

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(71) Заявитель:
Институт органической химии Уфимского
научного центра РАН

(72) Изобретатель: Кондратенко Р.М.,
Балпина Л.А., Мустафина С.Р., Плясунова
О.А., Покровский А.Г., Толстиков Г.А.

(73) Патентообладатель:
Институт органической химии Уфимского
научного центра РАН

(57) Изобретение относится к новому химическому соединению, а именно к амиду глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом формулы I, проявляющему анти-ВИЧ активность, в культуре клеток МТ-4, с высокой эффективностью ингибируя накопление вирусспецифического белка р24 ($ID_{50} = 55$ мкг/мл или 52,8 мкМ), суммарного вирусного антигена ($ID_{50} = 75$ мкг/мл или 72,0 мкМ), что снижает активность обратной транскриптазы (ревертазы) (RT) ($ID_{50} = 55$ мкг/мл или 52,8 мкМ). Химиотерапевтический индекс (IS) данного соединения по разным параметрам составил 27,7-277,3, что существенно превышает таковой для ГК (4,4-24,0) и обеспечивает эффективную защиту клеток МТ-4 от гибели (102-123%) в результате ВИЧ-инфекции. Защитный эффект превосходит защитное действие глицирризиновой кислоты (ГК) и азидотимидина. В отличие от последнего амид ГК с 5-аминоурацилом ~ в 540 раз менее токсичен для клеток ($CD_{50} = 2080$ мкг/мл или

I

Ia R=OH

Ib R=



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 199 547** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) Int. Cl.⁷ **C 07 J 63/00, A 61 K 31/7068**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001108618/04, 30.03.2001

(24) Effective date for property rights: 30.03.2001

(46) Date of publication: 27.02.2003

(98) Mail address:
450054, g.Ufa-54, pr. Oktjabrja, 71,
Institut organicheskoy khimii UNTs RAN

(71) Applicant:
Institut organicheskoy khimii Ufimskogo
nauchnogo tsentra RAN

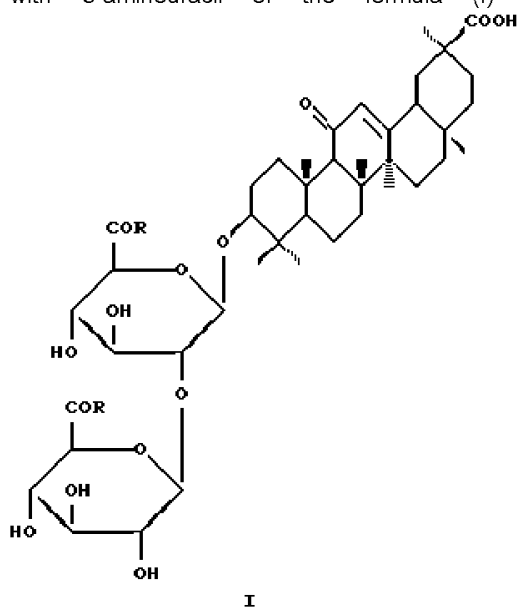
(72) Inventor: Kondratenko R.M.,
Baltina L.A., Mustafina S.R., Pljasunova
O.A., Pokrovskij A.G., Tolstikov G.A.

(73) Proprietor:
Institut organicheskoy khimii Ufimskogo
nauchnogo tsentra RAN

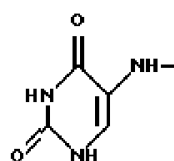
(54) GLYCYRRHIZIC ACID AMIDE WITH 5-AMINOURACIL ELICITING ANTI-HIV-ACTIVITY

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry. SUBSTANCE:
invention relates to novel chemical
compound, namely, to glycyrrhizic acid amide
with 5-aminouracil of the formula (I)



