

УДК615.013: 543.42:543.57



ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ 1-[2-(2-БЕНЗОИЛФЕНОКСИ) ЭТИЛ]-6-МЕТИЛУРАЦИЛА

Е.А. Джайн (Корсакова)¹, Д.В. Демченко², А.А. Озеров³, М.Н. Макарова²,
В.Г. Макаров², В.Ю. Балабаньян¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

119991, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т, дом 27, корп. 1

² Закрытое акционерное общество «Санкт-Петербургский институт фармации»

188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район,

г.п. Кузьмолковский, ул. Заводская, дом 3, корп. 245

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

E-mail: ekaterina.korsa@gmail.com

Получено 30.01.2021

Принята к печати 10.04.2021

Цель – идентификация 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила с использованием различных методов анализа, а также исследование его механизма действия в отношении дикого типа и мутантных форм обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1.

Материалы и методы. Для характеристики структуры исследуемого вещества использовали рентгеноструктурный анализ, элементный анализ, термический анализ, а также УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии. Изучение механизма действия соединения, как потенциального лекарственного средства, проводили путем оценки ингибирующей активности в отношении ОТ ВИЧ-1 дикого типа и ее мутантных форм, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса.

Результаты. Проведены исследования, подтверждающие структуру 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. УФ-спектр имеет выраженный максимум поглощения при измерении раствора субстанции в тетрагидрофуране в концентрации 0,10 мг/мл, в ИК спектре наблюдаются специфические полосы в области 4000–370 см⁻¹, что позволяет использовать УФ и ИК спектры для идентификации исследуемого вещества в субстанции. Также было установлено, что количество и взаимное расположение функциональных групп, интегральная интенсивность сигналов в спектре ¹H-ЯМР, а также строение углеродного скелета, соответствуют структуре 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Результаты изучения механизма действия показали, что исследуемое соединение является эффективным ингибитором ОТ ВИЧ-1 дикого типа с константой ингибирования 0,2 мМ, а также ингибитором фермента (мутация G190A) с константой ингибирования 8 мМ; фермента (мутация Y181C) с константой ингибирования 10 мМ, а также ингибитором ОТ (мутация L100I, K103N, V106A) и двойном мутанте K103N/Y181C с константой ингибирования более 20 мМ.

Заключение. В результате проведенных рентгеноструктурного, элементного, ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР анализов была подтверждена структура 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Показана возможность применения УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии, а также термических анализов для подтверждения подлинности при входном контроле качества 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Разработанные методы могут быть использованы в контроле качества и включены в проект НД на исследуемую субстанцию. Исследования механизма действия соединения в отношении ОТ ВИЧ-1 показали, что данное соединение относится к группе ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ-1.

Ключевые слова: 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил; идентификация; рентгеноструктурный анализ; термический анализ, элементный анализ; УФ-спектроскопия; ИК-спектроскопия; ЯМР-спектроскопия; механизм действия; обратная транскриптаза ВИЧ-1

Сокращения: ТГА – термогравиметрический анализ; ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия; ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ОТ – обратная транскриптаза; ННИОТ – ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы

Для цитирования: Е.А. Джайн (Корсакова), Д.В. Демченко, А.А. Озеров, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, В.Ю. Балабаньян. Характеризация и исследование механизма действия 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. *Фармация и фармакология*. 2021;9(2):114-129. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-114-129

© Е.А. Джайн (Корсакова), Д.В. Демченко, А.А. Озеров, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, В.Ю. Балабаньян, 2021

For citation: E.A. Jain (Korsakova), D.V. Demchenko, A.A. Ozerov, M.N. Makarova, V.G. Makarov, V.Yu. Balabanyan. Characterisation and study of 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil mechanism of action. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(2):114-129. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-114-129

CHARACTERISATION AND STUDY OF 1-[2-(2-BENZOYLPHENOXY) ETHYL] -6-METHYLURACIL MECHANISM OF ACTION

E.A. Jain (Korsakova)¹, D.V. Demchenko², A.A. Ozerov³, M.N. Makarova²,
V.G. Makarov², V.Yu. Balabanyan¹

¹ Moscow State University named after M.V. Lomonosov

Bldg. 1, 27, Lomonosov Ave., Moscow, Russia, 119991

² Closed joint-stock company "Saint Petersburg Institute of Pharmacy",

Bldg. 245, 3, Zavodskaya St., Vil. Kuzmolovsky, Vsevolozhsky district, Leningrad region, Russia, 188663

³ Volgograd State Medical University,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: ekaterina.korsa@gmail.com

Received 30 Jan 2021

Accepted 10 Apr 2021

The aim of the study is to identify 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil using various methods of analysis, as well as to study its action mechanism against wild-type and mutant forms of HIV-1 reverse transcriptase (RT).

Materials and methods. To characterize the structure of the test substance, a few kinds of analysis (X-ray diffraction, elemental, thermal) as well as a few kinds of spectroscopy (UV, IR, and NMR) have been used. The study of the action mechanism of the compound as a potential drug was carried out by evaluating the inhibitory activity against HIV-1 RT wild-type and its mutant forms corresponding to drug-resistant viral strains.

Results. The studies have been carried out to confirm the structure of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. The UV spectrum has a pronounced absorption maximum when measuring a solution of the substance in tetrahydrofuran at the concentration of 0.10 mg/ml. In the IR spectrum, there are specific bands in the range of 4000-370 cm⁻¹. These factors make it possible to use UV and IR spectra to identify the test compound in the substance. It has also been established that the number and mutual arrangement of functional groups, the integrated intensity of signals in the ¹H-NMR spectrum, as well as the structure of the carbon skeleton, correspond to the structure of 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil. The results of studying the action mechanism showed that the test compound is an effective inhibitor of wild-type HIV-1 RT with an inhibition constant of 0.2 μM, as well as an enzyme inhibitor (mutation G190A) with an inhibition constant of 8 μM; enzyme (mutation Y181C) with an inhibition constant of 10 μM, as well as a reverse transcriptase (RT) inhibitor (mutation L100I, K103N, V106A) and a double mutant K103N / Y181C with an inhibition constant of more than 20 μM.

Conclusion. As a result of the performed X-ray structural, elemental, ¹H-NMR and ¹³C-NMR analyzes, the structure of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil has been confirmed. The possibility of using UV, IR and NMR spectroscopy, as well as thermal analyzes to confirm the authenticity during the verification of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, has been shown. The developed methods can be used in the quality control and included in the draft of practice guidelines for the investigated substance. The studies of the action mechanism of the compound of HIV-1 RT reverse transcriptase have shown that this compound belongs to the group of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) of HIV-1.

Keywords: 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil; identification; X-ray structural analysis; thermal analysis, elemental analysis; UV spectroscopy; IR spectroscopy; NMR spectroscopy; action mechanism; HIV-1 reverse transcriptase

Abbreviations: TGA – thermal gravimetric analysis; DSC – differential scanning calorimetry; IR spectroscopy – infrared spectroscopy; NMR spectroscopy – nuclear magnetic resonance spectroscopy; HIV – human immunodeficiency virus; RT – reverse transcriptase; NNRTIs – non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия ВИЧ-инфекции является самой актуальной и до сих пор не решенной проблемой мирового здравоохранения. Несмотря на то, что по данным Роспотребнадзора удалось снизить темпы прироста новых случаев ВИЧ-инфекции с 13,4% в 2012 году до 0,9% в 2017 году, эпидемиологическая ситуация остается тяжелой.¹ Так, в 2019 г. в Российской Федерации было выявлено, по предварительным данным,

94 668 новых случаев ВИЧ-инфицирования², а число лиц, живущих с ВИЧ, в мире достигало приблизительно 38,0 миллионов³.

ВИЧ-инфекция продолжает оставаться неизлечимым заболеванием. Опасность его объясняется уникальным воздействием вируса на организм чело-

¹ Противодействие ВИЧ и другим социально опасным заболеваниям: некоторые показатели за 6 лет, Правительство Российской Федерации, 11.04.2018 г. URL: <http://government.ru/info/32200/>

² Справка ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2019 г. (подготовлена в Федеральном научно-методическом центре по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). URL: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/02/VICH-infektsiya-v-Rossijskoj-Federatsii-na-31.12.2019.pdf>.

³ Информационный Бюллетень ВОЗ ВИЧ/СПИД, URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>

века: репродукция вируса в клетках иммунной системы не только делает вирус малоуязвимым для действия последней, но и способствует развитию других инфекционных заболеваний [1]. Как следствие, у ВИЧ-инфицированных часто развиваются бактериальные и вирусные заболевания, вызываемые оппортунистическими инфекциями – пневмонии, герпесвирусные, а также онкологические заболевания, поражения сердечно-сосудистой, желудочно-кишечной и нервной систем. Именно эти явления служат основной причиной смерти ВИЧ-инфицированных [2]. Современный подход к антиретровирусной терапии направлен на увеличение продолжительности и повышения качества жизни больных [3]. В настоящее время лучшим методом терапии ВИЧ-инфекции является высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ), которая подразумевает использование нескольких действующих веществ с разными механизмами действия одновременно: не менее одного препарата из группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) ВИЧ в сочетании с ненуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ и/или ингибиторами других классов [4]. Препараты ВААРТ неустанно улучшаются, а разработка новых фармакологических единиц набирает обороты по причине многообразия побочных эффектов и токсичности, а также развития резистентности штаммов к лекарственным средствам [5, 6].

