

Л. А. Балтина (мл.)<sup>1</sup>, О. В. Столярова<sup>1</sup>, Р. М. Кондратенко<sup>1, 2</sup>, Т. М. Габбасов<sup>1</sup>,  
Л. А. Балтина<sup>1, 2</sup>, О. А. Плясунова<sup>3</sup>, Т. В. Ильина<sup>3</sup>

## СИНТЕЗ И АНТИ-ВИЧ-1 АКТИВНОСТЬ 3β-(2-О-β-D-ГЛЮКУРОНО- ПИРАНОЗИЛ-β-D-ГЛЮКУРОНОПИРАНОЗИДА)- ОЛЕАН-9(11),12(13)-ДИЕН-30-ОВОЙ КИСЛОТЫ

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия;

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия;

<sup>3</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

Осуществлен синтез 3β-(2-О-β-D-глюкуронопиранозил-β-D-глюкуронопиранозида) олеан-9(11),12(13)-диен-30-овой кислоты (**II**) — аналога глицирризиновой кислоты (ГК) — восстановлением ГК NaBH<sub>4</sub> в смеси 2-пропанола — воды при кипячении с последующей обработкой реакционной смеси 5 % соляной кислотой. Изучены цитотоксичность и противовирусная активность данного гликозида в отношении вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в культуре клеток МТ-4. Установлено, что гликозид **II** является практически нетоксичным веществом для клеток МТ-, ингибируя накопление вирусспецифического белка р24 и РНК-зависимую ДНК-полимеразную активность обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1 (ИК<sub>50</sub> 3,1 ± 1,0 мкг/мл).

**Ключевые слова:** глицирризиновая кислота; 3β-(2-О-β-D-глюкуронопиранозил-β-D-глюкуронопиранозид)-олеан-9(11),12(13)-диен-30-овая кислота; цитотоксичность; противовирусная активность; вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

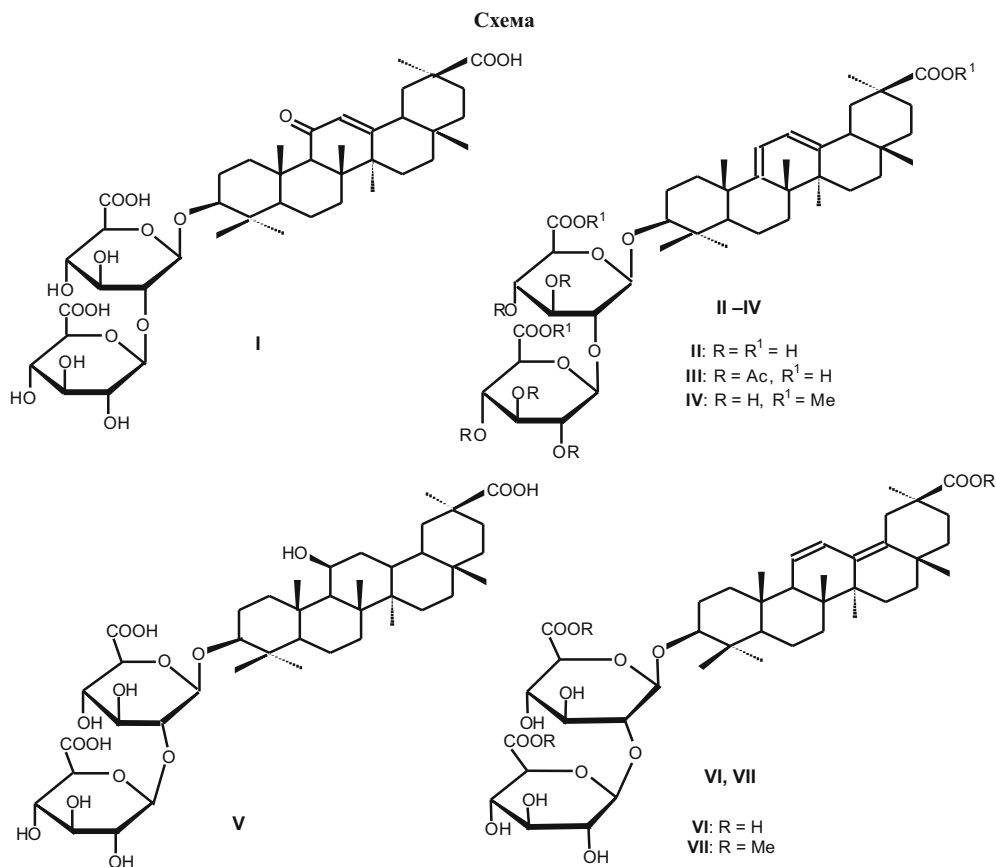
Тритерпеновые сапонины относятся к одному из наиболее распространенных в растительном мире классу природных соединений, обладающих широким спектром биологической и фармакологической активности [1]. Глицирризиновая кислота (ГК) **I** является биоактивным сапонином корней солодки голой и уральской (*Glycyrrhiza glabra* L., *Gl. uralensis* Fisher) (*Leguminosae*), известным противовоспалительной, противоязвенной, антиаллергической, антидотной, противоопухолевой и иммуностропной активностью [2]. ГК относится к числу лидирующих природных гликозидов, перспективных в качестве скаффолда для создания новых малотоксичных противовирусных агентов [3, 4]. ГК ингибирует ВИЧ-1, вирусы инфлюэнцы А, Эпштейна-Барра, герпеса, гепатитов В и С, SARS-ассоциированные коронавирусы и др. [5–8]. ГК обладает новым механизмом противовирусного действия, проявляя активность на ранних стадиях репликативного цикла вирусов и стимулируя продукцию γ-интерферона [9]. Структурное сходство молекулы ГК с 11-кетостероидами (наличие сопряженной 11-он-12-еновой системы в тритерпеновой части) обуславливает их близкую биологическую активность. ГК и ее соли при длительном введении в высоких дозах проявляют минералокортикоидное действие, влияют на водно-солевой обмен, усиливают задержку ионов Na<sup>+</sup> и снижают содержание ионов K<sup>+</sup> в организме (псевдоальдостеронизм) [2]. Поэтому синтез аналогов ГК с восстановленной 11-оксо-функцией представляет интерес для изучения зависимости структура — активность.

