

*На правах рукописи*

**МАСЛОВА АННА АЛЕКСЕЕВНА**

**КОМБИНИРОВАННЫЕ ДЕПО-ФОРМЫ – ПОДХОД К  
ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИВИРУСНЫХ  
ПРЕПАРАТОВ**

1.5.3. - Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва 2023

Работа выполнена в Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта, Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор химических наук  
**Хандажинская Анастасия Львовна**  
ведущий научный сотрудник Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии им В. А. Энгельгардта РАН

Официальные оппоненты:

доктор химических наук  
**Маслов Михаил Александрович**  
директор Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова  
в составе МИРЭА РГУ  
профессор кафедры ХТБАСиМХ

кандидат химических наук  
**Агапкина Юлия Юрьевна**  
старший научный сотрудник  
кафедры химии природных соединений  
химического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится «18» мая 2023 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного Совета 24.1.081.01 (Д 002.235.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32 и на сайте ИМБ РАН <http://eimb.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук



Анашкина А.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Вирусные инфекции, наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, представляют собой основные угрозы здоровью человечества. ВИЧ-инфекция и ее этиологический агент - вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является одной из таких угроз. В результате постоянной репликации и распространения ВИЧ в организме заражённого человека развивается синдром приобретённого иммунодефицита (СПИД). Это клиническое состояние характеризуется существенным уменьшением количества CD4+ Т-лимфоцитов в организме, развитием оппортунистических инфекций и злокачественных опухолей. Согласно последним данным Всемирной Организации Здравоохранения в мире 38.4 млн. человек проживают с ВИЧ. Несмотря на то, что исследования ВИЧ проводятся уже более тридцати лет, ежегодно миллионам людей ставится диагноз «ВИЧ-инфекция», а больные продолжают умирать от СПИДа.

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции применяется высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ), заключающаяся в одновременном приеме нескольких препаратов, относящихся к разным группам. Типичная комбинация лекарственных средств ВААРТ состоит из двух нуклеозидных или нуклеотидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ (ОТ ВИЧ) и ещё одного препарата, действующего на другие компоненты вируса (в первую очередь протеазу и интегразу). Существующие на данный момент лекарственные препараты имеют серьёзные недостатки, главными из которых являются токсичность, низкая биодоступность, а также быстрое возникновение резистентных штаммов вируса, приводящее к необходимости замены препаратов. Потребность в поиске новых эффективных антивирусных агентов для терапии ВИЧ безусловно сохраняется. Одним из перспективных способов улучшения свойств

лекарственных средств является создание депо-форм, т.е. таких производных, которые, подвергаясь ферментативным или параметаболическим превращениям в организме, высвобождают активное вещество.

Значительную проблему в терапии ВИЧ-инфекции представляют также сопутствующие инфекции. Появление ВИЧ в организме способствует развитию различных коинфекций, чаще всего вызываемыми вирусами из семейства герпесвирусов, например, вируса простого герпеса, цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса ветряной оспы. Эти инфекции у иммунокомпетентных носителей протекают бессимптомно или с минимальной симптоматикой, но в условиях ослабленной иммунной системы способны наносить существенный вред организму. Иммунологический эффект вирусных коинфекций способствует ускорению репликации вируса, генотипической гетерогенности вируса, снижению выживаемости и значительно увеличивает риск передачи ВИЧ. Сочетание коинфекций и ВИЧ-инфекции трудно контролировать посредством имеющихся лекарственных средств. Современные методы терапии герпесвирусов обладают рядом побочных эффектов и не могут быть использованы в течение длительного времени. Таким образом, создание новых нетоксичных препаратов, способных подавлять репликацию ВИЧ и сопутствующих инфекций является актуальным направлением исследований.

### **Цели и задачи исследования**

Целью данной работы являлось создание новых депо-форм аналогов нуклеозидов для улучшения фармакокинетических параметров исходных соединений и эффективного ингибирования вирусных мишеней.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

- осуществить дизайн и разработать методы синтеза новых липофильных депо-форм 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина и оценить эффективность

полученных депо-форм на лабораторных животных путем анализа фармакокинетических параметров

- осуществить дизайн и разработать методы синтеза новых депо-форм двойного действия (гетеродимеров), обладающих активностью против ВИЧ и сопутствующих инфекций
- оценить эффективность полученных депо-форм путем исследования способности высвобождать активные компоненты
- исследовать способность полученных гетеродимеров ингибировать патогены на культурах клеток

### **Научная новизна**

В работе предложены методы синтеза новых липофильных производных 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина (AZT) с различными линкерами. Изучена их стабильность в плазме крови крысы и гидролиз в лимфе крысы. Для одного соединения проведена оценка фармакокинетических параметров в плазме крови кролика.

Осуществлён дизайн и синтез четырёх новых типов гетеродимеров, объединяющих компоненты, обладающие противовирусной активностью в отношении ВИЧ и сопутствующих инфекций. Показана их способность высвобождать активные компоненты и проявлять заявленные свойства.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Осуществлен дизайн и синтез новых типов депо-форм ингибиторов ОТ ВИЧ (27 соединений). Гетеродимеры нуклеозидного ингибитора ОТ ВИЧ и ненуклеозидного ингибитора цитомегаловируса продемонстрировали высокую противовирусную активность и отсутствие цитотоксичности на культурах клеток и коинфицированных тканях, что свидетельствует о перспективности использования этой группы соединений в качестве основы препаратов для терапии ВИЧ и сопутствующих инфекций.

## **Методология и методы исследования**

Работа выполнена с использованием различных методов органического синтеза и современных физико-химических методов анализа соединений. Выделение и очистку продуктов реакций проводили методами колоночной хроматографии и препаративной тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинах с закрепленным слоем силикагеля. Контроль реакций осуществляли методом тонкослойной хроматографии на алюминиевых пластинах с закрепленным слоем силикагеля. Анализ и подтверждение структур соединений выполняли методами  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопии, а также масс-спектрометрии высокого разрешения. Противовирусная активность соединений была исследована в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии Н. Ф. Гамалеи, Федеральном научном центре исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова РАН, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (США), Rega Institute for Medical Research (Бельгия).

## **Положения, выносимые на защиту**

Разработан синтез шести новых липофильных депо-форм AZT. Исследована стабильность полученных соединений в плазме крови крысы; проведена оценка фармакокинетических параметров в плазме крови кролика и лимфе крысы.

Осуществлён дизайн и синтез новых групп депо-форм двойного действия, в частности:

- Семи гетеродимерных соединений, содержащих нуклеозидный ингибитор ОТ ВИЧ (AZT или 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин (ЗТС)) и ненуклеозидный ингибитор репликации ЦМВ, показана их способность высвобождать активные компоненты под действием эстераз и эффективно ингибировать ВИЧ и ЦМВ в клетках и тканях;

- Семи гетеродимерных соединений, содержащих ацикловир и нуклеозидный ингибитор ОТ ВИЧ, и четырёх гетеродимеров, содержащих 5'-нораристеромицин и нуклеозидный ингибитор ОТ ВИЧ, обладающих активностью против ВИЧ и герпесвирусов;
- Трёх гетеродимеров нуклеозидного ингибитора ОТ ВИЧ и нуклеозидного ингибитора вируса Варицелла-Зостер.