ННИОТ – перспективная группа антиретровирусных препаратов, которые являются органическими соединениями различных классов со значительной долей ароматических гидрофобных радикалов [7]. Это неконкурентные ингибиторы фермента, взаимодействующие с аллостерическим центром обратной транскриптазы, влияющие на мобильность и гибкость центра полимеризации, что, в конечном итоге, приводит к снижению эффективности фермента [8-10]. Ингибирующее действие препаратов проявляется несколькими вариантами, например, связывание невирапина вызывает трансляцию положения гидрофобных остатков, и, как результат, третичная структура протеина обратной транскриптазы раздвигается [11]. Также оно проявляется за счет влияния на динамические процессы ОТ с нуклеиновой матрицей [12-14]. Существует два поколения препаратов ННИОТ. К первому классу относят невирапин, эфавиренц и делавердин, а ко второму – этравирин и рилпивириин [15, 16]. Однако, несмотря на медленное развитие резистентности к ННИОТ второго поколения, в практике уже встречаются мутантные штаммы ВИЧ, позволяющие вирусу противостоять действию этих препаратов [17].

В настоящее время подходы к разработке новых ННИОТ включают: повышение позиционной адаптивности и конформационной гибкости в кармане связывания лекарственного средства [18]; нацеливание на консервативные остатки в связывающем кармане [19, 20]; улучшение физико-химических свойств с по-

мощью пролекарств или введение солюбилизирующих групп [21].

В результате многолетних исследований, проведенных на кафедре фармацевтической и токсикологической химии, а также в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в сотрудничестве с учеными Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта ФАНО, вирусологами США и Западной Европы (фармацевтическая компания ImQuestBioSciencesInc., США; Rega Institute for Medical Research, Бельгия), был открыт новый класс высокоактивных ненуклеозидных ингибиторов вирусной репродукции [22, 23].

Среди прочих соединений 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил (рисунок 1) показал высокую способностью подавлять репродукцию ВИЧ-1 *in vitro*. Соединение также подавляло репродукцию мутантных штаммов ВИЧ-1 и имело профиль резистентности, близкий к таковому эфавиренца [24, 25].

Полученные результаты доклинических исследований позволяют рассматривать предлагаемое соединение в качестве перспективного лекарственного кандидата, предназначенного для лечения ВИЧ-1 инфекции.

По мере развития фармации предъявляются все более высокие требования к обеспечению качества и безопасности лекарственных средств. В связи с этим возникает необходимость использования в фармацевтическом анализе методов исследования, позволяющих достигать максимальной специфичности и достоверности результатов [26]. Таким образом, в проекты нормативной документации на фармацевтические субстанции все шире вводятся требования использования УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии и термического анализа.

ЦЕЛЬ. Идентификация 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила с использованием рентгеноструктурного, термических и элементного анализов, УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопий, а также исследование его механизма действия в отношении дикого типа и мутантных форм обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись образцы фармацевтической субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил, предоставленные ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Изучаемая субстанция представляет собой кристаллический порошок, практически нерастворимый в воде и органических растворителях.

Рентгенодифракционное исследование

Рентгенодифракционное исследование соединения проводили на дифрактометре Bruker APEX II (Bruker, Германия). Структуры были расшифрованы прямым методом и уточнены методом наименьших квадратов (МНК) в анизотропном полноматричном приближении по величине структурного фактора

(F^2_{hkl}). Атомы водорода были рассчитаны геометрически и уточнены с наложением ограничений на длины связей C-H и их изотропные параметры смещений. Все расчеты проводили с использованием программ ShelXL, SHELXT и Olex-2^{4,5,6}.

Рентгенофазовое исследование

Для идентификации возможных полиморфов было проведено рентгенофазовое исследование. Исследования состава образца 1-[2-(2-бензоилфеноксид)этил]-6-метилурацил методом порошковой рентгеновской дифракции выполняли на дифрактометре Bruker D8 Advance (Bruker, Германия), оборудованном никелевым β -фильтром и системой управляемых щелей для монохроматизации ($I[\text{CuK}\alpha] = 1.5418 \text{ \AA}$), и позиционно-чувствительным детектором LynxEye, в угловом диапазоне 4-60° с шагом 0,02° по углу. Определенное количество субстанции было размолото в ступке и нанесено на кремневую пластину в виде взвеси в гептане, и затем полученный образец был высушен. После получения дифракционных данных по результатам монокристалльного исследования была рассчитана теоретическая дифрактограмма и проведено ее сравнение с экспериментом. Зависимость фона от угла 2θ моделировалась с помощью серии полиномов Чебышева до пятого порядка. Для учета особенностей прибора использовали метод фундаментальных параметров, определенных заранее по образцу борида лантана LaB_6 . Все расчеты проводили с помощью программы TOPAS⁷.

Термогравиметрический анализ и дифференциальная сканирующая калориметрия

Для определения термических свойств субстанции были применены методы термического анализа: термогравиметрический анализ (ТГА) и дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). ТГА исследуемого соединения проводили на приборе Derivatograph-C (MOM, Венгрия) при скорости нагревания 10°C/мин. Полученные данные графически фиксировали в виде кривых: термогравиметрических (ТГ), дифференциальных термогравиметрических (ДТГ) и дифференциально термических (ДТА). Кривая ТГ на дериватограмме показывает изменение массы образца в период исследования, а кривая ДТГ показывает скорость разложения и полезна для точной оценки

шагов разложения. ДТА отражает дифференцирование тепловых эффектов, содержит информацию об эндо- и экзотермических максимумах и используется для качественной оценки дериватограммы. Обработку экспериментальных данных ТГА выполняли с помощью программы Winder C. Исследования методом ДСК проводили на приборе DSC-822e (Меттлер-Толедо, Швейцария) в диапазоне температур от -145 до +260°C, при скорости нагревания 10°C/мин. Все расчеты проводили с помощью программы STAR^e.

Элементный анализ

Элементный анализ проводили на автоматическом CHN-анализаторе VarioMicrocube (Elementar, Германия). В качестве стандартного образца использовали ацетанилид (71,098% C; 6,71% H, 10,36% N). Газ-носитель – гелий, окислитель – кислород марки ОСЧ. Окислительную колонку заполняли оксидом меди, восстановительную – проволочной медью. Сожжение навесок стандартного образца и субстанции 1-[2-(2-бензоилфеноксид)этил]-6-метилурацила, предварительно отобранных в оловянные капсулы и взвешенных на ультрамикровесах фирмы XP6 (MettlerToledo, Швейцария) с точностью до 0,001 мг, проводили при температуре 950°C. Восстановление продуктов сожжения на проволочной меди проводили при 550°C. Газообразные продукты деструкции разделяли на хроматографической колонке и детектировали в катарометре. Обсчет результатов определения проводился автоматически по программе, прилагаемой к прибору.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях

Регистрацию спектров в УФ-видимом диапазоне проводили на спектрометре Cary 4000 (Varian, США) путем измерения поглощения излучения в кювете с раствором субстанции в концентрации 0,1 мг/мл. Образец растворяли в мерной колбе в тетрагидрофуране (ТГФ, квалификации для спектроскопии, «Компонент-реактив»), а также в диметилсульфоксиде (ДМСО, квалификации для УФ-ИК-ВЭЖХ-ГПХ, Panreac). Измерения полученных растворов проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1,00 мм (Hellma). Данные обрабатывали в программном обеспечении спектрометра WinUV (Varian).

Спектрометрия в инфракрасной области

Экспериментальную работу проводили на ИК-Фурье спектрометре Vertex 70 (BrukerOptikGmbH, Германия). Образцы для записи спектров готовили методом прямого прессования с оптически чистым калия бромидом, измеряли спектры в режиме пошагового сканирования в диапазоне 4000–370 см⁻¹. Для регистрации спектра поглощения в ближней ИК-области применяли приставку диффузного отражения (Shimadzu, Япония). Все данные обрабатывали в управляющем программном обеспечении спектрометра OPUS (Bruker, Германия).

⁴ Dolomanov O.V., Bourhis L.J., Gildea R.J., Howard J.A.K., Puschmann H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program // J. Appl. Cryst. – 2009. – V. 42. – P. 339–341. DOI: 10.1107/S002188980804272

⁵ Sheldrick G.M. SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination. Acta Cryst. 2015. – V. A71. – P. 3–8. DOI: 10.1107/S2053273314026370

⁶ Sheldrick G.M. Crystal structure refinement with SHELXL // Acta Cryst. – 2015. – V. C71. – P. 3–8. DOI: 10.1107/S2053229614024218.

⁷ Bruker AXS: TOPAS V4: General profile and structure analysis software for powder diffraction data. – User's Manual, Bruker AXS, Karlsruhe, Germany, 2009. – 72 p.

