения дозозависимых кривых (рис. 3) были рассчитаны значения 50%-ной ингибирующей концентрации (IC₅₀).

Результаты показали, что значения IC₅₀ для синтезированных препаратов глицивира находятся в интервале от 6.25 и свыше 50 мкМ (табл. 3).

В результате проведенного анализа было показано, что наиболее активным из этой серии образцов оказался препарат под номером **10**, со значениями IC₅₀ и SI равными менее 6.25 мкМ и выше 64.58 соответственно. В сравнении с оригинальными данными по глицивиру [19] именно образец **10** имеет наиболее приближенные характеристики по нейтрализующей активности.

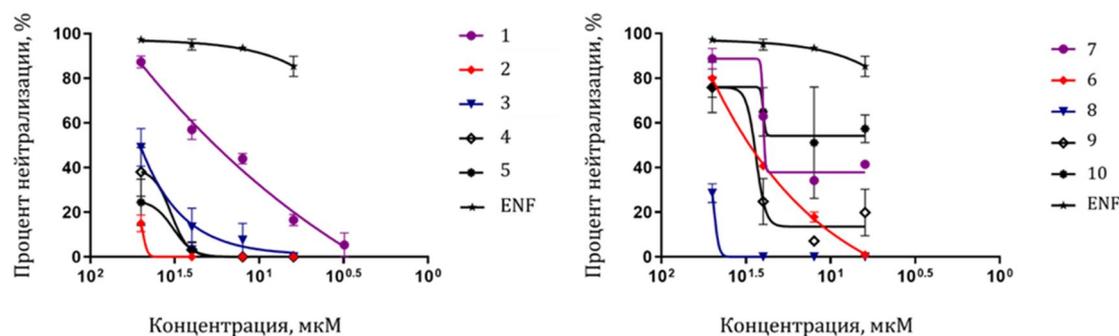


Рис. 3. Кривые нейтрализации препаратов глицирива в отношении *env*-псевдовируса SF162.LS

Таблица 3. Ингибирующая активность препаратов глицирива в отношении *env*-псевдовируса SF162.LS

Порядковый номер образца	SF162.LS		Порядковый номер образца	SF162.LS	
	IC ₅₀ , мкМ	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)		IC ₅₀ , мкМ	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
1	18.3	>54.6	7	30.25	>33.06
2	>50	<20	8	>50	<5.84
3	>50	<4	9	28.21	>35.45
4	>50	<5	10	<6.25	>64.58
5	>50	<5.3	Глицирив	2.88±0.12	347
6	24.54	34.65			

Таким образом, можно сделать вывод о том, что полная замена пентахлорида фосфора и пиридина на метилхлороформиат и триэтиламин в среде хлороформа является лучшей альтернативой оригинальному синтезу глицирива, представленному в работе [19]. Тем не менее в дальнейших работах необходим подбор условий методики синтеза, таких как время выдержки, температура проведения синтеза, реагенты для очистки целевого продукта и т.д., для того чтобы снизить токсичность препарата, не уменьшая его противовирусных свойств.

Заключение

В данной работе были апробированы новые модифицированные методики синтеза глицирива. Было проведено изменение времени выдержки реакционной смеси, варьирование количества исходных реагентов, добавление катализаторов, замена растворителя, замена конденсирующего агента и другие. Среди синтезированных препаратов, полученных с помощью использованных модификаций, наибольшей активностью в отношении *env*-псевдовируса SF162.LS обладал образец **10**, при синтезе которого была использована полная замена пентахлорида фосфора и пиридина на более доступные и менее токсичные – метилхлороформиат и триэтиламин в среде хлороформа. Эти изменения, внесенные в оригинальную методику синтеза глицирива, позволяют получать препарат, наиболее приближенный по биологической активности с глициривом, но при этом заменить в ходе синтеза высокотоксичные реагенты на менее токсичные и дешевые.