Предложен метод синтеза шести 5-замещённых производных уридина, в качестве потенциального анти-ковидного компонента депо-форм двойного действия, и исследована их биологическая активность против SARS-CoV-2.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

В работе использовали современные методы органической химии, биохимии и фармакологии. Работа проведена с использованием реактивов ведущих российских и международных производителей и оборудования, соответствующего международным стандартам. Структура полученных соединений доказана современными физико-химическими методами анализа –  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопией, масс-спектрометрией высокого разрешения и др. Препараты ферментов были получены из коммерческих источников или выделены в гомогенном состоянии по апробированным ранее методикам. Культуры клеток происходили из международных коллекций и были дополнительно проверены на контаминацию микоплазмой. Результаты биохимических экспериментов статистически достоверны.

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в ведущих российских и зарубежных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на международных и российских конференциях: Первая школа для молодых учёных по медицинской химии MedChemSchool 2021 (Новосибирск, Россия, 2021), 26th Young Research Fellows meeting (Париж, Франция, 2019), Symposium on HIV and Emerging Diseases (Марсель, Франция, 2018).

## **Объём и структура диссертации**

Работа написана на 121 странице машинописного текста и включает 23 рисунка, 23 схемы и 4 таблицы; содержит введение, обзор литературы, обсуждение результатов, описание материалов и методов исследования, выводы, список использованной литературы. Библиографический указатель содержит 97 источников.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Несмотря на значительное количество и разнообразие используемых в терапии ВИЧ-инфекции препаратов, разработка новых лекарственных средств по-прежнему остаётся актуальной задачей, прежде всего ввиду возникновения резистентных штаммов вируса и наличия серьёзных недостатков у имеющихся лекарств.

Данная работа состоит из двух частей и посвящена созданию новых типов депо-форм AZT, первого нуклеозидного ингибитора биосинтеза ДНК, катализируемого ОТ ВИЧ. Фармакокинетический профиль AZT, характеризуется резкими перепадами концентрации препарата в крови, что вынуждает принимать высокие дозы препарата, приводящие к выраженным побочным эффектам, и является причиной возникновения резистентных штаммов вируса. Первая часть работы описывает создание липид-содержащих пролекарств AZT для обеспечения пролонгированного действия и направленной доставки препарата в лимфу (известно, что резервуарами ВИЧ являются CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, находящиеся преимущественно в лимфе и лимфоузлах).

Второе направление работы - создание гетеродимеров двойного действия, объединяющих компоненты с активностью против ВИЧ и вирусов из семейства герпеса. Сопутствующие патогены, в первую очередь вирусы семейства герпеса, вносят свой вклад в подавление иммунитета даже после начала антиретровирусной терапии, именно они являются основным фактором, обуславливающим рост смертности и заболеваемости среди ВИЧ-

инфицированных пациентов. На сегодняшний день не существует препаратов, способных одновременно эффективно ингибировать ВИЧ и сопутствующие патогены.

## **1. Синтез липофильных депо-форм**

AZT является первым нуклеозидным ингибитором, одобренным для терапии, и всё ещё активно используется в схемах ВААРТ. Наряду с эффективностью в увеличении выживаемости и снижении прогрессирования заболевания, он обладает рядом существенных недостатков. Значительная часть AZT (60-70%) реагирует в печени с глюкуроновой кислотой, образуя 3'-азидо-3'-дезоксидеокси-5'-О-бета-D-глюкопиранурилозилтимидин, который выводится из организма, не проявив антивирусной активности. Кроме того, только 0,3% AZT переходят в активную трифосфорилированную форму, в связи с чем для поддержания терапевтического уровня препарата возникает необходимость в применении его высоких доз, что приводит к серьёзным токсическим эффектам, таким как анемия, периферическая нейропатия, гранулоцитопения и токсическое действие на костный мозг. Одной из задач данной работы было создание потенциальных депо-форм AZT пролонгированного действия различных типов для повышения эффективности и улучшения фармакокинетических параметров, для этого была выбрана липофильная модификация. Конъюгация активного вещества с жирными кислотами является общепризнанным подходом для достижения различных целей, таких как уменьшение почечного клиренса за счёт связывания с альбумином плазмы, увеличения химической стабильности исходного препарата и, в некоторых случаях, нацеливание препарата на лимфатический транспорт, способствующий доставке препарата к резервуарам ВИЧ.

На начальном этапе работы был осуществлён синтез нескольких липофильных депо-форм AZT. Первый тип представляет собой соединения, в которых один или два остатка AZT присоединены сложноэфирными

связями к себаценовой (C<sub>10</sub>) или субериновой (C<sub>8</sub>) кислотам. Такая модификация существенно повышает гидрофобность молекулы и позволяет предположить транспорт AZT в лимфу и его пролонгированное высвобождение.

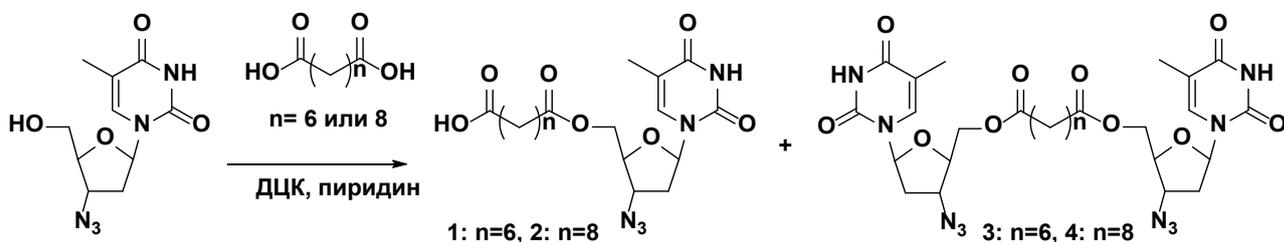


Схема 1. Синтез липофильных депо-форм 1-4.

На первом этапе было осуществлена конъюгация AZT с линкером, представляющим собой жирную кислоту с короткой (C<sub>8</sub>) или средней длиной цепи (C<sub>10</sub>), с помощью конденсирующего агента – дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) (схема 1). Варьирование соотношения реагентов позволило добиться получения преимущественно продуктов моно- или бисприсоединения. Так, в реакции, где AZT, соответствующая кислота и ДЦК были взяты в отношении 1:1:1 в качестве основного получали продукт моноприсоединения с выходом 30%, а также продукт бисприсоединения с выходом 15%. Изменение количества AZT, кислоты и ДЦК до 3:1:1,5 способствовало увеличению выхода продукта бисприсоединения до 60%, а выход продукта моноприсоединения в данном случае составлял не более 10% (схема 1).

В сотрудничестве с компанией «Ассоциация AZT» была исследована стабильность веществ 1-4 в плазме крови. Для этого аликвоту исследуемого вещества (25 мкл), растворенного в ДМСО с концентрациями 360 или 440 мкг/мл веществ 1 и 3 соответственно, добавляли к 2 мл плазмы крови кролика. Время гидролиза половинного количества вещества 1 составило примерно 40 минут, полностью же оно гидролизовалось до AZT за 2 часа. Для соединения 3 время гидролиза половинного количества составило менее

10 минут, а за 90 минут происходил полный гидролиз до AZT и вещества 1. Аналогичные данные были получены для соединений 2 и 4. Полученные результаты показывают, что созданные депо-формы слишком быстро высвобождают AZT под действием ферментов плазмы крови и нуждаются в дополнительной модификации.