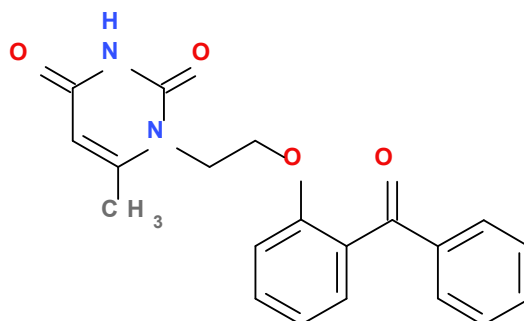


Рисунок 1 – Структурная формула 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

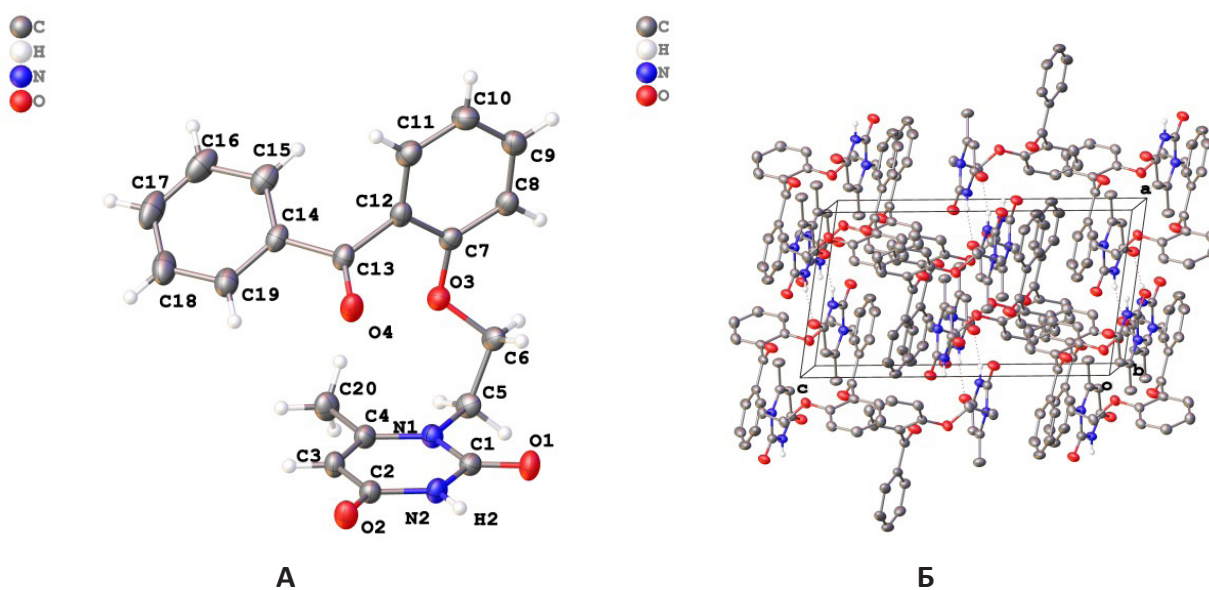


Рисунок 2 – Визуализация молекулы 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Примечание: (А) – Общий вид молекулы и (Б) – кристаллическая упаковка

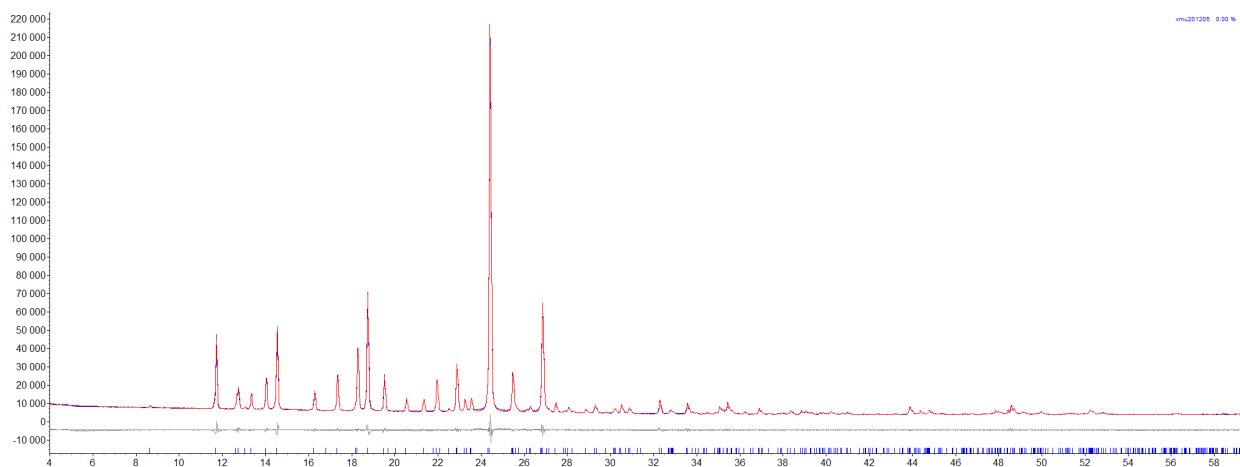
Рисунок 3 – Общий вид дифрактограммы 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила
(синяя линия – эксперимент, красная – расчет, серая – разностная кривая)

Таблица 1 – Основные кристаллографические данные и параметры уточнения структуры 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Брутто формула	$C_{20}H_{18}N_2O_4$
Молекулярная масса	350,36
Температура, К	120
Пространственная группа, Z	$P2_1/n$, 4
Параметры ячейки:	4
a, Å	8,1352(7)
b, Å	13,7868(11)
c, Å	15,0957(12)
a, °	90
b, °	98,443(2)
c, °	90
Объем ячейки, V, Å ³	1674,8(2)
Плотность, d _{выч} , г·см ⁻³	1,390
Коэффициент поглощения, m, см ⁻¹	0,98
Фактор структуры F(000)	736
Размер кристаллов, мм	0,25 × 0,17 × 0,14
Кристаллическая форма, цвет	Призмы, коричневый
2q _{max} , °	61,36
Число измеренных отражений	22276
Число независимых отражений	5160
Число отражений с I > 2σ(I)	3182
Количество уточняемых параметров [I > 2σ(I)]:	286
R ₁	0,0511
wR ₂	0,1258
GOF	1,000
Остаточная электронная плотность, e·Å ⁻³ (r _{min} /r _{max})	0,344/-0,212

Таблица 2 – Дифракционные максимумы образца 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Угол 2q, °	Межплоскостное расстояние (d), Å	Относительная интенсивность	Угол 2q, °	Межплоскостное расстояние (d), Å	Относительная интенсивность
4,706	18,7609	0,30%	35,156	2,55063	1,30%
8,676	10,18426	0,50%	35,439	2,53089	2,90%
11,735	7,53531	19,00%	36,223	2,47787	0,70%
12,765	6,92951	5,40%	36,892	2,43449	1,40%
13,074	6,76618	0,50%	37,367	2,4046	0,30%
13,358	6,62292	4,00%	37,799	2,37813	0,30%
14,048	6,29941	8,10%	37,967	2,368	0,50%
14,555	6,08082	21,20%	38,364	2,34439	1,00%
16,287	5,43779	5,20%	38,853	2,31603	1,00%
17,352	5,10653	9,30%	39,073	2,30348	0,90%
18,292	4,84624	16,30%	39,292	2,29113	0,50%
18,746	4,7297	30,70%	39,86	2,25981	0,40%
19,518	4,54444	9,50%	40,209	2,24098	0,70%
20,544	4,31971	3,60%	40,775	2,21116	0,20%
21,352	4,15813	3,10%	40,996	2,19974	0,60%
21,957	4,0448	8,10%	41,818	2,15838	0,10%
22,549	3,93992	0,50%	41,767	2,1609	0,10%
22,882	3,88337	12,00%	42,364	2,13184	0,30%
23,253	3,82218	3,00%	43,254	2,09001	0,10%
23,552	3,77445	3,10%	43,892	2,06109	1,90%
24,415	3,64283	100,00%	44,381	2,03952	1,00%
25,463	3,49533	10,20%	44,793	2,0217	1,10%
26,287	3,38752	1,30%	45,324	1,99923	0,20%
26,854	3,31735	27,00%	46,412	1,95488	0,30%

Угол 2q, °	Межплоскостное расстояние (d), Å	Относительная интенсивность	Угол 2q, °	Межплоскостное расстояние (d), Å	Относительная интенсивность
27,469	3,24438	2,30%	46,735	1,94213	0,10%
28,068	3,1765	1,30%	47,417	1,91577	0,10%
28,864	3,09073	1,00%	47,931	1,89643	0,40%
29,282	3,04751	2,10%	47,989	1,89426	0,80%
29,804	2,99533	0,20%	48,597	1,87199	2,10%
30,239	2,95321	1,20%	49,131	1,85285	0,50%
30,520	2,92669	2,40%	49,999	1,82271	0,70%
30,865	2,89478	1,50%	51,332	1,77848	0,30%
31,227	2,86196	0,10%	52,285	1,74826	0,90%
32,285	2,77059	3,60%	52,831	1,73149	0,50%
32,802	2,72812	1,10%	56,284	1,63318	0,30%
33,576	2,66693	2,60%	57,546	1,60032	0,10%
33,998	2,63483	0,40%	58,432	1,57815	0,10%
34,508	2,59705	0,50%	59,064	1,56277	0,20%
34,869	2,57093	0,40%			

Таблица 3 – Результаты элементного анализа 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Фармацевтическая субстанция	C, %(M±σ), n=2	H, %(M±σ), n=2	N, %(M±σ), n=2
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	68,22±0,08	5,24±0,03	7,81±0,04
Теоретический расчет	68,60	5,11	8,00

Таблица 4 – Характеристические максимумы полос поглощения образца субстанции (в см⁻¹) в ближней и средней ИК области 8000–370 см⁻¹