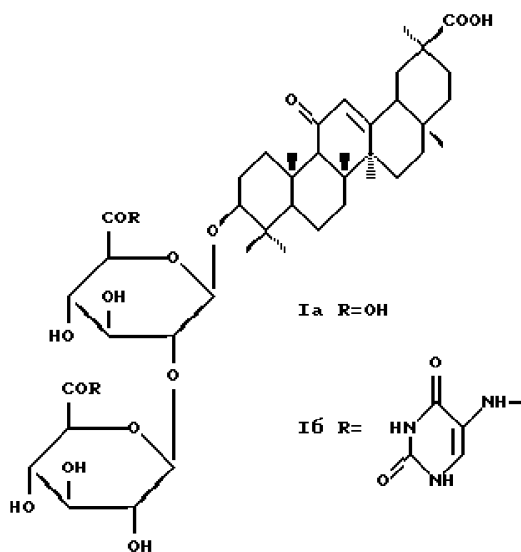
where R means OH (Ia) or R means



(Ib) eliciting

anti-HIV-activity in cultured cells MT-4. This compound inhibits accumulation of virus-specific protein p24 with high efficiency ($ID_{50} = 55$ mcg/ml, or 52.8 mcM), total viral antigen ($ID_{50} = 75$ mcg/ml, or 72.0 mcM) that reduces activity of reverse transcriptase (revertase; RT) ($ID_{50} = 55$ mcg/ml, or 52.8 mcM). Chemotherapeutic index (IS) of this compound is 27.7-277.3 by different parameters that exceeds that for glycyrrhizic acid significantly (4.4-24.0) and provides effective protection of cells MT-4 from the death (102-123%) as result of HIV-infection. Protective effect of this compound exceeds the protective effect of glycyrrhizic acid and azidothymidine and, in contrast to the latter, toxicity of glycyrrhizic acid amide with 5-aminouracil by about 540-fold less for cells ($ID_{50} = 2080$ mcg/ml, or 1998 mcM). EFFECT: improved pharmacological properties of compound. 2 cl, 2 tbl, 2 ex

Предлагаемое изобретение относится к новым химическим соединениям, конкретно к амиду глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом:
3-O-{2-O-[N-(β -D-глюкуронопиранозил)-5-аминоурацил-N-(β -D-глюкуронопиранозил)-5-аминоурацил]}-(3 β , 20 β)-11-оксо-олеан-12-ен-30-карбоновой кислоте формулы (I6), проявляющему анти-ВИЧ активность.



Указанное соединение и его свойства в литературе не описаны.

В настоящее время во всем мире интенсивно ведутся исследования по поиску новых противовирусных средств для борьбы с такими опасными для жизни человека вирусными заболеваниями, как лихорадка Эбола, Марбурга, гепатиты В и С, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

В 1987-1988 гг. группой японских ученых была обнаружена способность глицирризиновой кислоты (ГК) - основного ингредиента экстракта корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*) и уральской (*Gl. Uralensis*) ингибировать ВИЧ *in vitro* и *in vivo* [1-3]. ГК была успешно использована в условиях клиники для лечения больных СПИДом [4]. Предварительные клинические исследования показали, что при введении ГК больным СПИДом в дозе до 1,6 г в сутки увеличивается число Т4-лимфоцитов и снижается содержание вирусного антигена [4].

Механизм анти-ВИЧ действия ГК и ее производных связан со способностью потенцировать образование интерферона в плазме крови [5], а также блокированием протеинкиназы С, необходимой для связывания вируса с Т4 рецепторами [6, 7]. Установлено, что ГК непосредственно препятствует связыванию ВИЧ с клеткой. Однако, как показали наши исследования, ГК малоэффективна на модели хронической инфекции ВИЧ [8].

Задача, на решение которой направлено заявленное техническое решение, заключается в поиске новых производных ГК, обладающих анти-ВИЧ активностью. В заявленном техническом решении синтезировано новое соединение - амид ГК с 5-аминоурацилом:

3-O-{2-O-[N-(β -D-глюкуронопиранозил)-5-аминоурацил-N-(β -D-глюкуронопиранозил)-5-аминоурацил]}-(3 β , 20 β)-11-оксо-олеан-12-ен-30-карбоновая кислота формулы (I6), проявляющий анти-ВИЧ активность. Биологические свойства данного соединения были изучены в лаборатории ретровирусов Института молекулярной биологии ГНЦ ВБ "Вектор".

Синтез амида (I6) осуществлен путем конденсации глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом в смеси диметилформамида и пиридина в присутствии дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК) с выходом 56%.