Таблица 1. Гидролиз соединений 1 и 3.

Время, мин	Концентрация		Время, мин	Концентрация		
	Соед. 1, нг/мл	AZT, нг/мл		Соед. 3, нг/мл	Соед. 1, нг/мл	AZT, нг/мл
0	4460	0	0	5465	0	0
1	4081	234	1	3954	777	307
5	3640	239	10	93	1908	2602
10	3515	373	30	16	1058	3017
20	3004	661,5	60	8,5	378	3537
40	1995	1567	90	0	125	3637
90	990,5	2062	130	0	0	3427
120	0	2315				
150	0	2351				

После перорального введения большая часть молекул лекарственных веществ попадает в тонкий кишечник и путём последовательного прохождения кишечных эпителиальных клеток (энтероцитов), поступает в системное кровообращение через воротную вену. Однако некоторые высоколипофильные лекарства (как правило,  $\log P > 5$ , растворимость в жирах  $> 50$  мг/г) при прохождении через энтероциты будут ассоциироваться с секретруемыми энтероцитами липопротеинами, в частности хиломикронами. Затем препарат, связанный с хиломикроном, секретруется в брыжеечную лимфатическую циркуляцию, а не в циркуляцию в воротной вене, приводящей к метаболизму в печени. Данный подход позволяет увеличить время циркуляции лекарственного средства и увеличить его

концентрацию в лимфатических протоках и лимфатических узлах, которые в случае ВИЧ-инфекции являются местом терапевтического действия препаратов.

Для нацеливания AZT на лимфатический транспорт было решено конъюгировать соединение **2** с модифицированным глицерином, имитируя тем самым триглицерид. Известно, что жирные кислоты с длинной цепью ( $>C_{14}$ ) обычно показывают усиленную лимфатическую абсорбцию (40-60% пролекарства попадает из кишечника в лимфу) и стабильность при циркуляции по сравнению с более короткими цепями. Исходя из этого, было решено использовать в качестве модифицирующего фрагмента 1,3-дипальмитоилглицерин **6**. Для синтеза этого соединения к 1,3-дигидроксиацетону, растворённому в хлороформе, в атмосфере аргона прибавляли избыток (2.1 экв.) хлорангидрида пальмитиновой кислоты в присутствии пиридина (схема 2). Целевое вещество **5** выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в системе хлороформ:метанол 99:1, контролируя выход с колонки продукта по ТСХ с прожигом. Выход составил 77%. Далее полученный кетон восстанавливали избытком (1.3 экв.) боргидрида натрия при температуре  $5^{\circ}C$  в течение 30 минут. После обработки реакции путём поэтапной промывки раствором бикарбоната натрия, водой и хлоридом натрия выход вещества **6** составил 86%. Для получения пролекарственного соединения осуществляли конъюгацию производного **2** с избытком (1.2 экв.) 1,3-дипальмитоилглицерина в хлористом метиле в присутствии конденсирующего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI) и диметиламинопиридина (схема 2). Продукт реакции выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой гексан:этилацетат с увеличением полярности системы от 9:1 до 2:1, выход составил 38%.

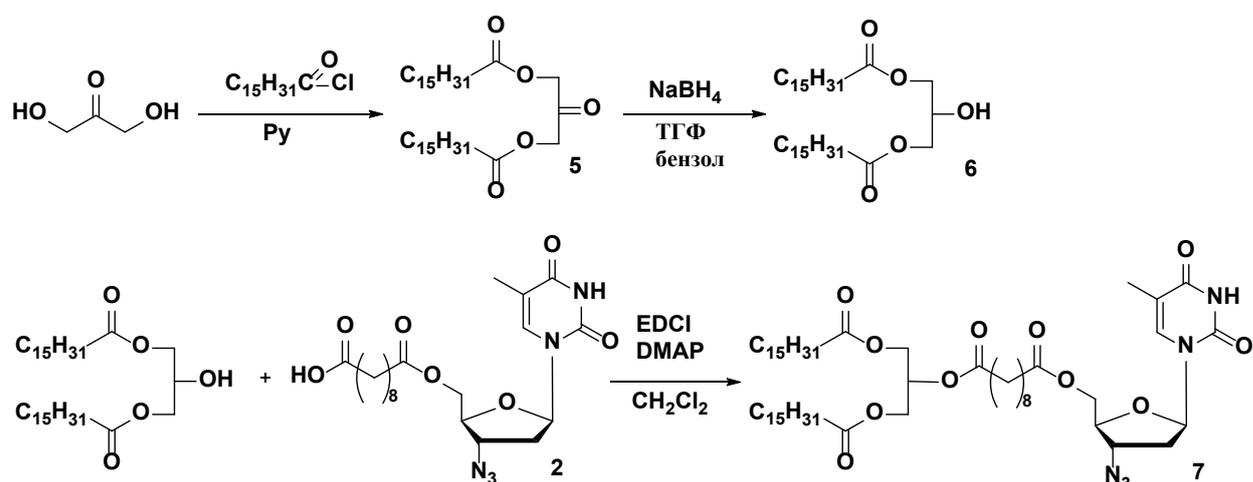


Схема 2. Схема синтеза депо-формы 7.

Исследование гидролиза соединения 7 после перорального приема крысами, выполненное в «Ассоциации AZT», показало его способность попадать в лимфу, при этом концентрация AZT-содержащих продуктов спустя 2 часа в лимфе была выше, чем в плазме крови (таблица 2).

Таблица 2. Гидролиз соединения 7 в плазме и лимфе крысы.

Вводимое вещество	Доза в пересчете на AZT мг/кг (ммоль/кг)	AZT в плазме нг/кг	AZT в плазме после щел.гидролиза нг/мл	AZT в лимфе нг/мл	AZT в лимфе после щел.гидролиза нг/мл
2 часа					
AZT	32 (0,12)	1877	---	1724	---
7	32 (0,12)	1256	1729	1462	2348
4 часа					
AZT	25 (0,10)	1310	---	798	---
7	25 (0,10)	1143	---	709	772

Однако исследование фармакокинетики соединения 7 на кроликах при пероральном введении в дозе 185 мг, соответствующей 50 мг AZT, в сравнении с AZT (таблица 3) показало, что соединение 7 легко гидролизуеться до исходного AZT и не обладает ожидаемым пролонгированным действием.

Таблица 3. Исследование фармакокинетики соединения 7 в плазме крови кролика.

Соединение 7			AZT	
Время, ч	Концентрация AZT в плазме, нг/мл	Концентрация AZT в плазме, после щелочного гидролиза, нг/мл	Время, ч	Концентрация AZT в плазме, нг/мл
0 (фон)	48	48	0 (фон)	43
1	2 236	2 750	1	2 381
2	1 053	1 477	2	2 004
4	527	555	4	737
6	97	326	6	240
8	53	325	8	112
24	0	187	24	50

Таким образом, стало понятно, что структура полученного пролекарства нуждается в изменениях. Было решено изменить линкер, соединяющий AZT с глицериновым фрагментом, на более устойчивый к гидролизу карбонильный. Для синтеза соединения 8 к раствору 1,3-дипальмитойлглицерина в безводном хлористом метиле в присутствии пиридина прибавили 0.33 экв. трифосгена (схема 3). Через 2 часа в реакционную смесь добавили 1.2 экв. азидотимидина и оставили реакцию на ночь. После очистки с помощью колоночной хроматографии при элюировании системой хлороформ:метанол 98:2 выход вещества 8 составил 32%.