Список литературы

1. Tompa D.R., Immanuel A., Srikanth S., Kadhirvel S. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs // International journal of biological macromolecules. 2021. Vol. 172. Pp. 524–541. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.076.
2. Phanuphak N., Gulick R.M. HIV treatment and prevention 2019: current standards of care // Current Opinion in HIV and AIDS. 2020. Vol. 15. Pp. 4–12. DOI: 10.1097/COH.0000000000000588.
3. Arts E.J., Hazuda D.J. HIV-1 antiretroviral drug therapy // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2012. Vol. 2(4). a007161. DOI: 10.1101/cshperspect.a007161.
4. Yarovaya O.I., Salakhutdinov N.F. Mono- and sesquiterpenes as a starting platform for the development of antiviral drugs // Russian Chemical Reviews. 2021. Vol. 90. P. 488. DOI: 10.1070/RCR4969.
5. Musarra-Pizzo M., Pennisi R., Ben-Amor I., Mandalari G., Sciortino M.T. Antiviral activity exerted by natural products against human viruses // Viruses. 2021. Vol. 13. P. 828. DOI: 10.3390/v13050828.

6. Hirabayashi K., Iwata S., Matsumoto H., Mori T., Shibata S., Baba M., Ito M., Shigeta S., Nakashima H., Yamamoto N. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in vitro // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1991. Vol. 39. Pp. 112–115. DOI: 10.1248/cpb.39.112.
7. Ji B., Zhao Y., Yu P., Yang B., Zhou C., Yu Z. LC-ESI-MS/MS method for simultaneous determination of eleven bioactive compounds in rat plasma after oral administration of Ling-Gui-Zhu-Gan Decoction and its application to a pharmacokinetics study // *Talanta*. 2018. Vol. 190. Pp. 450–459. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.08.020.
8. Sokolova A.S., Putilova V.P., Yarovaya O.I., Zybikina A.V., Mordvinova E.D., Zaykovskaya A.V., Shcherbakov D.N., Orshanskaya I.R., Sinegubova E.O., Esaulkova I.L., Borisevich S.S., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Zarubaev V.V., Pyankov O.V. Synthesis and antiviral activity of camphene derivatives against different types of viruses // *Molecules*. 2021. Vol. 26. P. 2235. DOI: 10.3390/molecules26082235.
9. Rex R.S., Nadar M.S., Selvakumar P.M. Phytochemicals as a potential source for antimalaria, antioxidant and wound-healing: a review // *BiorgOrgChem*. 2018. Vol. 2. Pp. 61–70. DOI: 10.15406/mojboc.2018.02.00058.
10. Ghildiyal R., Prakash V., Chaudhary V.K., Gupta V., Gabrani R. Phytochemicals as Antiviral Agents: Recent Updates // *Plant-derived Bioactives*. Springer, Singapore, 2020. Pp. 279–295. DOI: 10.1007/978-981-15-1761-7_12.
11. Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Балтина (мл.) Л.А., Плясунова О.А., Покровский А.Г., Толстиков Г.А. Перспективы создания новых противовирусных препаратов на основе глицирризиновой кислоты и её производных // *Химико-фармацевтический журнал*. 2009. Т. 43. №10. С. 3–12. DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-10-3-12.
12. Ito M., Sato A., Hirabayashi K., Tanabe F., Shigeta S., Baba M., Clercq E.D., Nakashima H., Yamamoto N. Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV) // *Antiviral Research*. 1988. Vol. 10. Pp. 289–298. DOI: 10.1016/0166-3542(88)90047-2.
13. Зарубаев В.В., Аникин В.Б., Смирнов В.С. Противовирусная активность глицерретовой и глицирризиновой кислот // *Инфекция и иммунитет*. 2016. Т. 6. №3. С. 199–206.
14. Кондратенко Р.М., Балтина Л.А., Мустафина С.Р., Васильева Е.В., Помпей Р., Дейдда Д., Плясунова О.А., Покровский А.Г., Толстиков Г.А. Синтез конъюгатов глицирризиновой кислоты с а-D-глюкозаминном и некоторыми гликозиламинами и их противовирусная активность // *Биоорганическая химия*. 2004. Т. 30. №3. С. 308–315.