Противовирусная активность препарата изучалась на традиционной модели первично инфицированных ВИЧ лимфоидных клеток МТ-4. В работе использовали штамм ВИЧ-1/ЭВК. В качестве препаратов сравнения использовали известный анти-ВИЧ препарат - ингибитор вирусной обратной транскриптазы - азидотимидин (АЗТ) в концентрации 1 мкг/мл и очищенную глицирризиновую кислоту (ГК) (95%) в концентрации 100 мкг/мл. Основным недостатком АЗТ является его высокая цитотоксичность: $CD_{50} = 3,5$ мкМ [8, 9].

Цитотоксичность предлагаемого соединения (I6) оценивали на культуре перевиваемых лимфоцитов человека линии МТ-4. Долю жизнеспособных клеток подсчитывали в камере Горяева после окрашивания трипановым синим. Строили дозозависимую кривую и определяли концентрацию соединения, вызывающую гибель 50% клеток - CD_{50} .

Для оценки анти-ВИЧ активности исследуемого соединения клетки МТ-4 инфицировали штаммом ВИЧ-1/ЭВК с множественностью заражения 0,2-0,5 инфекционных единиц на клетку. Ингибирующий эффект препарата оценивали на 4-е сутки культивирования измерением количества вирусного антигена р24 и суммарного вирусного антигена иммуноферментным методом, а также измерением активности вирусспецифического фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Кроме того, определяли степень защиты инфицированных клеток МТ-4 от гибели в результате вирусной (ВИЧ) инфекции. На основе полученных результатов строили дозозависимые кривые и определяли количественные характеристики ингибирования репродукции ВИЧ: ID_{50} - концентрацию соединения, на 50% подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 50%-ную защиту клеток; ID_{90} - концентрацию соединения, на 90% подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 90%-ную защиту клеток; IS - индекс селективности - отношение токсичной дозы соединения CD_{50} к его эффективной дозе ID_{50} .

Установлено, что для исследуемого препарата 50%-ная цитотоксическая доза (CD_{50}) составила 2080 мкг/мл или 1998 мкМ. Для препаратов сравнения - ГК (95% чистоты) $CD_{50} = 756$ мкМ, для АЗТ - 3,5 мкМ [9].

В табл. 1 и 2 приведены результаты проведенных экспериментов по оценке анти-ВИЧ активности амида ГК с 5-аминоурацилом. Исследуемый препарат (I6) проявляет выраженную анти-ВИЧ активность,

с высокой эффективностью ингибируя накопление вирусспецифического белка p24 (87-95% в концентрации 100-800 мкг/мл) (табл. 1), $ID_{50} = 55$ мкг/мл (52,8 мкМ) по данному параметру противовирусной активности (табл. 2); суммарного вирусного антигена (АГ) ($ID_{50} = 75$ мкг/мл или 72,0 мкМ), снижая активность вирусной обратной транскриптазы (ревертазы) (RT) ($ID_{50} = 55$ мкг/мл или 52,8 мкМ) (табл. 2), а также обеспечивая эффективную защиту клеток МТ-4 от гибели в результате вирусной инфекции (103-123% в концентрациях 50-800 мкг/мл) (табл. 1). Препараты сравнения защищают клетки МТ-4 от гибели соответственно ГК на 26%, АЗТ на 95% (табл. 1). В табл. 2 приведены количественные характеристики ингибирования ВИЧ в культуре клеток МТ-4 амидом ГК с 5-аминоурацилом (ID_{90} , ID_{50} , IS). Химиотерапевтический индекс (IS) для данного препарата по разным параметрам составил от 27,7 до 277,3, что существенно превышает таковой для ГК (от 4,4 до 24,0 для очищенного препарата) [8, 9]. Препарат практически не обладает цитотоксической активностью в исследованном диапазоне концентраций: $CD_{50} = 1998$ мкМ, в то время как АЗТ почти в 540 раз токсичнее: $CD_{50} = 3,5$ мкМ).

Таким образом, впервые получен амид ГК с 5-аминоурацилом формулы (Iб), проявляющий выраженную анти-ВИЧ активность в культуре клеток МТ-4, превосходящую противовирусный эффект природного гликозида - глицирризиновой кислоты, с высокой эффективностью (103-123%) защищающий клетки МТ-4 от гибели в результате ВИЧ-инфекции и обладающий низкой цитотоксичностью. Препарат почти в 540 раз менее цитотоксичен, чем известный анти-ВИЧ препарат азидотимидин (АЗТ).