Фармацевтическая субстанция	Максимумы поглощения, см ⁻¹
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	4002,5; 3940,0; 3914,1; 3896,3; 3861,3; 3847,4; 3831,5; 3811,5; 3788,7; 3775,7; 3741,0; 3707,2; 3697,4; 3682,9; 3653,6; 3640,3; 3623,9; 3318,4; 3186,1; 3157,8; 3080,0; 3060,6; 3036,4; 3014,2; 2967,7; 2933,3; 2900,5; 2881,0; 2864,3; 2792,1; 2587,1; 2552,3; 2470,9; 2443,9; 2427,6; 2386,4; 2354,8; 2341,2; 2303,6; 2240,7; 2189,0; 2105,5; 2090,1; 2075,2; 2038,8; 2016,0; 1987,2; 1951,2; 1924,4; 1888,1; 1860,0; 1823,9; 1701,3; 1665,7; 1613,6; 1596,2; 1578,6; 1531,9; 1483,0; 1473,8; 1462,9; 1449,1; 1442,1; 1427,0; 1409,3; 1393,1; 1358,1; 1313,7; 1292,2; 1270,8; 1242,8; 1179,2; 1151,7; 1121,2; 1107,8; 1075,2; 1062,4; 1043,3; 1025,0; 996,0; 982,0; 971,9; 959,6; 944,6; 929,9; 894,2; 869,8; 852,2; 833,3; 807,7; 775,5; 766,4; 755,3; 731,4; 717,1; 704,2; 689,1; 634,1; 609,9; 567,6; 533,5; 509,0; 461,9; 435,9; 418,2; 376,7

Таблица 5 – Результаты анализа ЯМР ¹H, ¹³C спектров 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Фармацевтическая субстанция	Положение	Группа	Химический сдвиг, δ ¹ H, ppm	Химический сдвиг, δ ¹³ C, ppm
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	1	Ar, α-CH	7,21 д	113,16 с
	2	Ar, β-CH	7,10 т	121,61 с
	3	Ar, β-CH	7,50 т	132,23 с
	4	Ar, α-CH	7,29 д	128,94 с
	5	Ar, ipso-C	–	155,71 с
	6	Ar, ipso-C	–	129,13 с
	7	C=O	–	196,05 с
	9	Ar, ipso-C	–	136,92 с
	10,14	Ar, α-CH	7,67 д	129,71 с
	11,13	Ar, β-CH	7,46 т	129,08 с
	12	Ar, γ-CH	7,60 т	134,07 с
	16	O-CH ₂	4,18 т	66,25 с
	17	N-CH ₂	3,85 т	43,47 с
	19	C=O	-	151,82 с
	20	NH	11,10 с	-
	21	C=O	-	162,76 с
	22	=CH	5,12 с	101,55 с
	23	=C	-	154,49 с
	26	CH ₃	1,82 с	19,88 с

Примечание: обозначения: т – триплет, с – синглет, д – дуплет, к – квартет

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Экспериментальную работу по определению ЯМР спектров исследуемого вещества проводили на ЯМР-спектрометре Bruker Avance-IIIHD 500 (Bruker, Германия). Навеску 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила, массой 20 мг, растворяли в 600 мкл дейтерированного диметилсульфоксида (DMSO-d₆). Полученный раствор без дальнейшей обработки "asis" помещали в ЯМР-спектрометр для регистрации ¹H, ¹³C, HS-NMQC и HS-NMBC спектров. Регистрацию спектров ¹H-ЯМР проводили при рабочей частоте 500,13 МГц, ¹³C при рабочей частоте 125,76 МГц. Для подтверждения строения углеродного скелета потенциального продукта регистрировали спектры ¹³C в фазочувствительном варианте JMOD (CH₃, CH – сигналы с отрицательными фазами, CH₂, C – сигналы с положительными фазами), а также инверсные гетероядерные корреляции HS-NMQC (прямые взаимодействия C-H), HS-NMBC (дальние взаимодействия C-H). Отнесение в спектре ¹³C-JMOD производили на основе анализа двумерных инверсных корреляций HS-NMQC и HS-NMBC. Для подтверждения строения углеродного скелета были зарегистрированы спектры ЯМР ¹³C в фазочувствительном варианте JMOD (сигналы C, CH₂ направлены вверх, сигналы CH, CH₃ вниз), HS-NMQC, HS-NMBC.

Исследование механизма действия *in vitro*

Изучение механизма действия 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила проводили путем оценки ингибирующей активности в отношении ОТ ВИЧ-1 дикого типа и ее мутантных форм, соответствующих лекарственно-устойчивым штаммам вируса, с использованием радиоактивно-меченных нуклеотидов. Для экспрессии гетеродимера дикого типа обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовались клетки *E. coli* штамма M15[pRep4] (Qiagen, Германия), которые трансформировали плазмидой pBHRT-PROT. Для получения мутантных форм обратной транскриптазы ВИЧ-1 использовались клетки *E. coli* штамма Rosetta DE3 (Qiagen, Германия), трансформированные целыми плазмидами.

В ходе исследования ингибирующей активности 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в отношении мутантных форм ОТ ВИЧ-1 использовали панель мутантных форм ОТ ВИЧ-1 с аминокислотными заменами L100I, K103N, V106A, Y181C, G190A, так как они широко представлены у пациентов с устойчивостью к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ), приводят к резистентности посредством разных механизмов и являются принятыми при определении профиля резистентности новых анти-ВИЧ препаратов. Дополнительно была исследована ингибирующая активность 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в отношении двойного мутанта с двумя наиболее часто встречающимися заменами K103N и Y181C. В качестве по-

ложительного контроля ингибитора ОТ ВИЧ-1 была использована субстанция препарата Эфавиренз. Константу ингибирования для субстанции определяли по методу Диксона, то есть на основании зависимости обратной скорости ферментативной реакции в присутствии ингибитора от его концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий вид молекулы и кристаллической упаковки показан на рисунке 2. Основные кристаллографические данные и параметры уточнения представлены в таблице 1.

Общий вид дифрактограммы показан на рисунке 3, основные характеристики дифракционных максимумов приведены в таблице 2.

Уточнение расходимости между экспериментальной и теоретическими данными показало, что образец соответствует одной кристаллической фазе 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Других кристаллических фаз не обнаружено.

Полученные данные термического анализа субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил приведены на рисунках 4–6.

Процесс потери массы начинается при температуре 25–50°C. Снижение массы в данном температурном интервале составляет порядка 1%, что связано с удалением остаточных растворителей или влаги в образце. В интервале температур 184–227°C потеря массы составляет порядка 3%, что связано с разрушением кристаллогидрата. После 300°C с субстанцией начинают происходить термические изменения, заканчивающиеся термоокислительной деструкцией. На ДТГ кривой пик с вершиной при 203°C соответствует температуре, при которой удаляется кристаллогидратная вода. На кривой ДТА эндотермический пик с вершиной при 230°C соответствует температуре плавления образца.

Установлено, что кристаллизация 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила наблюдается при температуре 191°C (рисунок 5). Температура плавления и теплота плавления при повторном нагревании несколько ниже, чем на первом, что связано с различными условиями формирования кристаллической фазы.

На термограмме фиксировали эндотермический пик с минимумом при 195°C. Он связан с удалением кристаллизационной воды. Температура плавления кристаллической фазы составила 227°C (рисунок 6).

Результаты элементного анализа представлены в таблице 3.

Исходя из полученных результатов, приведенных в таблице 3, можно заключить, что содержание определяемых элементов 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила соответствует теоретическому содержанию определяемых элементов, рассчитанных исходя из брутто-формулы C₂₀H₁₈N₂O₄.

Спектры 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в УФ-видимом диапазоне представлены на рисунках 7, 8.

Таблица 6 – Ингибиторная активность ННИОТ в отношении ОТ дикого (WT) и мутантных штаммов ВИЧ-1 *in vitro*

Обратная транскриптаза	Константа ингибирования (K_i , μM)	
	1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил	Эфавиренз
Дикий тип	0,23 \pm 0,04	0,011 \pm 0,002
L100I	>20 ^a	0,14 \pm 0,01
K103N	>20 ^a	0,52 \pm 0,1
V106A	>20 ^a	0,11 \pm 0,01
Y181C	12 \pm 2,4	0,053 \pm 0,006
G190A	8,3 \pm 0,4	0,091 \pm 0,008
K103N/Y181C	>20 ^a	0,52 \pm 0,08

Примечание: ^aИсследуемое вещество, 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, ингибирует мутантные формы ОТ ВИЧ-1 L100I, K103N, V106A и двойной мутант K103N/Y181C в концентрации 20 мкМ с эффективностью 38%, 33%, 22% и 35% соответственно. Усиления ингибирования данных мутантных форм ОТ ВИЧ-1 при более высоких концентрациях 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила не наблюдается, что скорее всего связано с достижением предела растворимости соединения в реакционной смеси, содержащей 10% ДМСО