15. Hoefer G., Baltina L., Michaelis M., Kondratenko R., Baltina L. (Jr.), Tolstikov G.A., Doerr H.W., Cinatl J. (jr.). Antiviral Activity of Glycyrrhizic Acid Derivatives against SARS-Coronavirus // *J. Med. Chem*. 2005. Vol. 48. Pp. 1256–1259. DOI: 10.1021/jm0493008.
16. Патент №2299740 (РФ). Способ получения моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты (глицирама) / Р.М. Кондратенко, Л.А. Балтина, О.В. Столярова, Л.А. Балтина, Л.Р. Михайлова, Т.М. Габбасов, Ф.З. Галин, Г.А. Толстиков. – 2007.
17. Патент №2199547 (РФ). Амид глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом, проявляющий анти-ВИЧ активность / Р.М. Кондратенко, Л.А. Балтина, С.Р. Мустафина, О.А. Плясунова, А.Г. Покровский, Г.А. Толстиков – 2003.
18. Патент №2304145 (РФ). Ди- и триникотинаты глицирризиновой кислоты и ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека / Г.А. Толстиков, Л.А. Балтина, К.П. Волчо, О.А. Плясунова, А.Г. Покровский, Н.Ф. Салахутдинов. – 2007.
19. Fomenko V.V., Rudometova N.B., Yarovaya O.I., Rogachev A.D., Fando A.A., Zaykovskaya A.V., Komarova N.I., Shcherbakov D.N., Pyankov O.V., Pokrovsky A.G., Karpenko L.I., Maksyutov R.A., Salakhutdinov N.F. Synthesis and in vitro study of antiviral activity of glycyrrhizin nicotinate derivatives against HIV-1 pseudoviruses and SARS-CoV-2 viruses // *Molecules*. 2022. Vol. 27. P. 295. DOI: 10.3390/molecules27010295.
20. Ковалева К.С., Яровая О.И., Гатилов Ю.В., Слита А.В., Есаулкова Я.Л., Зарубаев В.В., Рудометова Н.Б., Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н., Салахутдинов Н.Ф. Синтез и противовирусная активность N-гетероциклических производных гидразонов камфоры и фенхона // *Химия гетероциклических соединений*. 2021. Т. 57. № 4. С. 455–461.
21. Revilla A., Delgado E., Christian E.C., Dalrymple J., Vega Y., Carrera C., González-Galeano M., Ocampo A., de Castro R.O., Lezaún M.J., Rodríguez R., Mariño A., Ordóñez P., Cilla G., Cisterna R., Santamaría J.M., Prieto S., Rakhmanova A., Vinogradova A., Ríos M., Pérez-Álvarez L., Nájera R., Montefiori D.C., Seaman M.S., Thomson M.M. Construction and phenotypic characterization of HIV type 1 functional envelope clones of subtypes G and F // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2011. Vol. 27. Pp. 889–901. DOI: 10.1089/aid.2010.0177.
22. Domingo P., de Benito N. Alpha variant SARS-CoV-2 infection: How it all starts // *EBioMedicine*. 2021. Vol. 74. 103703. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103703.
23. Legnani L., Colombo D., Venuti A., Pastori C., Lopalco L., Toma L., Mori M., Grazioso G., Villa S. Diazabicyclo analogues of maraviroc: synthesis, modeling, NMR studies and antiviral activity // *Med. Chem. Commun*. 2017. Vol. 8. Pp. 422–433. DOI: 10.1039/C6MD00575F.
24. Baram G.I., Grachev M.A., Komarova N.I., Perelroyzen M.P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S.V., Kargaltsev V.V., Kuper E.A. Micro-column liquid chromatography with multi-wave-length photometric detection: I. The OB-4 micro-column liquid chromatograph // *Journal of Chromatography A*. 1983. Vol. 264. Pp. 69–90. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95007-1.
25. Ladinsky M.S., Gnanaprasagam P.N., Yang Z., West A.P., Kay M.S., Bjorkman P.J. Electron tomography visualization of HIV-1 fusion with target cells using fusion inhibitors to trap the pre-hairpin intermediate // *Elife*. 2020. Vol. 9. e58411. DOI: 10.7554/eLife.58411.