Ранее нами предложен метод восстановления ГК NaBH<sub>4</sub> в тетрагидрофуране (ТГФ) при нагревании

(50 °С) в течение 4 ч и кипячении в течение 1 ч, в результате чего была получена 3β-(2-О-β-D-глюкуронопиранозил-β-D-глюкуронопиранозида) олеан-9(11),12(13)-диен-30-овая кислота (**II**), выделенная в виде пента-О-ацетата (**III**) [10]. Как правило, ацетаты гликозидов не растворимы в водных средах и мало пригодны для изучения их противовирусной активности в культуре клеток.

Синтез аналогов ГК с восстановленной 11-оксо-функцией **II** и **VI** проведен ранее [11, 12]. Согласно [11] восстановление ГК проводили в смеси этанола — воды при соотношении ГК и NaBH<sub>4</sub> 1:4 экв. при кипячении в течение 1 ч с получением 11β-гидроксипроизводного **V**, которое сначала выделяли из реакционной смеси, а затем обрабатывали 2 % соляной кислотой в диоксане, получая смесь олеан-9(11),12(13)-диен- и -11(12),13(18)-диеновых аналогов ГК **II** и **VI**, которую разделяли колоночной хроматографией (КХ) на силикагеле (СГ) в виде триметилэтиловых эфиров **IV** (66 %) и **VII** (16 %) (схема). Гликозид **VI**, содержащий гетероаннулярную диеновую систему в тритерпеновой части, является природным минорным сапонином корней китайской солодки (*Gl. uralensis* Fisher) (ликорис-сапонин C<sub>2</sub>) [2]. В [12] обнаружено, что данный гликозид ингибирует цитопатогенное действие ВИЧ-1 в клетках МТ-4 и MOLT-4 в концентрации 0,16 ммоль. Гликозид **II** с гомоаннулярной диеновой системой в агликоне является полусинтетическим аналогом ГК, противовирусные свойства которого в литературе не описаны.