Сущность технического решения поясняется следующими примерами.

Пример 1. Синтез амида глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом (Iб)

К раствору 0,82 г (1 ммоль) глицирризиновой кислоты (95%) в смеси 25 мл диметилформамида и 5 мл пиридина при 0-5°C прибавили 0,42 г (3 ммоль) 5-аминоурацила и 0,45 г (2,2 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида и перемешивали смесь при этой температуре 1 ч, выдержали смесь с периодическим перемешиванием при 20-22°C 24 ч. Осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровали, фильтрат разбавили холодной водой, подкислили лимонной кислотой до pH ~ 4, осадок отфильтровали, высушили и переосадили из водного диоксана. Сухой остаток перемешивали в 20 мл кислого ацетона (ацетон + HCl, pH ~ 2) 30 мин, отфильтровали, промыли чистым ацетоном и высушили. Выход 56%. $R_f = 0,4$ (хлороформ-метанол-вода) (силуфол).

ИК-спектр, ν , см⁻¹: 3600-3200 (ОН, NH), 1720 (СООН), 1670 (C=O), 1580 (пиримидин), 1550 (CONH). УФ-спектр, λ_{max} , нм (lg ϵ): 240 (4,20); 287 (3,87). Спектр ЯМР ¹³C (DMCO-d⁶, δ , м.д.): 88,50 (C3); 55,77 (C5); 43,22 (C8); 61,45 (C9); 36,94 (C10); 199,58 (C11); 128,52 (C12); 169,60 (C13);

50,41 (C18); 46,70 (C20); 179,28 (C30); 105,01 (C1'); 83,00 (C2'); 74,54 (C3'); 71,89 (C4'); 76,26 (C5'); 167,44 (C6'); 103,32 (C1''); 74,50 (C2''); 74,98 (C3''); 71,89 (C4''); 76,26 (C5''); 167,14 (C6''). Другие сигналы (остатки урацила): 163,16; 160,85; 160,77; 154,56; 150,00; 113,37; 113,18. Найдено, %: N 8,17. C₅₀H₆₈N₆O₁₈. Вычислено, %: N 8,07.

Пример 2. Изучение цитотоксичности и анти-ВИЧ активности амида глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом (Iб).

Цитотоксичность препарата оценивали на культуре перевиваемых лимфоцитов человека линии МТ-4. Препарат растворяли в ДМСО и в соответствующих разведениях вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов (по три лунки на каждое разведение) при расщеве клеток, при этом конечная концентрация ДМСО в культуральной среде не превышала 1%. Посевная концентрация составляла $5 \cdot 10^5$ клеток/мл. Далее клетки культивировали на ростовой среде (среда RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки плода коровы, 0,06% L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина и 60 мкг/мл линкомицина) при 37 °C и 5% углекислого газа в течение 4 суток. По окончании инкубации подсчитывали долю жизнеспособных клеток в камере Горяева после окрашивания трипановым синим. Строили дозозависимую кривую и определяли концентрацию соединения, вызывающую гибель 50% клеток - CD_{50} .

Установлено, что для амида (Iб) 50%-ная цитотоксическая доза (CD_{50}) составила 2080 мкг/мл или 1998 мкМ, в то время как для ГК $CD_{50} = 756$ мкМ, для АЗТ 3,5 мкМ [8, 9].

Таким образом, предлагаемое соединение (Iб) является менее токсичным веществом для клеток иммунной системы МТ-4, чем препараты сравнения.

Для оценки анти-ВИЧ активности исследуемого соединения клетки МТ-4 инфицировали штаммом ВИЧ-1/ЭВК с множественностью заражения 0,2-0,5 инфекционных единиц на клетку. После адсорбции вируса в течение 1 часа при 37°C инфицированные и контрольные клетки разводили ростовой средой до посевной концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток/мл и вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов. Затем вносили растворы исследуемого соединения (по три лунки на каждое разведение) и далее культивировали как описано выше. Конечная концентрация препарата в культуральной среде составляла от 0,001 до 20 мкг/мл.