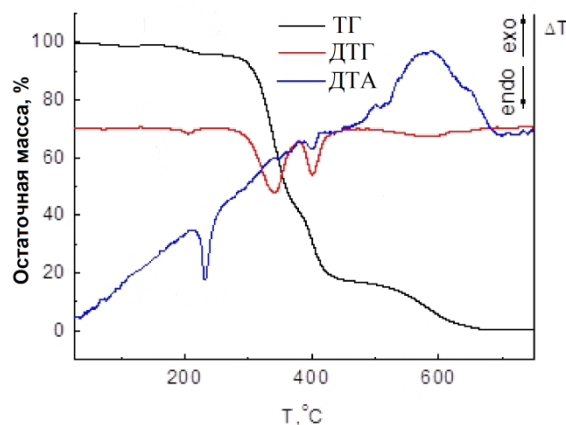


Рисунок 4 – Дериватограмма 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

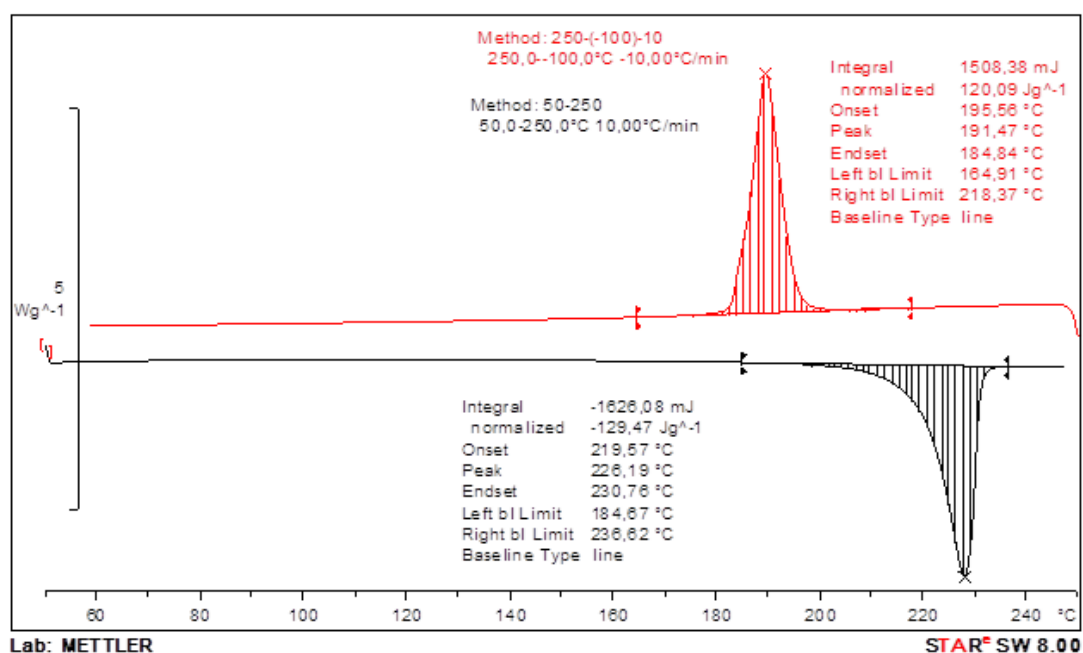


Рисунок 5 – Термограмма ДСК, полученная при сканировании 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

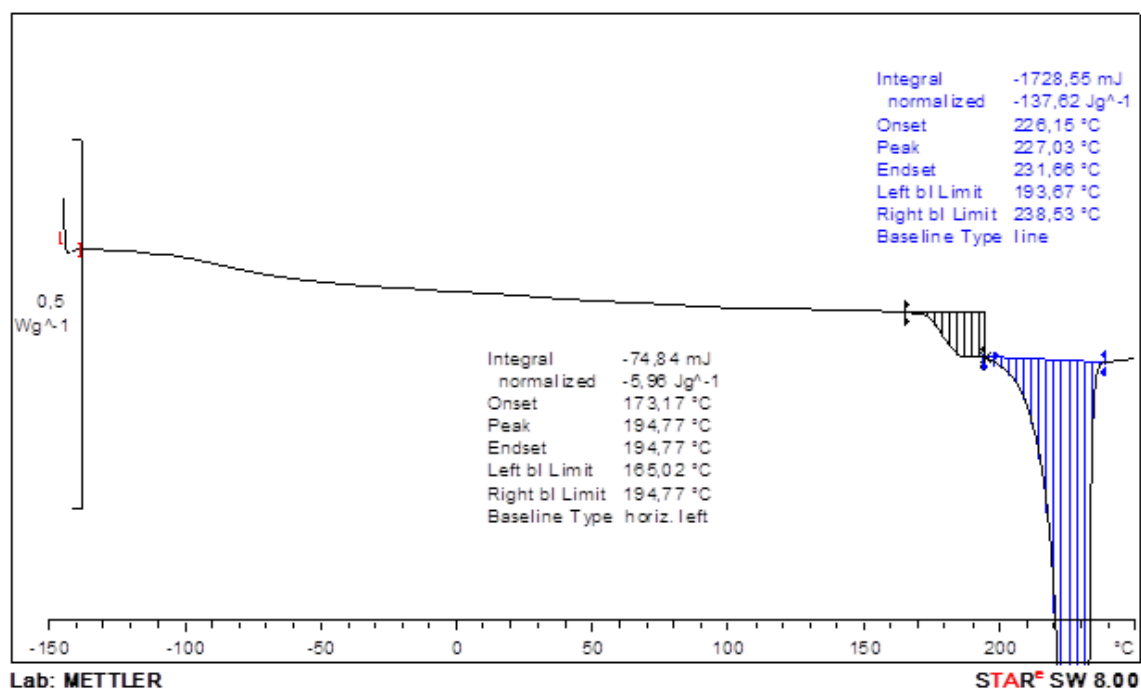


Рисунок 6 – Термограмма ДСК, полученная при сканировании
1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

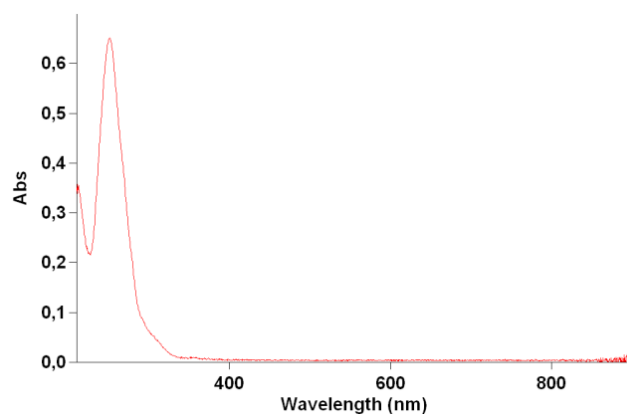


Рисунок 7 – Спектр поглощения в области 210–900 нм 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила
в тетрагидрофуране с концентрацией 0,1 мг/мл в кювете с длиной оптического пути 1,00 мм

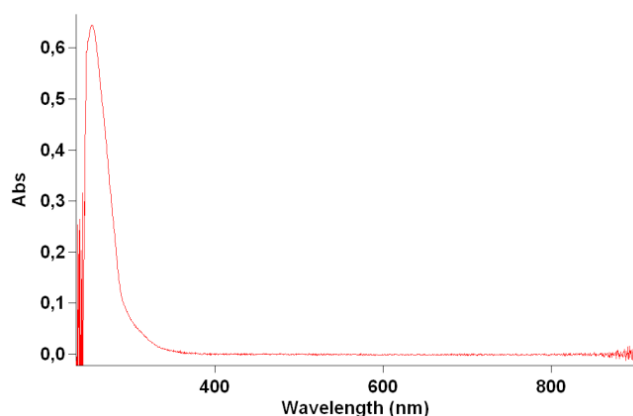


Рисунок 8 – Спектр поглощения в области 235–900 нм 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила
в диметилсульфоксиде с концентрацией 0,1 мг/мл в кювете с длиной оптического пути 1,00 мм

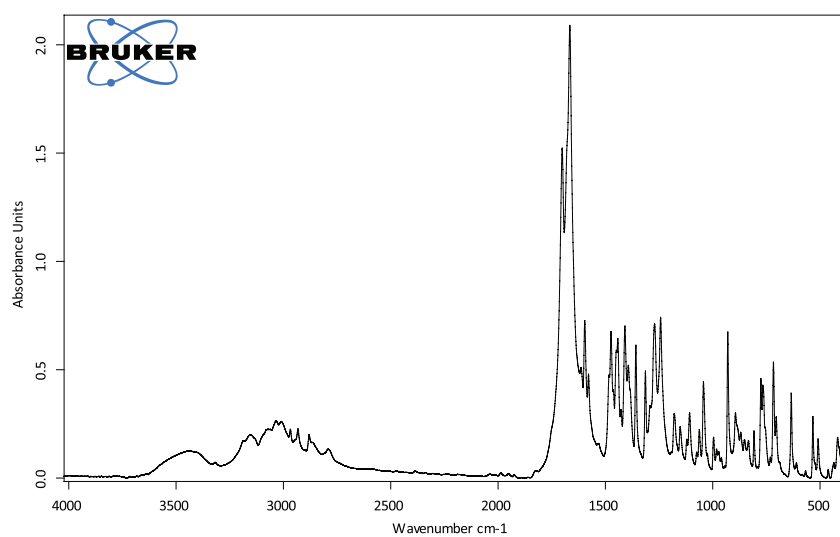


Рисунок 9 – ИК-спектр поглощения в области 4000–370 см⁻¹ 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в таблетках калия бромида