26. Zaitsev B.N., Taranov O.S., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. An optimized method for counting viral particles using electron microscopy // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019. Vol. 23. Pp. 337–342. DOI: 10.18699/VJ19.498.
27. Dando T.M., Perry C.M. Enfuvirtide // *Drugs*. 2003. Vol. 63. Pp. 2755–2766. DOI: 10.2165/00003495-200363240-00005.
28. Lalezari J.P., Henry K., O'Hearn M., Montaner J.S.G., Piliero P.J., Trottier B., Walmsley S., Cohen C., Kuritzkes D.R., Eron J.J. Jr., Chung J., DeMasi R., Donatacci L., Drobnes C., Delehanty J., Salgo M. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America // *New England Journal of Medicine*. 2003. Vol. 348. Pp. 2175–2185. DOI: 10.1056/NEJMoa035026.
29. Kitchen C.M.R., Nuño M., Kitchen S.G., Krogstad P. Enfuvirtide antiretroviral therapy in HIV-1 infection // *Therapeutics and clinical risk management*. 2008. Vol. 4. Pp. 433–439. DOI: 10.2147/tcrm.s1962.
30. Clercq E.D. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009. Vol. 33. Pp. 307–320. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010.

Поступила в редакцию 25 октября 2023 г.

После переработки 14 ноября 2023 г.

Принята к публикации 15 ноября 2023 г.

Для цитирования: Фандо А.А., Фоменко В.В., Рудометова Н.Б., Комарова Н.И., Карпенко Л.И., Салахутдинов Н.Ф. Модификация методики синтеза глицивира и исследование антивирусной активности полученных в ходе синтеза препаратов в отношении *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1 // *Химия растительного сырья*. 2023. № 4. С. 387–395. DOI: 10.14258/jcprm.20230413841.

Fando A.A.^{1*}, Fomenko V.V.², Rudometova N.B.¹, Komarova N.I.², Karpenko L.I.¹, Salakhutdinov N.F.² SYNTHESIS OF GLYCVIR DERIVATIVES USING MODIFICATION OF SYNTHESIS PROCEDURE STUDYING THEIR ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST *ENV*-PSEUDOVIRUSES HIV-1

¹ FBUN SSC VB “Vector” of Rospotrebnadzor, r.p. Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 (Russia),
e-mail: fando_aa@vector.nsc.ru

² Novosibirsk Institute of Organic Chemistry named after. N.N. Vorozhtsov SB RAS, pr. Akademika Lavrentyeva, 9, Novosibirsk, 630090 (Russia)

HIV infection still remains a global health problem around the world. The fight against infection is carried out both through preventive measures and timely testing for the presence of HIV and the use of antiretroviral therapy (ART) when it is detected. Researchers are constantly actively searching for new medicinal agents. In this work, new modified methods for the synthesis of glycvir were tested, including changing the holding time of the reaction mixture, varying the amount of starting reagents, adding catalysts, replacing the solvent, and replacing the condensing agent. Ten variants of glycvir were obtained, for each of which, using the MTT test, a 50% cytotoxic concentration was determined against the TZM-bl cell line and antiviral activity on the model of HIV-1 *env*-pseudoviruses. Sample **10** had the greatest activity against HIV-1 *env*-pseudoviruses, the synthesis of which involved the complete replacement of phosphorus and pyridine pentachloride with more accessible and less toxic methyl chloroformate and triethylamine in chloroform. These changes made to the original method for the synthesis of glycvir make it possible to obtain a drug that is most similar in biological activity to glycvir, but at the same time replace highly toxic reagents during the synthesis with less toxic and cheaper ones.