Ингибирующий эффект препарата оценивали на 4-е сутки культивирования измерением количества вирусного антигена p24 и суммарного вирусного антигена иммуноферментным методом, а также измерением активности вирусспецифического фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Кроме того, определяли анти-ВИЧ активность, исходя из степени защиты инфицированных клеток от гибели в результате вирусной инфекции, подсчитывая долю жизнеспособных клеток в камере Горяева после окрашивания трипановым синим. На основе полученных результатов строили дозозависимые кривые и определяли количественные характеристики

ингибирования репродукции ВИЧ: ID₅₀ - концентрацию соединения, на 50% подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 50%-ную защиту клеток; ID₉₀ - концентрацию соединения, на 90% подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 90%-ную защиту клеток; IS - индекс селективности - отношение токсичной дозы соединения CD₅₀ к его эффективной дозе ID₅₀. В качестве препаратов сравнения использовали очищенную глицирризиновую кислоту (95%) (ГК) и известное анти-ВИЧ средство - азидотимидин (АЗТ).

В табл. 1 и 2 приведены результаты проведенных экспериментов по оценке анти-ВИЧ активности амида глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом. Показано, что исследуемый препарат проявляет выраженную анти-ВИЧ активность, с высокой эффективностью ингибируя накопление вирусспецифического белка p24 (ID₅₀ = 55 мкг/мл или 52,8 мкМ), суммарного вирусного антигена (ID₅₀ = 75 мкг/мл или 72,0 мкМ), снижая активность обратной транскриптазы (ревертазы) (RT) (ID₅₀ = 55 мкг/мл или 52,8 мкМ) (табл. 2), а также обеспечивая эффективную защиту клеток МТ-4 от гибели (102-123%) (табл. 1) в результате вирусной инфекции. Количественные характеристики ингибирования ВИЧ в культуре клеток МТ-4 амидом ГК с 5-аминоурацилом (Iб) (ID₅₀, ID₉₀, IS) приведены в табл. 2. Химиотерапевтический индекс (IS) для данного препарата по разным параметрам составил от 27,7 до 277,3, что существенно превышает таковой для очищенной ГК (4,4 - 24,0) [9].

Источники информации

1. M.Ito, A.Sato, K.Hirabayashi, F.Tanabe, Sh.Shigeta, M.Baba, E.De Clerq, H.Nakashima, N.Yamamoto. Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV). //Antiviral Res., 1988, v.10, N 6, p.289-298.

2. M.Ito, H.Nakashima, M.Baba, R.Puwels, E.De Clercq, Sh.Shigeta, N.Yamamoto. Inhibitory effect of glycyrrhizin on the in vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV (HTLV-III/LAV)] . //Antiviral Res., 1987, v.7, N 3, p.127-137.

3. M.Ito, H.Nakashima, N.Yamamoto. Glycyrrhizin and its salts for inhibiting growth of virus of acquired immune deficiency syndrom (AIDS). //Eur. Pat. 255420, 1988. //Chem. Abstr, v.109, 116062v.

4. M.Ito. Clinical effects of glycyrrhizin on human immunodeficiency virus disease. //Jikken Igaku, 1989, v.7, N 7, p.858-860. //Chem. Abstr, v. 111, R49739x.

5. Y.Feng, T.Zhu. Effect of glycyrrhizin on the production of γ -interferon (IFN) from human spleen cells. //Zhonghuo Weish Cngutuxue He Hianyxue Zazhi, 1986, v.6, N 2, p.99-102. //Chem. Abstr., v.105, 18041k.

6. T. S.Tochikara, H.Nakashima, Y.Yamamoto. Antiviral agents with activity against human retroviruses. //J. Acquired Immune Def. Syndrome, 1989, N 2, p.441-447.

7. Г. А. Толстиков, Л.А.Балтина, Э.Э.Шульц, А.Г.Покровский. Глицирризиновая кислота. //Биоорган. химия, 1997, т.23, 9, с.691-709.

8. О. А. Плясунова. Скрининг и изучение препаратов - ингибиторов вируса иммунодефицита человека. Дисс. канд. биол. наук в форме научного докл. Кольцово, 1992, 55 с.