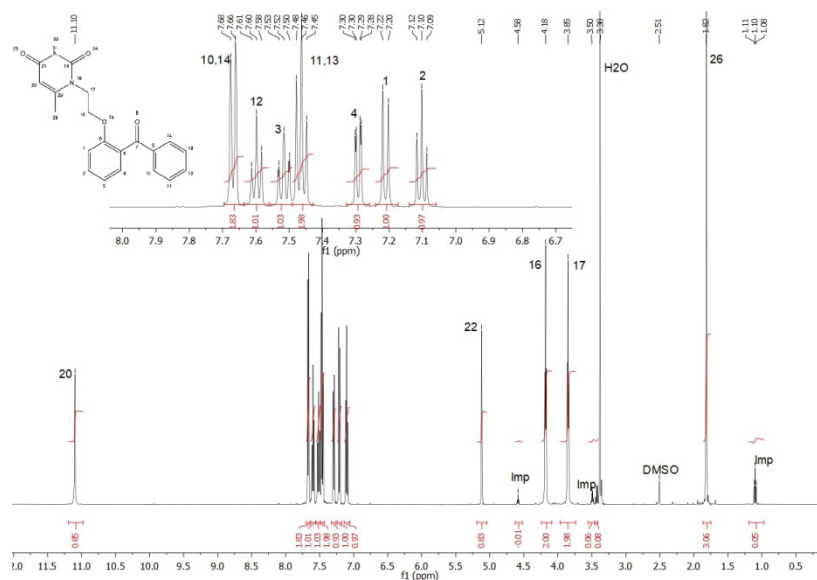


Рисунок 10 – ЯМР¹H спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

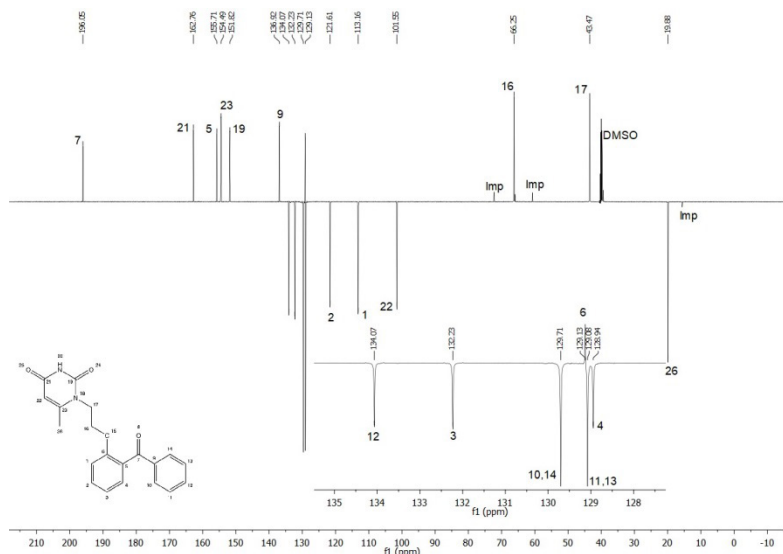


Рисунок 11 – ЯМР¹³C JMOD спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

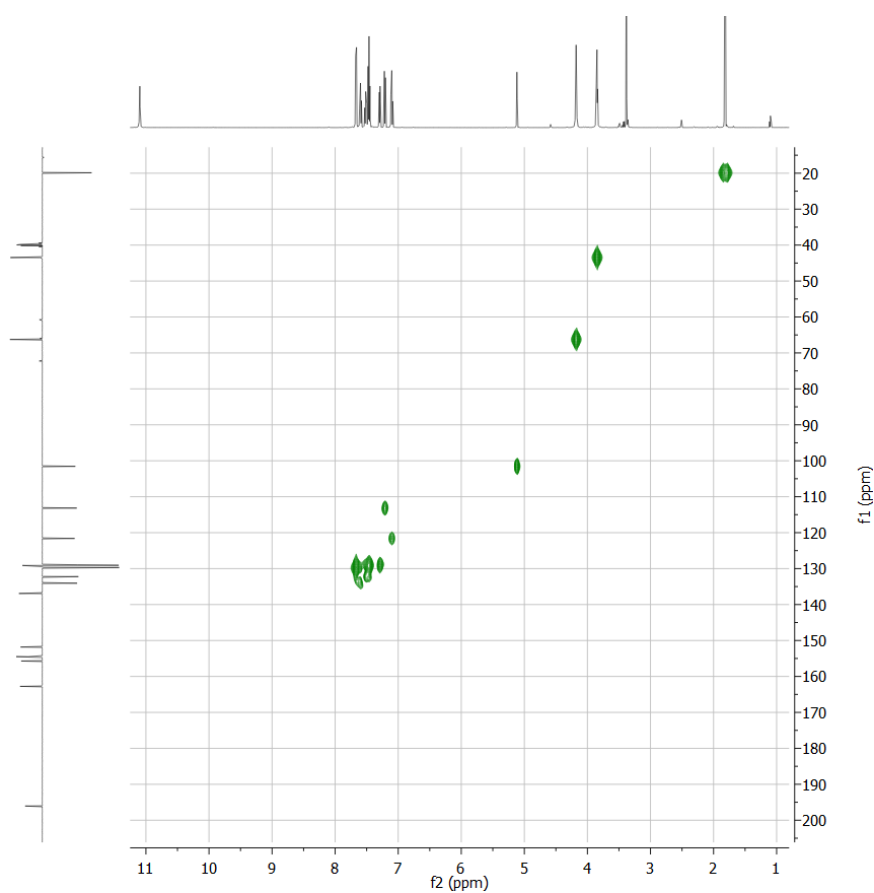


Рисунок 12 – ЯМР HS-NMQC спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

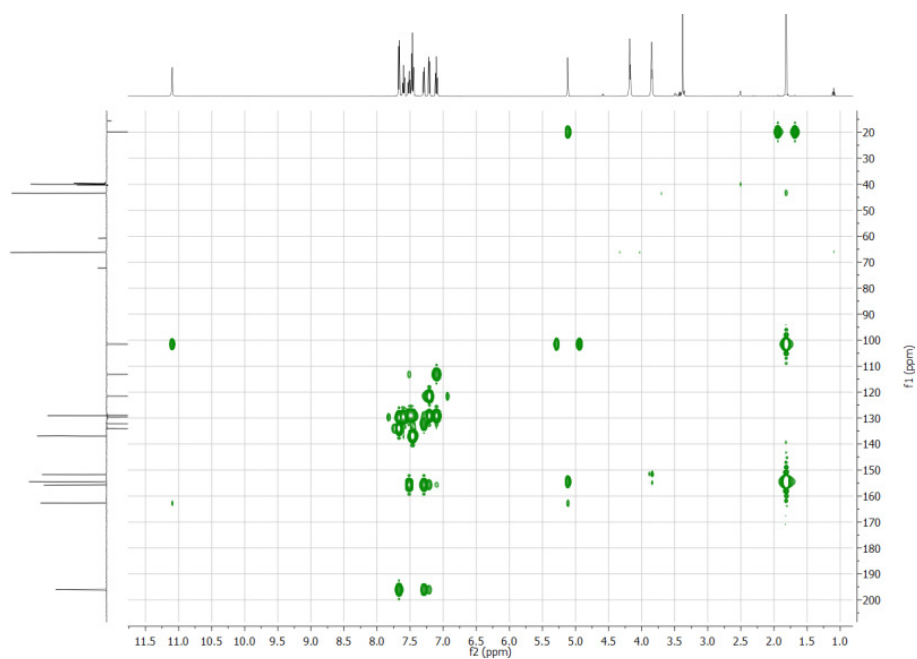


Рисунок 13 – ЯМР HS-NMBC спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

В спектрах виден максимум поглощения при 251,0 нм для раствора в ТГФ и 254,5 нм для раствора в ДМСО. При этом оптическая плотность для ДМСО возрастает гораздо быстрее, чем для ТГФ, поэтому в случае ТГФ возможно измерение от 210 нм. Для получения выраженного максимума поглощения субстанции в УФ-видимом диапазоне рекомендуются следующие условия измерения: раствор в тетрагидрофуране спектральной чистоты, концентрацией 0,10 мг/мл, измерение в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1,00 мм, регистрация спектра в диапазоне 210–900 нм, фон – чистый ТГФ.

На рисунке 9 приведен общий вид ИК-спектра поглощения образца в таблетках калия бромида.

В спектрах образца в ИК области наблюдается множество узких и характеристичных полос, которые сведены в таблицу 4. Кроме того, в спектре образца в KBr в районе 3400 см^{-1} присутствует широкая полоса, соответствующая влаге, поглощенной бромидом калия, поэтому она была исключена из рассмотрения.

Из-за сложности молекулы идентифицировать и однозначно отнести все сигналы к определенным функциональным группам не представляется возможным. Поэтому ИК-спектроскопия для данной молекулы может быть использована как дополнительная, наряду с ЯМР-спектроскопией.

Полученный спектр ЯМР ^1H анализируемого вещества представлен на рисунке 10.

Важнейшей характеристикой спектра ЯМР является химический сдвиг (δ), который зависит от структуры молекулы. Электронная плотность протонов в молекулах определяется характером химической связи и индукционными эффектами окружающих групп, вследствие чего экранирование протонов становится различным и их сигналы проявляются в разных областях спектра.