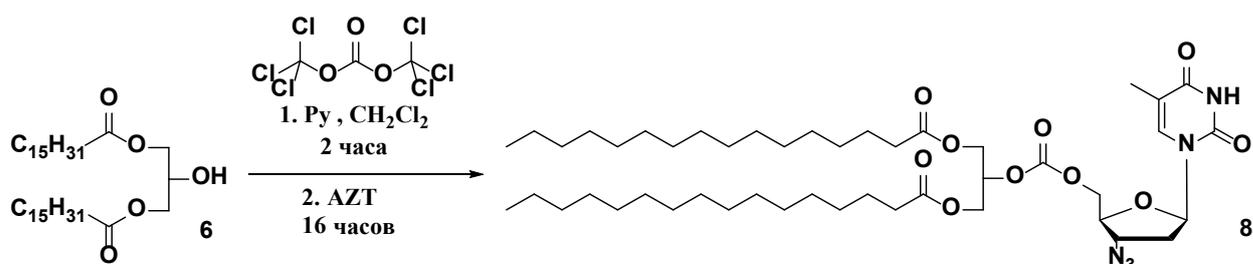


Схема 3. Синтез депо-формы 8.

Описанным выше методом был получено 1.2 г потенциальной депо-формы **8** для оценки стабильности в крови и исследования фармакокинетических параметров. При содействии «Ассоциации AZT» были проведены первые оценочные исследования гидролиза соединения **8** после перорального приема крысами (таблица 4). Полученные данные свидетельствуют, что спустя 2 часа большее количество AZT-содержащих веществ находится в плазме, а не в лимфе. Таким образом, усиления лимфатического транспорта достичь не удалось, и требуются дальнейшие модификации структуры пролекарства.

Таблица 4. Гидролиз соединения **8** в плазме и лимфе крысы.

Время забора плазмы и лимфы, ч	Концентрация AZT в плазме, нг/мл		Концентрация AZT в лимфе, нг/мл	
	без щелочного гидролиза	после щелочного гидролиза	без щелочного гидролиза	после щелочного гидролиза
1	5 403	7 886	5 182	7 951
2	3 194	4 066	2 035	2 803

Несмотря на то, что на данном этапе не удалось получить депо-формы AZT, позволяющей эффективно доставлять его в лимфу и обеспечивающей пролонгированное нахождение там, полученные нами соединения помогли узнать больше о зависимости между структурой подобных веществ и их стабильностью, способностью к гидролизу в биологических жидкостях, и тем самым приблизить к созданию эффективного пролекарства.

## 2. Гетеродимеры двойного действия против ВИЧ-1 и ЦМВ

С момента обнаружения СПИДа, вызываемого ВИЧ, сопутствующие инфекции стали серьезной клинической проблемой. Одной из наиболее распространённых оппортунистических инфекций является цитомегаловирус (ЦМВ) человека. Сама по себе ЦМВ-инфекция часто протекает бессимптомно, но для ВИЧ-инфицированных пациентов она представляет

серьёзную проблему, приводя к тяжелым заболеваниям органов и даже смерти. Поэтому возникла идея синтеза соединений, объединяющих в себе одновременно противовирусные активности в отношении ВИЧ и ЦМВ. Одним из способов конструирования препаратов с двойной активностью является создание гетеродимеров молекул, подавляющих соответствующие патогены. Такие гетеродимеры являются пролекарствами исходных препаратов, где одно лекарство служит носителем для другого и наоборот. Данный подход может обеспечивать определенные преимущества, например, медленное высвобождение активных соединений, что обычно приводит к меньшей токсичности, чем комбинация исходных препаратов. В своей работе мы объединяли нуклеозидные ингибиторы (НИИ) репликации ЦМВ **9a-f** с AZT, классическим нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы ВИЧ (НИОТ ВИЧ), для получения гетеродимеров двойного действия. Фармакокинетический профиль AZT со скачками уровня в крови приводит к токсичности и появлению штаммов, устойчивых к ВИЧ-1, а производные урацила **9a-f** нерастворимы в воде, что сильно затруднило проведение их доклинических и клинических исследований. Мы предположили, что синтез объединённых пролекарств может помочь решить проблемы обоих противовирусных агентов.

Сначала коллегами из Волгоградского государственного медицинского института был осуществлён одностадийный синтез ряда [2,6-диоксо-3-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-3,6-дигидропиримидин-1-(2H)-ил]уксусных кислот **10a-f**, получение которых заключалось в обработке исходных 1-[ω-(4-бромфенокси)алкил]-производных урацила **9a-f** этиловым эфиром бромуксусной кислоты в растворе ДМФА в присутствии  $K_2CO_3$  с последующим щелочным гидролизом. Далее мы получали целевые конъюгаты **11a-f** конденсацией AZT и кислот **10a-f** в присутствии ДЦК в пиридине (схема 4). После выделения и очистки колоночной хроматографией на силикагеле выходы  $5'-[2,6-диоксо-3-(\omega\text{-феноксиалкил})-3,6-$

дигидропиримидин-1(2H)-ил]ацетатов 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидина **11a-f** составили 52-74%.

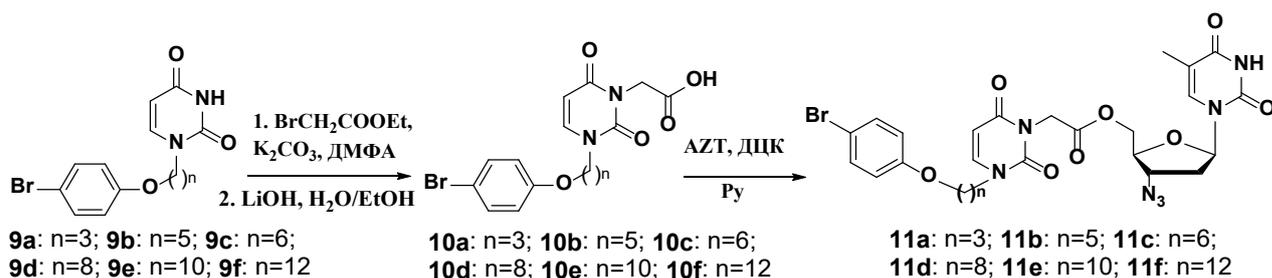


Схема 4. Синтез гетеродимеров **11a-f**.

В результате проведения биологических испытаний на культурах клеток МТ-4, инфицированных ВИЧ-1, была определена противовирусная активность соединений **11a-f** ( $EC_{50}$  0.3-0.83  $\mu$ M). Также на культуре диплоидных фибробластов лёгкого человеческого эмбриона WS1, инфицированных ЦМВ, были получены данные по противовирусной активности ( $EC_{50}$  3-12  $\mu$ M). В результате испытаний на обеих культурах клеток было установлено, что все полученные соединения нетоксичны ( $CC_{50} > 100 \mu$ M). При этом, как сообщалось ранее, анти-ЦМВ соединения **9a-f** и соединение **10c** (выбранное как представитель группа соединений **10a-f**) не обладали активностью против ВИЧ-1. Анти-ЦМВ активность соединений **9a-f** находится в диапазоне 4–20  $\mu$ M. AZT же не обладает какой-либо анти-ЦМВ активностью.