Keywords: glycvir, HIV-1, glycerizinic acid trinitocinates, selectivity index, 50% inhibitory concentration.

* Corresponding author.

References

1. Tompa D.R., Immanuel A., Srikanth S., Kadirvel S. *International journal of biological macromolecules*, 2021, vol. 172, pp. 524–541. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.076.
2. Phanuphak N., Gulick R.M. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2020, vol. 15, pp. 4–12. DOI: 10.1097/COH.0000000000000588.
3. Arts E.J., Hazuda D.J. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012, vol. 2(4), a007161. DOI: 10.1101/cshperspect.a007161.
4. Yarovaya O.I., Salakhutdinov N.F. *Russian Chemical Reviews*, 2021, vol. 90, p. 488. DOI: 10.1070/RCR4969.
5. Musarra-Pizzo M., Pennisi R., Ben-Amor I., Mandalari G., Sciortino M.T. *Viruses*, 2021, vol. 13, p. 828. DOI: 10.3390/v13050828.
6. Hirabayashi K., Iwata S., Matsumoto H., Mori T., Shibata S., Baba M., Ito M., Shigeta S., Nakashima H., Yamamoto N. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 1991, vol. 39, pp. 112–115. DOI: 10.1248/cpb.39.112.
7. Ji B., Zhao Y., Yu P., Yang B., Zhou C., Yu Z. *Talanta*, 2018, vol. 190, pp. 450–459. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.08.020.
8. Sokolova A.S., Putilova V.P., Yarovaya O.I., Zybkina A.V., Mordvinova E.D., Zaykovskaya A.V., Shcherbakov D.N., Orshanskaya I.R., Sinegubova E.O., Esaulkova I.L., Borisevich S.S., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Zarubaev V.V., Pyankov O.V. *Molecules*, 2021, vol. 26, p. 2235. DOI: 10.3390/molecules26082235.
9. Rex R.S., Nadar M.S., Selvakumar P.M. *BiorgOrgChem*, 2018, vol. 2, pp. 61–70. DOI: 10.15406/mo-jboc.2018.02.00058.
10. Ghildiyal R., Prakash V., Chaudhary V.K., Gupta V., Gabrani R. *Plant-derived Bioactives*. Springer, Singapore, 2020, pp. 279–295. DOI: 10.1007/978-981-15-1761-7_12.
11. Baltina L.A., Kondratenko R.M., Baltina (ml) L.A., Plvasunova O.A., Pokrovskiy A.G., Tolstikov G.A. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2009, vol. 43, no. 10, pp. 3–12. DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-10-3-12. (in Russ.).
12. Ito M., Sato A., Hirabayashi K., Tanabe F., Shigeta S., Baba M., Clercq E.D., Nakashima H., Yamamoto N. *Antiviral Research*, 1988, vol. 10, pp. 289–298. DOI: 10.1016/0166-3542(88)90047-2.
13. Zarubayev V.V., Anikin V.B., Smirnov V.S. *Infektsiya i immunitet*, 2016, vol. 6, no. 3, pp. 199–206. (in Russ.).
14. Kondratenko P.M., Baltina L.A., Mustafina S.R., Vasil'yeva Ye.V., Pompei R., Deydda D., Plvasunova O.A., Pokrovskiy A.G., Tolstikov G.A. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2004, vol. 30, no. 3, pp. 308–315. (in Russ.).
15. Hoever G., Baltina L., Michaelis M., Kondratenko R., Baltina L. (Jr.), Tolstikov G.A., Doerr H.W., Cinatl J. (jr.). *J. Med. Chem.*, 2005, vol. 48, pp. 1256–1259. DOI: 10.1021/jm0493008.
16. Patent 2299740 (RU). 2007. (in Russ.).