Для получения эталонного образца гликозида **II** мы провели сначала восстановление ГК NaBH<sub>4</sub> в смеси этанола — воды (1:1), как было описано в [11], при кипячении в течение 2 ч, упростив методику синтеза. Де-



гидратацию образующегося гликозида **V** проводили без предварительного выделения, используя вместо 2 % раствора соляной кислоты в водном диоксане 5 % водную соляную кислоту, которой подкисляли реакционную смесь (рН 1–2) при комнатной температуре, перемешивали 1 ч и продукт реакции экстрагировали *n*-бутанолом (BuOH). В результате был получен сырой продукт (смесь гликозидов), содержащий 37,5–39,5 % гомодиенового аналога ГК **II** согласно данным ВЭЖХ (табл. 1), который обрабатывали сильнокислым катионитом КУ-2-8 (H<sup>+</sup>-форма) в 70–75 % этаноле для дополнительной очистки от солей. Полученные образцы делили КХ на СГ, элюируя градиентной смесью хлороформа – метанола – воды (см. экспериментальную часть). Гликозид **II** выделен в гомогенном состоянии с выходами 34–36 % и охарактеризован ИК- и ЯМР-спектрами, а также превращением в известный триметилэфир **IV** [12]. В ИК-спектре гликозида **II** отсутствует максимум поглощения 11-он-12-ена. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H содержит два синглета олефиновых протонов (H11 и H12) со значениями химических сдвигов (ХС) 5,58 и 5,62 м.д. (ацетон-*d*<sub>6</sub>). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C характеризуется новыми сигналами олефиновых атомов углерода в области слабого поля: 156,2 (C9); 117,1 (C11); 122,2 (C12); 147,8 (C13) м. д., что согласуется с литературными данными [12].

С целью увеличения выхода гликозида **II** мы провели реакцию восстановления ГК избытком NaBH<sub>4</sub> в смеси 2-пропанол — вода (1:1) при кипячении. Обработка реакционной смеси 5 % соляной кислотой (рН 1–2) при 20–22 °С и последующая экстракция BuOH, как описано выше, привели к получению сыро-

го продукта с общим выходом 95–100 %. Для удаления солей сырой гликозид растворяли в 70–75 % этаноле и обрабатывали катионитом КУ-2-8 в H<sup>+</sup>-форме. Разделение гликозидов проводили с помощью КХ на СГ при элюции смесью хлороформа — метанола — воды с контролем фракций по ТСХ. Результаты приведены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, содержание целевого продукта в полученных образцах составило 47,1–49,7 % согласно данным ВЭЖХ при восстановлении ГК избытком NaBH<sub>4</sub> (5–7 экв.) при кипячении в смеси 2-пропанол — вода (1:1) в течение 2–4 ч. Выход чистого гликозида **II** после разделения КХ не превышал 44–46 % в результате потерь при хроматографировании. Остальные фракции содержали неразделенную смесь гликозидов.

Изучены цитотоксичность и анти-ВИЧ-1 активность гликозида **II** на традиционной модели первично инфицированных ВИЧ лимфоидных клеток МТ-4 с использованием штамма ВИЧ-1/ЭВК, как описано в работах [13, 14], в сравнении с ГК.

Цитотоксичность гликозида **II** оценивали в культуре перевиваемых Т-лимфоцитов человека (линия МТ-4) в виде растворов в диметилсульфоксиде (ДМСО) в соответствующих разведениях. По окончании инкубации при 37 °С подсчитывали долю жизнеспособных клеток в камере Горяева после окрашивания трипановым синим. Строили дозозависимую кривую и определяли концентрацию препарата, вызывающую гибель 50 % клеток — ЦК<sub>50</sub> (цитотоксическая доза).

Условия опытов и содержание гликозида II по данным ВЭЖХ

№ п/п	Условия опыта	NaBH <sub>4</sub> , г (ммоль)	Выход, г	Содержание II, % <sup>a</sup>
1	2 г ГК (2,4 ммоль), 50 мл смеси этанол — вода (1:1), 2 ч <sup>б</sup>	5,0 (13,2)	1,4	37,5
2	2 г ГК (2,4 ммоль), 50 мл смеси этанол — вода (1:1), 2 ч <sup>б</sup>	6,0 (15,8)	1,5	39,5
3	2 г ГК (2,4 ммоль), 40 мл смеси 2-пропанол — вода (1:1), 2 ч <sup>б</sup>	4,5 (11,9)	1,8	47,3
4	2 г ГК (2,4 ммоль), 50 мл смеси 2-пропанол — вода (1:1), 2 ч <sup>б</sup>	5,0 (13,2)	1,9	47,6
5	2 г ГК (2,4 ммоль), 50 мл смеси 2-пропанол — вода (1:1), 2 ч <sup>б</sup>	6,0 (15,8)	2,0	49,7
6	5 г ГК (6,0 ммоль), 100 мл смеси 2-пропанол — вода (1:1), 4 ч <sup>б</sup>	11,0 (29,0)	4,5	47,1

<sup>a)</sup> ± 0,8 %; <sup>б)</sup> время кипячения.