Мы предположили, что соединения **11a-f** могут подвергаться ферментативному гидролизу, например, эстеразами, с образованием биологически активных компонентов. С этой целью мы исследовали гидролиз соединений эстеразой печени свиньи. Мы показали, что в реакции с эстеразой образуются два основных продукта, идентифицированных с помощью ТСХ и масс-спектрометрии высокого разрешения как AZT и соответствующие 1-[ $\omega$ -(4-бромфенокси)алкил]урацилуксусные кислоты **10b-d**, а также 5-10% неидентифицированных продуктов. Следует отметить, что  $T_{1/2}$  для соединений **11b** и **11c** составляет около 7-8 часов, а  $T_{1/2}$  для

соединения **11d** с более длинным линкером составляет 10-12 часов, хотя гидролизуемые связи одинаковы. В качестве положительного контроля использовали диацетат тимидина; его гидролиз в тех же условиях полностью завершался через 5-6 ч.

Чтобы более точно имитировать ситуацию *in vivo*, когда ВИЧ-1 и ЦМВ реплицируются у коинфицированных людей, наши коллеги в лаборатории Л. Марголиса (Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development) исследовали действие соединения **11c**, выбранного как представителя таких гетеродимеров, на ткани миндалин человека *ex vivo*, коинфицированной обоими вирусами. Тканевая система является подходящей моделью для доклинических испытаний лекарственных средств, поскольку не требует активации или стимуляции клеток. Она также сохраняет исходную цитоархитектуру ткани и экспрессию ключевых молекул клеточной поверхности, важных для вирусных инфекций. Репликация как ВИЧ-1, так и ЦМВ в коинфицированных тканях была типичной для репликации этих вирусов в однократно инфицированных тканях человека. Соединение **11c** сохраняло свою ингибирующую активность в отношении обоих вирусов в тканях при двойном инфицировании и в концентрации 10  $\mu$ M полностью подавляло репликацию ВИЧ и ЦМВ (рис.1). Для оценки цитотоксичности соединения **11c** в системе лимфоидных тканей человека *ex vivo* фрагменты ткани миндалин были им обработаны в различных концентрациях. Жизнеспособность клеток, изолированных из экспериментальных и контрольных тканей, оценивали методом проточной цитометрии. Было показано, что конъюгат **11c** в концентрации 10  $\mu$ M не проявляет цитотоксичности и не вызывает изменений в различных типах клеток ткани.

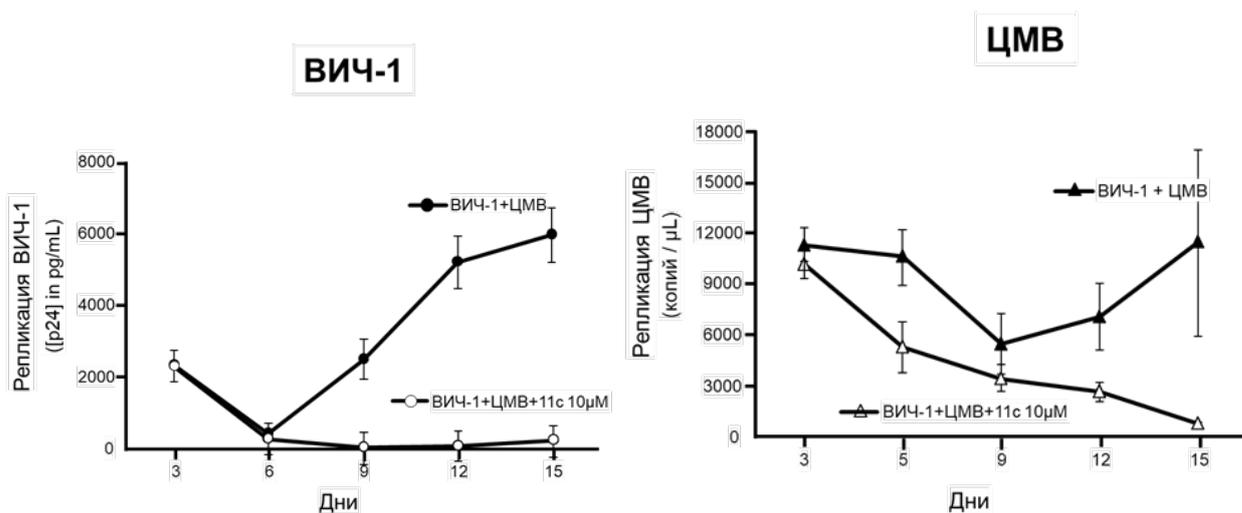


Рисунок 1. Подавление репликации ВИЧ и ЦМВ соединением **11c** в коинфицированных тканях миндалин.

Для сравнения активности, стабильности и токсичности тем же методом был синтезирован гетеродимер **12**, являющийся аналогом соединения **11c**, в котором AZT заменён на ЗТС (рис. 2). Гидролиз этого соединения под действием эстеразы печени свиньи проходил медленнее, время полугидролиза на ЗТС и кислоту **10c** составило 24 часа. Анти-ВИЧ активность **12** на культуре клеток МТ-4 составила 2 μМ, при этом отсутствовала цитотоксичность –  $CC_{50}$  для **12** превышала 100 μМ. В лимфоидной ткани человека, коинфицированной ВИЧ-1 и ЦМВ, гетеродимер **12** в концентрации 10 μМ сохранял свою ингибирующую активность в отношении обоих вирусов.

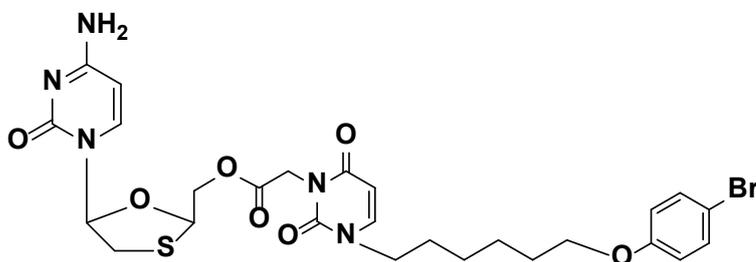


Рисунок 2. Структура соединения **12**.

Полученные нами гетеродимеры являются первыми соединениями с двойным действием, подавляющими как ВИЧ-1, так и ЦМВ. Дальнейшая

разработка, тестирование биологической активности таких соединений и оптимизация их фармакокинетических профилей могут привести к созданию противовирусных препаратов двойного действия против ЦМВ/ВИЧ-1.