9. О.А.Плясунова, И.Н.Егоричева, Н.В.Федюк, А.Г.Покровский, Л.А.Балтина, Ю. И. Муринов, Г.А.Толстиков. Изучение анти-ВИЧ активности β -глицирризиновой кислоты. //Вопросы вирусологии, 1992, 5-6, с.235-238.

Формула изобретения:

Амид глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом формулы (I) (см. графическую часть)

проявляющий анти-ВИЧ активность.

Таблица 1

Анти-ВИЧ активность амида глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом в культуре клеток МТ-4

Препарат	Конц., мкг/мл	Защита клеток от гибели, %*	Ингибирование RT, %	Ингибирование АГ, %	Ингибирование p24, %
(16)	800,0	123,17±1,24	94,91±0,27	92,31±0,60	94,54±2,24
	400,0	111,42±0,64	93,19±1,06	90,06±0,81	93,66±1,50
	200,0	112,05±1,67	92,09±0,96	86,28±0,55	93,02±1,67
	100,0	106,81±0,95	86,70±5,48	63,29±7,48	83,25±2,95
	50,0	102,19±3,51	35,94±13,82	26,3±9,87	33,49±1,51
	10,0	64,57±4,54	-	-	23,84±0,98
АЗТ	1,0	95,45±1,11	98,45±0,87	95,70±1,53	97,35±1,67
МТ-4 (инфицированные ВИЧ)	-	36,57±5,08	-	-	-
МТ-4	-	79,13±4,12	-	-	-
ГК	100	26,00±12,10	89,90±5,90	57,70±0,92	78,86±7,09

*- жизнеспособность клеток, %

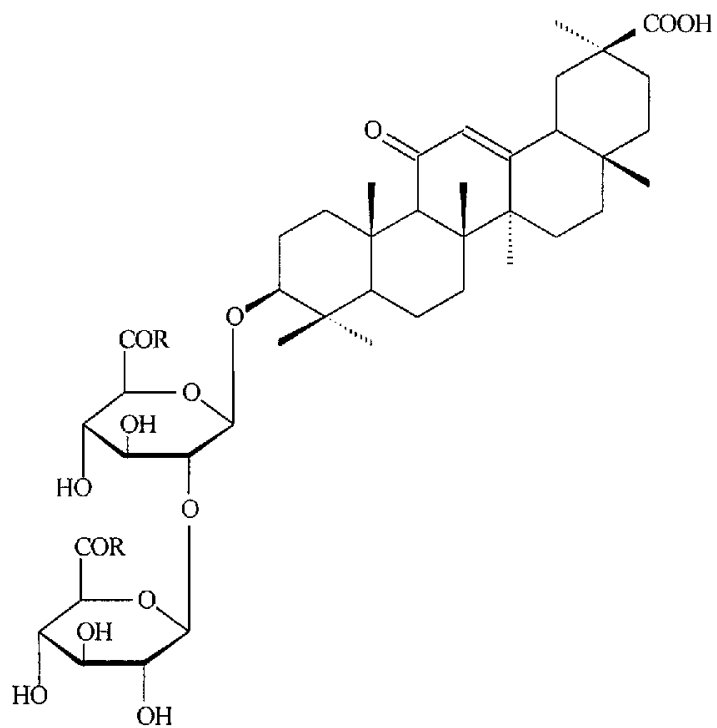
Таблица 2

Количественные характеристики ингибирования ВИЧ в культуре клеток МТ-4 амидом глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом

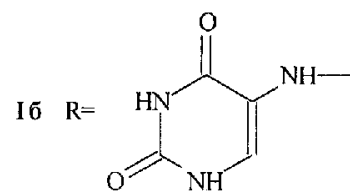
ID ₉₀ , мкг/мл				ID ₅₀ , мкг/мл (мкМ)				IS			
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
115,0	25,0	400,0	140,0	55,0	7,5	75,0	55,0	37,8	277,3	27,7	37,8
				(52,8)	7,2)	(72,0)	(52,8)				

- 1- по снижению ревертазной активности (RT)
 2- по защите клеток от гибели
 3- по ингибированию накопления суммарного антигена (АГ)
 4- по ингибированию накопления p24

RU 2199547 C2



Ia R=OH



RU 2199547 C2