Произведено отнесение сигналов в спектре ^1H (рис. 10). Из спектра видно, что в образце присутствуют сигналы, относящиеся как к алифатическим фрагментам, так и к ароматическим кольцам. Также виден сигнал группы NH. В целом спектр основного продукта не противоречит предложенной структуре. Также в спектре ^1H в ароматической области присутствуют малоинтенсивные сигналы примесей в следовых количествах, которые из-за их низкого содержания невозможно идентифицировать.

Для подтверждения строения углеродного скелета были зарегистрированы спектры ЯМР ^{13}C в фазочувствительном варианте JMOD (сигналы C, CH_2 направлены вверх, сигналы CH, CH_3 вниз), HS-NMQC, HSNMBC. Эти спектры представлены на рисунках 11–13.

Произведено отнесение сигналов в спектре ^{13}C (рис. 11). Из спектра видно, что в образце присутствуют сигналы, относящиеся как к алифатическим фрагментам, так и к положениям в ароматических кольцах карбонильных групп. В целом, спектр 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила не противоречит пред-

ложенной структуре. Также видны сигналы минорных примесей. Содержание их в образце находится ниже предела обнаружения спектроскопии ЯМР ^{13}C .

По результатам интерпретации инверсных двумерных корреляционных спектров HS-NMQC и HS-NMBC (рис. 12, 13) было сделано полное отнесение сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C , подтверждено строение углеродного скелета продукта. Из рисунков 12, 13 также видно, что распределение двумерных корреляционных сигналов не противоречит предложенной структуре предполагаемого продукта. Результаты отнесения полос к функциональным группам молекул исследуемого вещества представлены в таблице 5.

Установлено, что количество и взаимное расположение функциональных групп, интегральная интенсивность из сигналов в спектре ^1H соответствует структуре 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Строение углеродного скелета соответствует структуре исследуемого соединения.

Современные инструментальные методы анализа позволяют всецело охарактеризовать фармацевтическую субстанцию, что крайне необходимо для ее стандартизации, разработки методов контроля качества и последующего их включения в проекты нормативной документации [26]. В данной работе мы продемонстрировали результаты рентгеноструктурного, элементного, термогравиметрического, ДСК анализов, УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила – соединения, разрабатываемого в качестве лекарственного кандидата для лечения ВИЧ-инфекции.

Полученные данные подтверждают ожидаемое строение молекулы: визуализация молекулы рентгенодифракционным исследованием, рассчитанная элементным анализом брутто-формула $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$, взаимное расположение функциональных групп и строение углеродного скелета на ЯМР-спектре соответствует ожидаемой структуре соединения. Выявленные характерные пики УФ- и ИК-спектров указывают на наличие основных функциональных групп, свойственных 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацилу. Результаты рентгенофазового исследования свидетельствуют о наличии одной кристаллической фазы образца, что согласуется с данными термических методов анализа, установивших отсутствие полиморфов субстанции. В ходе ЯМР-анализа были обнаружены малоинтенсивные сигналы примесей в следовых количествах, однако их содержание оказалось крайне малым, что свидетельствует о надлежащем синтезе и высокой степени очистки субстанции.

Важнейшим этапом исследования стало изучение механизма действия 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в отношении ОТ ВИЧ-1.

Было показано, что 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил является эффективным ингибитором ОТ как дикого штамма ВИЧ-1, так и ряда ее мутантных форм (таблица 6). Активность объекта

испытаний зависит от мутаций в сайте связывания нуклеозидных ингибиторов ОТ, действующих по неконкурентному механизму.

Результаты, представленные в таблице 6, подтверждают, что объект исследования относится к группе нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ-1. Следует отметить, что эфавиренз ингибировал полимеразную активность ОТ в более низких концентрациях, чем 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, при равной противовирусной активности *in vitro*.

Высокая изменчивость ВИЧ приводит к многочисленным заменам аминокислот в ОТ, формирующим резистентность вируса к ННИОТ [27]. Согласно литературным данным [28], большинство выявленных мутаций локализовано в гидрофобном кармане, центре связывания ННИОТ ВИЧ, вблизи каталитического центра фермента. Среди пациентов с резистентностью к ННИОТ наиболее частыми являются мутации K103N (56,98%) и Y181C (24,95%). Мутации G190A, L100I, V106A встречаются реже (8,16%, 6,92% и 2,37% соответственно), но также сильно влияют на успех антиретровирусной терапии, так как приводят к потере ингибирующей активности невирапина более чем на 2 порядка [29]. Мутации L100I, K103N и Y181C являются характерными также для пациентов с резистентностью к эфавирензу и делавердину [30]. Известно, что мутации Y181C и V106A вызывали падение активности капревирина – потенциального ННИОТ второго поколения, снятого с клинических испытаний [31]. Для лерсивирин, ННИОТ, созданного на основе капревирина и прошедшего клиническую фазу IIb, удалось добиться устойчивости к этим мутациям, однако наблюдалось падение активности при наличии мутации L100I [32]. Умеренная потеря активности в отношении мутации V106A была характерна для соединения GW69564 [33], модификация структуры которого позволила создать другую молекулу (GW695634), дошедшую до III фазы клинических испытаний. Предложено несколько механизмов устойчивости ОТ к действию ННИОТ: мутации L100I и G190A стерически препятствуют размещению ННИОТ в гидрофобном кармане [34], мутация Y181C приводит к утрате взаимодействий с аминокислотными остатками внутри кармана [35], мутация K103N затрудняет проникновение ННИОТ в гидрофобный карман [36, 37].

В ходе работы была продемонстрирована способность 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила ингибировать не только ОТ ВИЧ-1 дикого типа, но и ее наиболее распространенные мутантные формы с аминокислотными заменами L100I, K103N, V106A, Y181C, G190A, широко представленными у пациентов с устойчивостью к ННИОТ и приводящими к резистентности посредством разных механизмов. Данные мутации часто изучаются при определении профиля резистентности новых антиретровирусных препаратов. Дополнительно была показана ингибирующая активность 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в отношении двойного мутанта с двумя наиболее часто встречающимися заменами K103N и Y181C, что крайне важно для разработки нового антиретровирусного препарата, нацеленного на преодоление резистентности вируса. Для подтверждения активности соединения к различным штаммам и клиническим изолятам инфекции требуется проведение исследований *in vitro* на культурах клеток, инфицированных ВИЧ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что УФ-спектр соединения имеет выраженный максимум поглощения при измерении раствора субстанции в тетрагидрофуране в концентрации 0,10 мг/мл, в ИК спектре наблюдаются специфические полосы в области 4000–370 см⁻¹, что позволяет использовать УФ и ИК спектры для идентификации исследуемого вещества в субстанции. В результате проведенных рентгеноструктурного, элементного, ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР анализов была подтверждена структура 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила.

Показана возможность применения УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии, а также термических анализов для подтверждения подлинности при входном контроле субстанции. Разработанные методы могут быть использованы в контроле качества и включены в проект НД на субстанцию 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил.

Исследования механизма действия исследуемого вещества в отношении ОТ ВИЧ-1 показали, что соединение относится к группе ННИОТ ВИЧ-1.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ГК №14.N08.11.0154 от 02 июня 2017 г., Уникальный идентификатор контракта RF----N0817X0148).