Анти-ВИЧ-1 активность соединения II оценивали в культуре клеток МТ-4 (концентрация  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл), инфицированных штаммом ВИЧ-1/ЭВК. Ингибирующий эффект оценивали на 4-е сутки культивирования измерением количества вирусного антигена — вирусспецифического белка р24 в культуральной жидкости иммуноферментным методом. На основе полученных экспериментальных данных строили дозозависимые кривые и определяли количественные характеристики ингибирования: ИК<sub>50</sub> — концентрацию соединения, на 50 % подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 50 % защиту клеток от гибели вследствие инфекции; ИК<sub>90</sub> — концентрацию соединения, на 90 % подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 90 % защиту клеток от гибели вследствие инфекции; ИС — индекс селективности — отношение цитотоксичной концентрации ЦК<sub>50</sub> к его эффективной концентрации ИК<sub>50</sub>. Результаты исследований приведены в табл. 2.

Гликозид II является практически нетоксичным веществом и в 12 раз менее токсичен для клеток МТ-4, чем ГК. Кроме того, гликозид II проявляет выраженную анти-ВИЧ-1 активность, ингибируя накопление вирусспецифического белка р24, и превосходит ГК по ИС в 4,8 раз.

Изучено влияние гликозида II на РНК-зависимую ДНК полимеразную активность рекомбинантной обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1 в присутствии (и в отсутствие) различных концентраций исследуемого препарата с использованием ОТ ВИЧ-1 согласно работе [14]. Исследования показали, что гликозид II с высокой эффективностью ингибирует РНК-зависимую ДНК-полимеразную активность ОТ ВИЧ-1. Эффективная концентрация гликозида II, ингибирующая 50 % ОТ ВИЧ-1 (ИК<sub>50</sub>), составила  $3,1 \pm 1,0$  мкг/мл. Таким образом, впервые выявлена высокая анти-ВИЧ-1 активность гликозида II по ингибированию ОТ ВИЧ-1 в культуре клеток.

Таблица 2  
Анти-ВИЧ-1 активность гликозида II в культуре клеток МТ-4

Шифр препарата	ЦК <sub>50</sub> , мкг/мл	ИК <sub>50</sub> , мкг/мл	ИС <sup>б</sup>
II	24000	500	48,0
ГКа	1950	125	10,3

<sup>a)</sup> ГК ( $95,0 \pm 0,8$  %) получена из субстанции моноаммонийной соли согласно [15]; <sup>б)</sup> ± 0,5 – 0,7.

### Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (Germany) с рабочей частотой 300 (<sup>1</sup>H) и 75,5 (<sup>13</sup>C) МГц. Химические сдвиги даны по отношению к тетраметилсилану как внутреннему стандарту. Отнесения сигналов были сделаны с использованием данных ЯМР высокого разрешения для ГК [16]. ИК-спектры регистрировали на спектрометре Shimadzu Prestige-21 в минеральном масле. УФ-спектр записан на спектрофотометре UV-400 (Германия) в метаноле. Элементный анализ проведен на анализаторе Euro EA 3000, ошибка определения — 0,5 % от теории. ВЭЖХ анализ проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 AD с использованием колонки Силасорб (Silarsorb) C18 (250 × 4,6 мм), подвижная фаза — CH<sub>3</sub>CN – H<sub>2</sub>O – CH<sub>3</sub>COOH, 55:44,4:0,6 (v %); диодный детектор SPD-M20 A (λ 254 нм); скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин; объем вводимого образца 10 мкл при концентрации 1 мг/мл; ошибка определения ± 0,8 %. ТСХ проводили на пластинках с алюминиевой подложкой Кизельгель (Kieselgel) 60 F<sub>254</sub> (Merck TLC) и Сорбфил (Сорбополимер, Украина). Пятна веществ проявляли 5 % раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в этаноле с последующим нагреванием при 120 °С в течение 2–3 мин. Для КХ использовали силикагель КСК (фракция 50–150) (Сорбополимер) и Sigma-Aldrich (фракция 40–100). В работе использовали NaBH<sub>4</sub> (Pancreas Quimica S. A. U.). ГК для химической модификации получена из коммерческой моноаммонийной соли согласно работе [17] и имела чистоту  $88,0 \pm 1,0$  %. В качестве эталонных соединений для ВЭЖХ и изучения анти-ВИЧ-1 активности использовали очищенную ГК ( $95,0 \pm 0,8$  %), полученную согласно [15], и образец гликозида II ( $95,0 \pm 0,8$  %), полученный по известной методике [11].