### **3. Гетеродимеры двойного действия против ВИЧ-1 и ВПГ-2/вируса Вакции/вируса Варицелла-Зостер**

Вирус простого герпеса типа 2 (ВПГ-2) является одной из наиболее распространенных в мире инфекций, и более 50% ВИЧ-инфицированных людей коинфицированы ВПГ-2. Многолетние эпидемиологические и молекулярные исследования показали сильную синергетическую связь между ВПГ-2 и ВИЧ-1 инфекциями. В связи с вышесказанным одним из направлений данной работы стал синтез гетеродимеров, состоящих из нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы ВИЧ, представляющего собой остаток замещенного бензофенона, присоединенный к N-1-положению пиримидина оксиэтильным линкером, с модифицированными нуклеозидами, обладающими существенной активностью против ВПГ-2 и других вирусов семейства герпеса. При этом ННИОТ ВИЧ сами по себе являются малорастворимыми в воде соединениями, и создание депо-формы могло бы устранить этот недостаток. В качестве нуклеозидной составляющей гетеродимера, направленной на ВПГ-2, было выбрано три вещества, отличающиеся по механизму действия: ацикловир – классический ингибитор вирусной полимеразы, 5'-нораристеромицин действующий на S-аденозилгомоцистеингидролазу, и бициклический аналог дезоксирибонуклеозида, который имеет комплексный механизм действия (рис. 3). При синтезе подобных соединений, содержащих два активных компонента, крайне важным является выбор линкера. Оптимальный линкер должен быть нетоксичным, способным последовательно соединяться с заданными функциональными группами обоих противовирусных средств и позволять молекуле гетеродимера высвобождать активные компоненты с нужной скоростью в результате



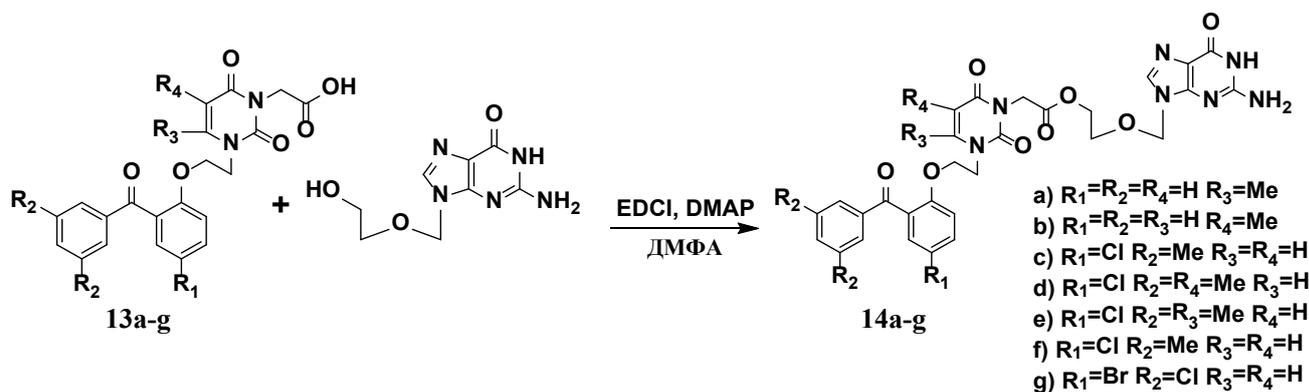


Схема 5. Синтез соединений **14a-14g**.

Вторая группа депо-форм двойного действия представляет собой конъюгаты кислот **13a-g** с 5'-нораристеромицином. 5'-Нораристеромицин – 5'-норкарбоциклический аналог аденозина, лишен метиленового фрагмента в 5'-положении и, как следствие, не может подвергаться внутриклеточному фосфорилированию, что исключает его ингибирующее действие в качестве терминатора роста цепи нуклеиновой кислоты. Однако 5'-нораристеромицин является эффективным ингибитором клеточного фермента S-аденозилгомоцистеингидролазы и обладает широким спектром антивирусной активности, в том числе и против вирусов семейства герпеса. Конденсацией кислот **13a-g** с 4-(6-амино-1,6-дигидро-9H-пурин-9-ил)циклопент-2-ен-1-олом в условиях описанных выше и последующим окислением двойной связи карбоциклического фрагмента конъюгатов **15a-15d** в присутствии тетраоксида осмия (схема 6) получали соединения **16a-16d**. Стоит отметить, что выходы продуктов на стадии конденсации в данном случае были существенно выше (52-76%), чем в реакциях с ацикловиром (13-38%). Общие выходы целевых конъюгатов **16a-16d** в расчете на 4-(6-амино-1,6-дигидро-9H-пурин-9-ил)циклопент-2-ен-1-ол составили 24-38%.

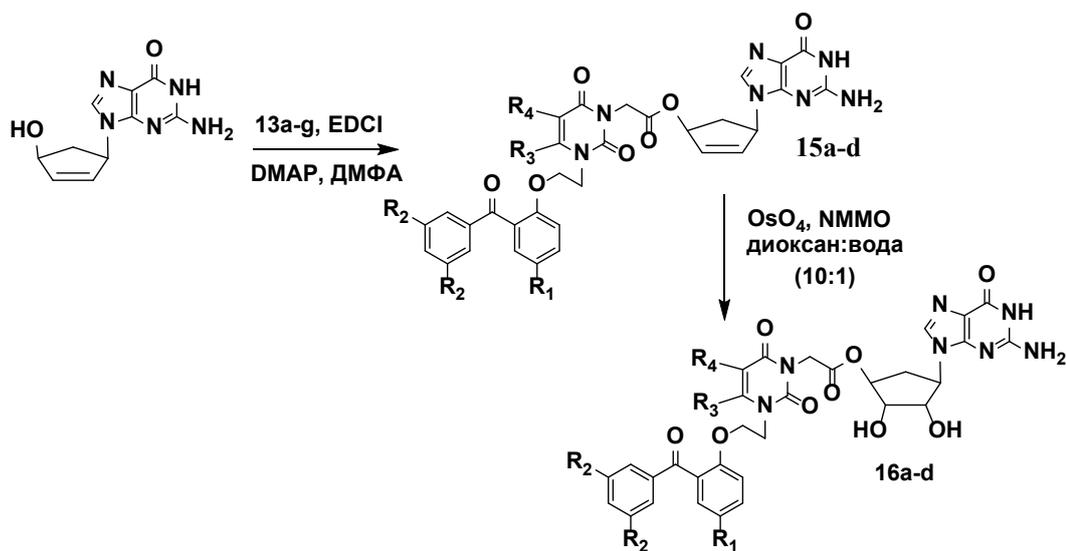


Схема 6. Синтез соединений **16a-16g**.

Мы предположили, что соединения **14a-g** и **16a-d** способны подвергаться ферментативному гидролизу с образованием биологически активных компонентов и выбрали эстеразу печени свиньи для проверки данной гипотезы. В качестве примеров взяты соединения **14d** и **16d**.  $T_{1/2}$  для обоих соединений составляет около 9 ч, а полный гидролиз проходит через 30 ч. Продукты гидролиза для **14d** и **16d** были идентифицированы методом ТСХ как ацикловир или 5'-нораристеромицин, соответственно, и кислота **13d**. В обоих случаях не обнаружено даже следов исходного замещённого бензофенона. Диацетат тимидина использовали в качестве положительного контроля, его гидролиз полностью завершился через 4 ч в тех же условиях.