17. Patent 2199547 (RU). 2003. (in Russ.).
18. Patent 2304145 (RU). 2007. (in Russ.).
19. Fomenko V.V., Rudometova N.B., Yarovaya O.I., Rogachev A.D., Fando A.A., Zaykovskaya A.V., Komarova N.I., Shcherbakov D.N., Pyankov O.V., Pokrovsky A.G., Karpenko L.I., Maksyutov R.A., Salakhutdinov N.F. *Molecules*, 2022, vol. 27, p. 295. DOI: 10.3390/molecules27010295.
20. Kovaleva K.S., Yarovaya O.I., Gatilov Yu.V., Slita A.V., Yesaulkova Ya.L., Zarubayev V.V., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., Salakhutdinov N.F. *Khimiya geterotsiklicheskiy sovedineniy*, 2021, vol. 57, no. 4, pp. 455–461. (in Russ.).
21. Revilla A., Delgado E., Christian E.C., Dalrymple J., Vega Y., Carrera C., González-Galeano M., Ocampo A., de Castro R.O., Lezaún M.J., Rodríguez R., Mariño A., Ordóñez P., Cilla G., Cisterna R., Santamaría J.M., Prieto S., Rakhmanova A., Vinogradova A., Ríos M., Pérez-Álvarez L., Nájera R., Montefiori D.C., Seaman M.S., Thomson M.M. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2011, vol. 27, pp. 889–901. DOI: 10.1089/aid.2010.0177.
22. Domingo P., de Benito N. *EBioMedicine*, 2021, vol. 74, 103703. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103703.
23. Legnani L., Colombo D., Venuti A., Pastori C., Lopalco L., Toma L., Mori M., Grazioso G., Villa S. *Med. Chem. Commun.*, 2017, vol. 8, pp. 422–433. DOI: 10.1039/C6MD00575F.
24. Baram G.I., Grachev M.A., Komarova N.I., Perelroyzen M.P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S.V., Kargaltsev V.V., Kuper E.A. *Journal of Chromatography A*, 1983, vol. 264, pp. 69–90. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95007-1.
25. Ladinsky M.S., Gnanapragasam P.N., Yang Z., West A.P., Kay M.S., Bjorkman P.J. *Elife*, 2020, vol. 9, e58411. DOI: 10.7554/eLife.58411.
26. Zaitsev B.N., Taranov O.S., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2019, vol. 23, pp. 337–342. DOI: 10.18699/VJ19.498.
27. Dando T.M., Perry C.M. *Drugs*, 2003, vol. 63, pp. 2755–2766. DOI: 10.2165/00003495-200363240-00005.
28. Lalezari J.P., Henry K., O'Hearn M., Montaner J.S.G., Piliero P.J., Trottier B., Walmsley S., Cohen C., Kuritzkes D.R., Eron J.J. Jr., Chung J., DeMasi R., Donatucci L., Drobnies C., Delehanty J., Salgo M. *New England Journal of Medicine*, 2003, vol. 348, pp. 2175–2185. DOI: 10.1056/NEJMoa035026.
29. Kitchen C.M.R., Nuño M., Kitchen S.G., Krogstad P. *Therapeutics and clinical risk management*, 2008, vol. 4, pp. 433–439. DOI: 10.2147/tcrm.s1962.
30. Clercq E.D. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, vol. 33, pp. 307–320. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010.

Received October 25, 2023

Revised November 14, 2023

Accepted November 15, 2023

For citing: Fando A.A., Fomenko V.V., Rudometova N.B., Komarova N.I., Karpenko L.I., Salakhutdinov N.F. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 4, pp. 387–395. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230413841.