### Общая методика получения 3-О-β-D-глюкуронопиранозил-β-D-глюкуронопиранозидо олеан-9(11), 12(13)-диен-30-овой кислоты (II).

1. В смеси этанол – вода. К раствору 2,0 г ГК (2,4 ммоль) в 40–50 мл смеси этанол — вода (1:1) прибавляли 13,2–15,8 ммоль NaBH<sub>4</sub>, нагревали при 50–60 °С 2 ч и кипятили 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры (20–22 °С) реакционную смесь подкисляли 5% соляной кислотой (рН 1–2), перемешивали 1 ч, добавляли 50 мл воды и экстрагировали BuOH (50 мл × 3). Бутанольный экстракт промывали водой (50 мл × 2), сушили MgSO<sub>4</sub> и упаривали

досуха. Остаток растворяли в 50 мл 70–75 % этанола и обрабатывали катионитом КУ-2-8 (H<sup>+</sup>-форма). Катионит отфильтровывали, промывали этанолом, фильтрат упаривали. Полученные образцы анализировали ВЭЖХ и делили КХ на СГ. Образцы растворяли в небольшом количестве метанола, помещали на колонку с СГ и элюировали смесью CHCl<sub>3</sub> — MeOH — H<sub>2</sub>O, 200:10:1, 100:10:1, 50:10:1, 25:10:1 (v %, ступенчатый градиент) с контролем фракций по ТСХ или ВЭЖХ. Выход чистого гликозида **II** 34–36 %.

## 2. В смеси 2-пропанол — вода.

а) К раствору 2,0 г (2,4 ммоль) ГК в 40–50 мл смеси 2-пропанол — вода (1:1) прибавляли порциями 11,9–15,8 ммоль NaBH<sub>4</sub>, нагревали при 50–60 °С 20–30 мин до растворения и кипятили 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакцию смесь подкисляли 5 % соляной кислотой (рН 1–2), перемешивали 1 ч, добавляли 50 мл воды и экстрагировали BuOH (50 мл × 3). Бутанольный экстракт промывали водой (50 мл × 2), сушили MgSO<sub>4</sub> и упаривали досуха. Остаток растворяли в 50 мл 70–75 % этанола и обрабатывали катионитом КУ-2-8 (H<sup>+</sup>-форма). Катионит отфильтровывали, промывали этанолом, фильтрат упаривали. Полученные образцы анализировали ВЭЖХ и делили КХ на СГ как описано выше. Выход чистого гликозида **II** составил 44–46 %.

б) К раствору 5,0 г (6,0 ммоль) ГК в 100 мл смеси 2-пропанол — вода (1:1) прибавляли порциями 29,0 ммоль NaBH<sub>4</sub>, нагревали при 50–60 °С 30 мин до растворения и кипятили 4 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакцию смесь подкисляли 5 % соляной кислотой (рН 1–2), перемешивали 1 ч, добавляли 50 мл воды и экстрагировали BuOH (100 мл × 2). Бутанольный экстракт промывали водой (100 мл × 2), сушили MgSO<sub>4</sub> и упаривали досуха. Остаток растворяли в 150 мл 70–75 % этанола и обрабатывали катионитом КУ-2-8 (H<sup>+</sup>-форма). Полученный продукт анализировали ВЭЖХ и делили КХ как описано выше. Результаты опытов представлены в табл. 1.