Соединения **14a-g** и **16a** показали отсутствие цитотоксичности на культурах клеток SEM (человеческие лимфоциты) и HEL (фибробласты легких человеческих эмбрионов). В результате исследования биологической активности гетеродимеров на культуре клеток SEM, инфицированных ВИЧ-1 (штамм Шв), было установлено, что соединения **14a**, **14c-g**, **16a-d** обладают анти-ВИЧ активностью в диапазоне 2-49  $\mu\text{M}$ , но она ниже, чем у исходных ННИОТ. Ацикловир-содержащие гетеродимеры **14a-g** были протестированы на культуре клеток HEL, инфицированных ВПГ-2, они продемонстрировали активность от 9.4 до 43.4  $\mu\text{M}$ , что в 5-25 раз меньше, чем у исходного

ацикловира. Соединения **16a-d** также были исследованы на наличие активности против ВПГ-2, однако её не оказалось. Вместе с тем соединения **16b-16d** проявляли умеренную активность против цитомегаловируса, **16b** и **16d** были активны против вируса вакцинии, а **16c** и **16d** показали слабую активность против вируса Варицелла-Зостер. Отсутствие высокой противовирусной активности гетеродимеров **14a-g** и **16a-d** позволяет предположить, что гидролиз сложноэфирной связи и высвобождение аналогов нуклеозидов в условиях клеточного эксперимента происходит слишком медленно, чтобы эффективно и своевременно доставлять лекарство. Значительное падение анти-ВИЧ активности, вероятно, связано с отсутствием гидролиза остатка уксусной кислоты из урацильного фрагмента. Вместо ННИОТ были получены малоактивные уксусные кислоты **13a-g**. В дальнейшем с помощью оптимизации линкера можно будет достичь более эффективного гидролиза и получить более высокий ингибирующий эффект.

Третья группа гетеродимеров, представляет собой конъюгаты [2,6-диоксо-3-[(2-(3,5диметилбензоил)-4-хлорфенокси)этил]-4-метил-3,6-дигидропиримидин-1(2Н)-ил]уксусных кислот **13a-g** и 3-(4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-6-октилфуоро[2,3-d]пиримидин-2(3Н)-она **17**, являющегося высокоэффективным ингибитором вируса Варицелла-Зостер. Синтез бициклического аналога дезоксирибонуклеозида осуществляли по реакции Сонагаширы в присутствии катализатора палладия на угле. Дальнейшую конденсацию полученного соединения **17** с производными уксусной кислоты осуществляли в ранее описанных условиях (схема 7). Продукты выделяли препаративной хроматографией на пластинах с силикагелем. Выход гетеродимеров **18a-c** составил 24,5-29%. Полученные гетеродимеры **18a-c** обладали низкой химической стабильностью при комнатной температуре, поэтому оценка их биологической активности затруднена.

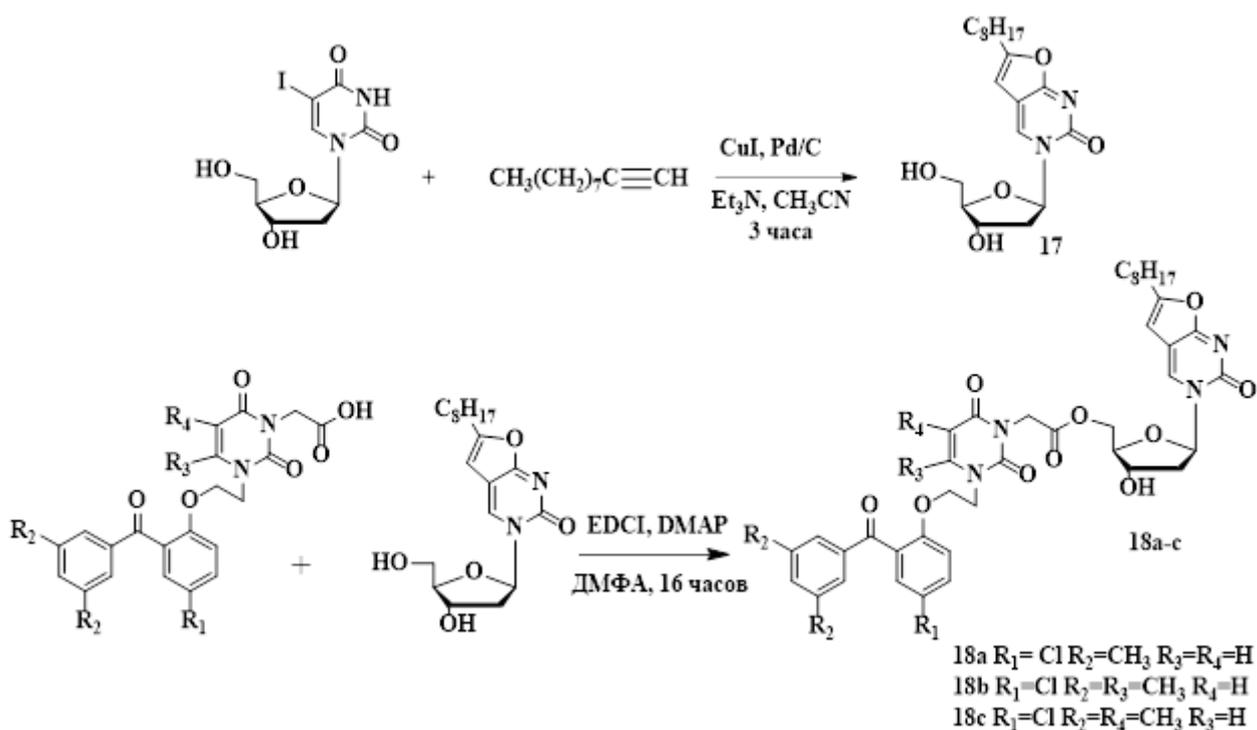


Схема 7. Синтеза гетеродимеров **18a-c**.

#### 4. 5-замещённые производные уридина как потенциальные ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы коронавируса

Пандемия коронавируса SARS-CoV-2, начавшаяся в 2020 году, уже стала причиной смерти 6,5 млн. человек. Инфицированные ВИЧ люди входят в группу повышенного риска при заболевании новой коронавирусной инфекцией. Даже при наличии вакцинации у таких пациентов результаты лечения COVID-19 из-за ослабленной иммунной системы значительно хуже; риск смертности от COVID-19 среди ВИЧ-инфицированных в два раза выше. Несмотря на значительные усилия, высокоэффективных и специфичных лекарственных средств против SARS-CoV-2 создано крайне мало.

Ранее было показано, что аналоги пуриновых нуклеозидов, так называемые флексимеры - модифицированные нуклеозиды, в которых бициклическое гетероциклическое основание разделено на две отдельные части, имидазольное и пиримидиновое кольца, соединенные одной углерод-углеродной связью, способны ингибировать репликацию коронавирусов HCoV-NL63 и MERS-CoV в культуре клеток. Эта модификация вносит

дополнительную гибкость в молекулу, которая способствует расширению структурных взаимодействий с клеточной мишенью. В попытке получить новые ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы коронавируса и в дальнейшем осуществить их конъюгацию с соединениями, обладающими анти-ВИЧ активностью, нами была синтезирована серия 5-замещённых производных уридина, которые можно рассматривать как «обратные флексимеры».