**3-О-β-D-глюкуронопиранозил-β-D-глюкуронопиранозид олеан-9(11),12(13)-диен-30-овой кислоты (II).** R<sub>f</sub> 0,45–0,47 (CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O, 45:10:1). ИК-спектр, ν<sub>max</sub>, см<sup>-1</sup>: 3600–3200; 1710; 1651. УФ-спектр, λ<sub>max</sub>, нм (lgε): 282 (5,0). ПМР-спектр (ацетон-d<sub>6</sub>), δ, м.д.: 0,85; 0,89; 0,91; 1,02; 1,05; 1,15; 1,39 (все с, 21 Н, 7 СН<sub>3</sub>); 1,55–2,20 (м, СН, СН<sub>2</sub>); 3,50–4,20 (м, Н2'-Н5'; Н2''-Н5''); 4,55 (д, Н1', J 7,0 Гц); 4,65 (д, Н1'', J 7,5 Гц); 5,58; 5,62 (оба с, 2Н, Н11, Н12). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (ацетон-d<sub>6</sub>) δ, м.д.: 38,8 (C1); 27,0 (C2); 90,4 (C3); 39,8 (C4); 53,0 (C5); 17,3 (C6); 33,5 (C7); 45,0 (C8); 156,2 (C9); 35,1 (C10); 117,1 (C11); 122,2 (C12); 147,8 (C13); 41,8 (C14); 26,4 (C15); 32,9 (C17); 47,9 (C18); 40,6 (C19); 44,2 (C20); 31,9 (C21); 36,2 (C22); 28,0 (C23); 14,6; 14,7 (C24; C25); 20,2 (C26); 22,2 (C27); 28,5 (C28); 28,8 (C29); 179,2 (C30); 105,5 (C1'); 85,0 (C2'); 77,5 (C3'); 73,0 (C4'); 76,7 (C5'); 169,9 (C6'); 106,9 (C1''); 73,3 (C2''); 76,5 (C3''); 73,2 (C4''); 77,7 (C5''); 170,2 (C6''). C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>15</sub> · 3H<sub>2</sub>O.

**Триметилловый эфир 3-О-β-D-глюкуронопиранозил-β-D-глюкуронопиранозид олеан-9(11),12(13)-диен-30-овой кислоты (III).** К раствору 0,1 г гликозида **II** в 5 мл метанола прибавляли эфирный раствор диазометана до устойчивой желтой окраски раствора. Растворители упаривали, остаток кристаллизовали из водного метанола. Выход 0,08 г (80 %). Т. пл. 180–182 °С. Лит. [11]: т. пл. 180 °С (MeOH). ПМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 0,77; 0,91; 0,98; 1,12; 1,25; 1,28; 1,35 (все с, 21 Н, 7 СН<sub>3</sub>); 1,50–2,30 (м, СН, СН<sub>2</sub>); 3,69; 3,78; 3,80 (все с, 15 Н, 3 ОСН<sub>3</sub>); 4,10–4,70 (м, Н1'-Н5'; Н1''-Н5''); 5,58; 5,65 (оба с, 2Н, Н11, Н12).

## Экспериментальная биологическая часть

**Изучение цитотоксичности и анти-ВИЧ-1 активности гликозида **II** в культуре клеток МТ-4.** Цитотоксичность исследуемого соединения оценивали в культуре клеток МТ-4 как описано в работах [13, 14]. Препарат растворяли в ДМСО и в соответствующих разведениях вносили в лунки планшета (по 3 лунки на каждое разведение) при расewe клеток. Посевная концентрация клеток составляла 0,5 × 10<sup>6</sup> клеток/мл. Конечная концентрация препарата в клеточной суспензии составляла от 1 мкг/мл до 2 мг/мл. Клетки культивировали в 96-луночных культуральных планшетах фирмы “Costar” (США) на ростовой питательной среде (среда RPMI-1640) с добавлением 10 % сыворотки плода коровы, 0,06 % L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина при 37 °С в атмосфере 5 % СО<sub>2</sub> в течение 4 сут.

По окончании инкубации подсчитывали долю жизнеспособных клеток в камере Горяева после окрашивания трипановым синим. Строили дозозависимую кривую и определяли цитотоксическую концентрацию препарата, вызывающую гибель 50 % клеток — ЦК<sub>50</sub>.

Противовирусную активность гликозида **II** изучали на традиционной модели первично инфицированных ВИЧ (ВИЧ-1) перевиваемых Т-лимфоцитов человека (линия клеток МТ-4) с использованием штамма ВИЧ-1/ЭВК согласно работам [13, 14]. Для оценки анти-ВИЧ-1 активности соединения **II** клетки МТ-4 (концентрация 2 · 10<sup>6</sup> клеток/мл) инфицировали штаммом ВИЧ-1/ЭВК с множественностью заражения 0,2–0,5 инфекционных единиц на клетку. После адсорбции вируса в течение 1 ч при 37 °С инфицированные и контрольные клетки (без вируса) разводили ростовой культуральной средой до посевной концентрации 5 · 10<sup>5</sup> клеток/мл и вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов. Затем в соответствующие лунки вносили растворы исследуемого соединения в ДМСО (по 3 лунки на каждое разведение) и далее культивировали, как описано выше. Конечная концентрация исследуемых препаратов в клеточной суспензии составляла от 0,5 до 2,0 %. В качестве препарата сравнения использовали ГК (95 %) в концентрации 100 мкг/мл.

Ингибирующий эффект соединения **II** оценивали на 4-е сутки культивирования измерением количества вирусного антигена р24 иммуноферментным методом.

Кроме того, определяли долю жизнеспособных клеток методом исключения трипановым синим. На основе полученных экспериментальных данных строили дозозависимые кривые и определяли количественные характеристики ингибирования: ИК<sub>50</sub> — концентрацию соединения, на 50 % подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 50 % защиту клеток от гибели вследствие инфекции, ИК<sub>90</sub> — концентрацию соединения, на 90 % подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 90 % защиту клеток от гибели вследствие инфекции, ИС — индекс селективности или терапевтический индекс — отношение токсичной концентрации препарата ЦК<sub>50</sub> к его эффективной концентрации ИК<sub>50</sub>. Результаты опытов приведены в табл. 2.

**Изучение влияния гликозида II на РНК-зависимую ДНК полимеразную активность обратной транскриптазы ВИЧ-1.** В работе использовали рекомбинантную ОТ ВИЧ-1, выделенную из экспрессируемого вектора рbHRT в культуре JM109 *E. coli* согласно работе [14]. Фермент, содержащий на N-конце 6 гистидиновых аминокислотных остатков, был очищен с помощью Ni-NTA агарозы (Qiagen, Hilden, Германия). Концентрацию очищенной ОТ определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции 260450 М<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup> для гетеродимерной ОТ. В экспериментах по определению активности ОТ использовались [<sup>3</sup>H]-ТТР (Perkin Elmer Life Sciences) (Boston, MA, США) и поли(рибоА)-олиго(dT)<sub>12-18</sub> в качестве матрицы-прайма, GE Healthcare (Piscataway, NJ, США).

РНК-зависимую ДНК-полимеразную активность ОТ определяли в присутствии или в отсутствие различных концентраций исследуемого вещества с использованием 0,2 единицы/мл поли(рибоА)-олиго(dT)<sub>12-18</sub>, 2 нМ ОТ, 5 мкМ [<sup>3</sup>H]-ТТР в конечном объеме 50 мкл в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 60 мкМ КСl и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Образцы инкубировали в течение 20 мин при 37 °С, реакцию останавливали добавлением 200 мкл охлажденной 10 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ), содержащей 20 мМ пиррофосфата натрия. После 20 мин инкубации в ледяной бане образцы отфильтровывали через фильтр 1,2 мкм, содержащий стекловолокно типа С, в 96-луночные микропланшеты (Millipore, Bedford MA, США).