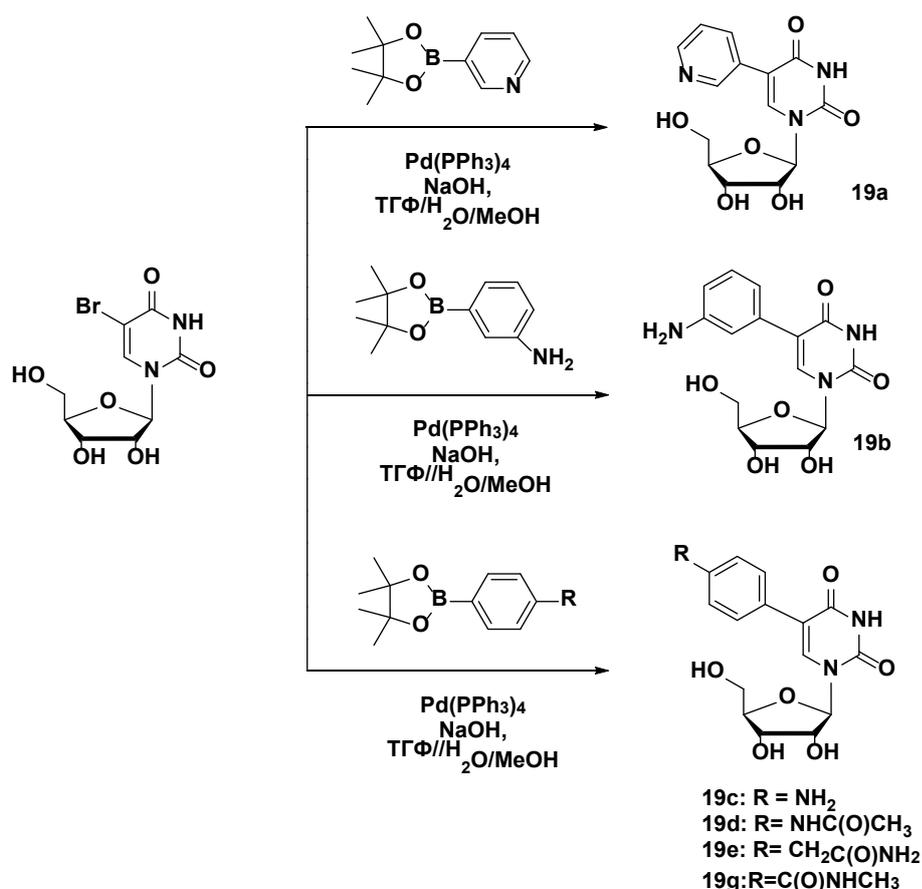


Схема 8. Синтез 5-замещённых производных уридина **19a-g**.

Синтез осуществляли по реакции кросс-сочетания Сузуки-Мияуры между 5-бромуридином и различными боронатами в системе растворителей H<sub>2</sub>O/MeOH/ТГФ 2:1:2 в присутствии катализатора тетракси(трифенилфосфин)палладия (схема 8). Целевые продукты **19a-g** выделяли с помощью ионообменной хроматографии, выход составил 37-59%. Синтезированные вещества **19a-g** были переданы для оценки биологической

активности и цитотоксичности в Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова РАН. Противовирусную активность определяли по способности исследуемых соединений ингибировать гибель клеток Vero, индуцированную заражением штаммом ПИК35 вируса SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля использовали N<sup>4</sup>-гидроксицитидин (EC<sub>50</sub>>5мкМ). Однако соединения **19a-g** не проявили ожидаемого ингибирующего эффекта (EC<sub>50</sub>>100мкМ). Очевидно, что для эффективного подавления SARS-CoV-2 требуется модификация структуры соединений, а полученные соединения исследуются на наличие активности в отношении других патогенов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе нами были предложены эффективные методы синтеза и получены новые группы аналогов нуклеозидов с антивирусной активностью, всего было синтезировано 33 новых соединения. Для двух липофильных депо-форм азидотимидина проведено исследование гидролиза на крысах. Полученные данные позволили дополнить знания о взаимосвязи между структурой и стабильностью подобных соединений. Из группы депо-форм двойного действия в отношении ВИЧ и ЦМВ, показавших хорошую антивирусную активность на культуре клеток, было выбрано соединение-лидер. На его примере была показана способность подобных соединений эффективно ингибировать оба вируса в эксперименте на тканях при двойном инфицировании. Полученные результаты могут стать первым этапом на пути создания лекарственного препарата против ВИЧ и ЦМВ одновременно.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан дизайн и методы синтеза шести новых липофильных депо-форм AZT. Исследована стабильность полученных соединений в плазме крови кролика, а также произведена оценка их фармакокинетических параметров в плазме крови кролика и крысы и лимфе крысы, показана способность высвобождать AZT.
2. Осуществлён синтез 21 гетеродимерного соединения, в которых один фрагмент отвечает за ингибирование ОТ ВИЧ, а другой подавляет репликацию сопутствующих вирусов – ЦМВ, ВПГ, Варицелла-Зостер и вируса Вакцинии. Проведена оценка их стабильности, антивирусной активности и цитотоксичности.
3. Для группы гетеродимерных соединений, содержащих НИОТ ВИЧ (AZT или ЗТС) и нуклеозидный ингибитор репликации ЦМВ, показана способность эффективно ингибировать ВИЧ и ЦМВ в культурах клеток и коинфицированных тканях.
4. Предложен метод синтеза шести 5-замещённых производных уридина («обратных флексимеров»), в качестве потенциальных ингибиторов репликации SARS-CoV-2. Показано, что эти соединения не обладают соответствующей антивирусной активностью.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Maslova A. A.**, Matyugina E. S., Snoeck R., Andrei G., Kochetkov S. N., Khandazhinskaya A. L., Novikov M. S. Uracil-containing heterodimers of a new type: synthesis and study of their anti-viral properties. *Molecules*. 2020, 25(15), 3350.
2. Khandazhinskaya A. L., Mercurio V., **Maslova A. A.**, Palomino R. A. Ñ., Novikov M. S., Matyugina E. S., Paramonova M.P., Kukhanova M. K., Fedorova N. E., Yurlov K. I., Kushch A. A., Tarasova O., Margolis L., Kochetkov S. N., Vanpouille C. Dual-targeted anti-CMV/anti-HIV-1 heterodimers. *Biochimie*. 2021, 189, 169-180.
3. **А.А. Маслова**, Е.С. Матюгина, Е.Ю. Шустова, В.П. Волок, Л.И. Козловская, С.Н. Кочетков, А.Л. Хандажинская. Новые аналоги уридина как возможные противовирусные агенты, специфичные к SARS-CoV-2. *Молекулярная биология*. 2022, 56(3), 469-473.
4. Matyugina E., Petushkov I., Surzhikov S., Kezin V., **Maslova A.**, Ivanova O., Smirnova O., Kirillov I., Fedyakina I., Kulbachinskiy A., Kochetkov S., Khandazhinskaya A. Nucleoside Analogs That Inhibit SARS-CoV-2 Replication by Blocking Interaction of Virus Polymerase with RNA. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(4),3361.

## ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. **А.А. Маслова**, А.Л. Хандажинская, Е.С. Матюгина, К. Ванпуль, Л. Марголис, С.Н. Кочетков. Пролекарства двойного действия: ВИЧ и герпесвирусы. // Сборник тезисов Первой всероссийской школы молодых учёных по медицинской химии. Новосибирск, 4-9 июля 2021 года, стр. 180
2. **A. Maslova**, M. Kukhanova , S. Kochetkov , M. Novikov , A. Khandzhinskaya. Dual agents against HIV and HCMV. //Book of abstracts of 26th Young Research Fellows Meeting. Paris, 20th – 22nd of February 2019, стр. 109
3. A. Khandzhinskaya, **A. Maslova**, M. Kukhanova, S. Kochetkov, M. Novikov. Dual agents against HIV and HCMV// Journal of Virus Eradication. Abstracts of International Symposium on HIV and Emerging Diseases. – 2018. – Т.4. – стр. 35