Фильтры промывали последовательно дважды 10 % ТХУ и дважды 95 % этанолом. Количество [<sup>3</sup>H]-ТТР, включенной в осадок нуклеиновой кислоты, подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 08-03-13514 офи-ц и 12-03-31472-мол\_а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. K. Hostettman, A. Marston, *Saponins*, Cambridge University Press, (1995).
2. Г. А. Толстикова, Л. А. Балтина, В. П. Гранкина и др., *Солодка: биоразнообразие, химия и применение в медицине*, Академическое издательство "Гео", Новосибирск (2007), сс. 151 – 178.
3. Л. А. Балтина, Р. М. Кондратенко, Л. А. Балтина (мл.) и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(10), 3 – 12 (2009); *Pharm. Chem. J.*, **43**(10), 539 – 548 (2009).
4. С. S. Graebin, H. Verli, J. A. Guimaraes, *J. Braz. Chem. Soc.*, **21**(9), 1595 – 1615 (2010).
5. R. Pompei, S. Laconi, A. Ingiani, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **9**, 996 – 1001 (2009).
6. J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer, et al., *Lancet*, **361**(6), 2045 – 2046 (2003).
7. G. Hoever, L. Baltina, M. Michaelis, et al., *J. Med. Chem.*, **48**(4), 1256 – 1259 (2005).
8. J.-C. Lin, J.-M. Cherng, M.-Sh. Hung, et al., *Antiviral Res.*, **79**, 6 – 11 (2008).
9. P. Cos, L. Maes, D. V. Berghe, et al., *J. Nat. Prod.*, **67**, 284 – 293 (2004).
10. Л. А. Балтина, Н. Г. Сердюк, С. Р. Мустафина и др., *Ж. общ. химии*, **69**(8), 1384 – 1389 (1999).
11. I. Kitagawa, K. Hori, T. Taniyama, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 43 – 49 (1993).
12. K. Hirabayashi, S. Iwata, H. Matsumoto, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 112 – 115 (1991).
13. О. А. Плясунова, И. Н. Егоричева, Н. В. Федюк и др., *Вопросы вирусол.*, **37**(5 – 6), 235 – 238 (1992).
14. О. А. Плясунова, Т. В. Ильина, Я. Ю. Киселева и др., *Вестник РАМН*, № 11, 42 – 46 (2004).
15. Р. М. Кондратенко, Л. А. Балтина, С. Р. Мустафина и др. *Хим.-фарм. журн.*, **35**(2), 39 – 42 (2001); *Pharm. Chem. J.*, **35**(2), 101 – 104 (2001).
16. Л. А. Балтина, О. Кунерт, А. А. Фатыхов и др., *Химия природ. соедин.*, № 4, 347 – 350 (2005).
17. Р. М. Кондратенко, Л. А. Балтина, С. Р. Мустафина и др. *Хим.-фарм. журн.*, **35**(1), 38 – 41 (2001); *Pharm. Chem. J.*, **35**(1), 40 – 44 (2001).

Поступила 21.10.13

## SYNTHESIS AND ANTI-HIV ACTIVITY OF 3β-(2-O-β-D-GLUCORONOPYRANOSYL-β-D-GLUCURONOPYRANOSIDE)-OLEAN-9(11),12(13)-DIEN-30-OIC ACID

L. A. Baltina, Jr.<sup>1</sup>, O. V. Stolyarova<sup>1</sup>, R. M. Kondratenko<sup>1,2</sup>, T. M. Gabbasov<sup>1</sup>, L. A. Baltina<sup>1,2</sup>, O. A. Plyasunova<sup>3</sup>, and T. V. Il'ina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, Russia

<sup>2</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Bashkortostan, Russia

<sup>3</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, Russia

We have synthesized 3β-(2-O-β-D-glucuronopyranosyl-β-D-glucuronopyranoside)-olean-9(11),12(13)-dien-30-oic acid (II), which is an analog of glycyrrhizic acid (GA), by reducing GA with NaBH<sub>4</sub> in a boiling 2-propanol – water mixture, followed by treatment of the reaction mixture with 5% hydrochloric acid solution. The cytotoxicity and antiviral activity of the obtained glycoside with respect to human immunodeficiency virus of type 1 (HIV-1) in MT-4 cell culture have been studied. It is established that glycoside II is almost non-toxic for MT-4 cells, while inhibiting the accumulation of virus-specific protein p24 and RNA-dependent DNA-polymerase activity of reverse transcriptase of HIV-1 (IC<sub>50</sub> = 3.1 ± 1.0 μg/mL).

**Keywords:** glycyrrhizic acid, 3β-(2-O-β-D-glucuronopyranosyl-β-D-glucuronopyranoside)-olean-9(11),12(13)-dien-30-oic acid, cytotoxicity, antiviral activity, human immunodeficiency virus of type 1 (HIV-1)