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Джайн (Корсакова) – методология исследований, интерпретация результатов, написание текста;
Д.В. Демченко – статистическая обработка результатов, написание текста;
А.А. Озеров, В.Ю. Балабаньян – работа над концепцией и дизайном исследований,
М.Н. Макарова, В.Г. Макаров – интерпретация и визуализация результатов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Chen B. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry // Trends Microbiol. – 2019. – Vol. 27, №10. – P. 878–891. DOI: 10.1016/j.tim.2019.06.002.
2. Gulick R.M., Flexner C. Long-Acting HIV Drugs for Treatment and Prevention // Annu Rev Med. – 2019. – Vol. 70. – P. 137–150. DOI: 10.1146/annurev-med-041217-013717.
3. Cooper V. Clatworthy J., Harding R., Whetham J; Emerge Consortium. Measuring quality of life among people living with HIV: a systematic review of reviews // Health Qual Life Outcomes. – 2017. – Vol. 15, No.1. – P. 220. DOI: 10.1186/s12955-017-0778-6.
4. Eggleston J.S., Nagalli S. Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). 2021. In: StatPearls [Электронный доступ] // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing – 2021.
5. Dionne B. Key Principles of Antiretroviral Pharmacology // Infect Dis Clin North Am. – 2019. – Vol. 33, No.3. – P. 787–805. DOI: 10.1016/j.idc.2019.05.006.
6. Gupta R.K., Gregson J., Parkin N., Haile-Selassie H., Tanuri A., Andrade Forero L., Kaleebu P., Watera C., Aghokeng A., Mutenda N., Dzangere J., Hone S., Hang Z.Z., Garcia J., Garcia Z., Marchorro P., Beteta E., Giron A., Hamers R., Inzaule S., Frenkel L.M., Chung M.H., de Oliveira T., Pillay D., Naidoo K., Kharsany A., Kugathasan R., Cutino T., Hunt G., Avila Rios S., Doherty M., Jordan M.R., Bertagnolio S. HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis // Lancet Infect Dis. – 2018. – Vol. 18, No.3. – P. 346–355. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30702-8.
7. Wang Y., De Clercq E., Li G. Current and emerging non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for HIV-1 treatment // Expert Opin Drug Metab Toxicol. – 2019. – Vol. 15, No.10. – P. 813–829. DOI: 10.1080/17425255.2019.1673367.
8. Das K., Martinez S.E., DeStefano J.J., Arnold E. Structure of HIV-1 RT/dsRNA initiation complex prior to nucleotide incorporation // Proc Natl Acad Sci USA. – 2019. – Vol. 116, No.15. – P. 7308–7313. DOI: 10.1073/pnas.1814170116.
9. Das K., Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance // Part 2. Curr Opin Virol. – 2013. – Vol. 3, No.2. – P. 119–28. DOI: 10.1016/j.coviro.2013.03.014.
10. Das K., Martinez S.E., Bauman J.D., Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism // Nat Struct Mol Biol. – 2012. – Vol. 19, No.2. – P. 253–259. DOI: 10.1038/nsmb.2223.
11. Liu S., Abbondanzieri E.A., Rausch J.W., Le Grice S.F., Zhuang X. Slide into action: dynamic shuttling of HIV reverse transcriptase on nucleic acid substrates // Science. – 2008. – Vol. 322, No.5904. – P. 1092–1097. DOI: 10.1126/science.1163108.
12. Schauer G.D., Huber K.D., Leuba S.H., Sluis-Cremer N. Mechanism of allosteric inhibition of HIV-1 reverse transcriptase revealed by single-molecule and ensemble fluorescence // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42, No.18. – P. 11687–11696. DOI: 10.1093/nar/gku819.
13. Wang J., Smerdon S.J., Jäger J., Kohlstaedt L.A., Rice P.A., Friedman J.M., Steitz T.A. Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – Vol. 91, No.15. – P. 7242–7246. DOI: 10.1073/pnas.91.15.7242.
14. De Corte BL. From 4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo[4,5-1-jk][1,4]benzodiazepin-2(1H)-one (TIBO) to etravirine (TMC125): fifteen years of research on non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase // J Med Chem. – 2005. – Vol. 48, No.6. – P. 1689–1696. DOI: 10.1021/jm040127p.
15. Schafer J.J., Short W.R. Rilpivirine, a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the management of HIV-1 infection: a systematic review // Antivir Ther. – 2012. – Vol. 17, No.8. – P. 1495–1502. DOI: 10.3851/IMP2254.
16. Hofstra L.M., Sauvageot N., Albert J., et al. Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe // Clin Infect Dis. – 2016. – Vol. 62, №5 – P. 655–663.
17. Tang M.W., Shafer R.W. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications // Drugs. – 2012. – Vol.72, No.9. P. e1-25. DOI: 10.2165/11633630-000000000-00000.
18. Brucoleri A. Positional adaptability in the design of mutation-resistant nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: a supramolecular perspective. AIDS Res Hum Retroviruses. 2013 Jan;29(1):4–12. DOI: 10.1089/AID.2012.0141.
19. La Regina G., Coluccia A., Silvestri R. Looking for an active conformation of the future HIV type-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors // Antivir Chem Chemother. – 2010. – Vol. 20, No.6. – P. 213–37. DOI: 10.3851/IMP1607.
20. Huo Z., Zhang H., Kang D., Zhou Z., Wu G., Desta S., Zuo X., Ding X., Jing L., Daelemans D., De Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. Discovery of Novel Diarylpyrimidine Derivatives as Potent HIV-1 NNRTIs Targeting the “NNRTI Adjacent” Binding Site // ACS Med Chem Lett. – 2018. – Vol. 9, No.4. – P. 334–338. DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00524.
21. Kang D., Wang Z., Zhang H., Wu G., Zhao T., Zhou Z., Huo Z., Huang B., Feng D., Ding X., Zhang J., Zuo X., Jing L., Luo W., Guma S., Daelemans D., Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. Further Exploring Solvent-Exposed Tolerant Regions of Allosteric Binding Pocket for Novel HIV-1 NNRTIs Discovery // ACS Med Chem Lett. – 2018. – Vol. 9, No.4. – P. 370–375. DOI: 10.1021/acsmchemlett.8b00054.
22. Озеров А.А., Новиков М.С., Тимофеева Ю.А., Лобачев А.А., Луганченко А.И., Гейсман А.Н. Пиримидиновые нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 – история разработки и перспективы // Вестник ВолгГМУ. – 2012. – №3. – 10–17.
23. Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Ozerov A.A., Valuev-Elliston V.T., Temburnikar K., Gurskaya G.V., Kochetkov S.N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl] uracils as potent anti-HIV-1 agents // Bioorg Med Chem. – 2011. – Vol. 19, No.19. – P. 5794–5802. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.025.
24. Петров В.И., Новиков М.С., Луганченко А.И., Озеров А.А., Рогова Н.В. Кластерный подход к созданию биотехнологических лекарственных средств // Медицинская этика. – 2014. – №1. – С. 28–31.
25. Озеров А.А., Новиков М.С., Луганченко А.И., Хартман Т., Букхайт Р.У. Новые N-[2-(Бензоилфенокси)этил] производные нуклеиновых оснований – синтез и анти-ВИЧ-1 активность *in vitro* // Волгоградский научно-мед. журн. – 2012. – №4. – С. 15–18.
26. Siddiqui M.R., Al Othman Z.A., Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review //

- Arabian Journal of Chemistry. – 2017. – Vol. 10, No.2. – P. 1409–1421. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.04.016
27. Rai M.A., Pannek S., Fichtenbaum C.J. Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection // *Expert Opin Emerg Drugs*. – 2018. – Vol. 23, No.2. – P. 149–157. DOI: 10.1080/14728214.2018.1474202.
 28. de Bethune, M.P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009) // *Antiviral Res*. – 2010. – Vol. 85, No. 1. – P. 75–90. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.09.008.
 29. Maga G., Amacker M., Ruel N., Hübscher U., Spadari S. Resistance to nevirapine of HIV-1 reverse transcriptase mutants: loss of stabilizing interactions and thermodynamic or steric barriers are induced by different single amino acid substitutions. // *J Mol Biol*. – 1997. – Vol. 274, No. 5. – P. 738–747. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1427.
 30. Mackie N. Resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. In: Geretti AM, editor. *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice*. Изд-во London: Mediscript; 2006. Chapter 2.
 31. Sato A., Hammond J., Alexander T.N., Graham J.P., Binford S., Sugita K., Sugimoto H., Fujiwara T., Patick A.K. *In vitro* selection of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that confer resistance to capravirine, a novel nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor // *Antiviral Res*. – 2006. – Vol. 70, No.2. – P. 66–74. DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.01.001.
 32. Corbau R., Mori J., Phillips C., Fishburn L., Martin A., Mowbray C., Panton W., Smith-Burchnell C., Thornberry A., Ringrose H., Knöchel T., Irving S., Westby M., Wood A., Perros M. Lersivirine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor with activity against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2010. – Vol. 54, No.10. – P. 4451–4463. DOI: 10.1128/AAC.01455-09.
 33. Chan J.H., Freeman G.A., Tidwell J.H., Romines K.R., Schaller L.T., Cowan J.R., Gonzales S.S., Lowell G.S., Andrews C.W. 3rd, Reynolds D.J., St. Clair M., Hazen R.J., Ferris R.G., Creech K.L., Roberts G.B., Short S.A., Weaver K., Koszalka G.W., Boone L.R. Novel benzophenones as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1 // *J Med Chem*. – 2004. – Vol. 47, No.5. – P. 1175–1182. DOI: 10.1021/jm030255y.
 34. Hsiou Y., Das K., Ding J., Clark A.D. Jr., Kleim J.P., Rösner M., Winkler I., Riess G., Hughes S.H., Arnold E. Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance // *J Mol Biol*. – 1998. – V. 284, No.2. – P. 313–323. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2171.
 35. Kertesz D.J., Brotherton-Pleiss C., Yang M., Wang Z., Lin X., Qiu Z., Hirschfeld D.R., Gleason S., Mirzadegan T., Dunten P.W., Harris S.F., Villaseñor A.G., Hang J.Q., Heilek G.M., Klumpp K. Discovery of piperidin-4-yl-aminopyrimidines as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. N-benzyl derivatives with broad potency against resistant mutant viruses // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2010. – Vol. 20, No.14. – P. 4215–4218. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.05.040.
 36. Hsiou Y., Ding J., Das K., Clark A.D. Jr., Boyer P.L., Lewi P., Janssen P.A., Kleim J.P., Rösner M., Hughes S.H., Arnold E. The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance // *J Mol Biol*. – 2001. – Vol. 309, No. 2. – P. 437–445. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4648.
 37. Ren J., Nichols C.E., Chamberlain P.P., Weaver K.L., Short S.A., Chan J.H., Kleim J.P., Stammers D.K. Relationship of potency and resilience to drug resistant mutations for GW420867X revealed by crystal structures of inhibitor complexes for wild-type, Leu100Ile, Lys101Glu, and Tyr188Cys mutant HIV-1 reverse transcriptases // *J Med Chem*. – 2007. – Vol. 50, No.10. – P. 2301–2309. DOI: 10.1021/jm061117m.

АВТОРЫ

Джайн (Корсакова) Екатерина Александровна – аспирант кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. ORCID ID: 0000-0003-0283-8598. E-mail: ekaterina.korsa@gmail.com

Демченко Дмитрий Валентинович – кандидат фармацевтических наук, руководитель группы ГЛС ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации». ORCID ID: 0000-0003-3856-3936. E-mail: demchenko.dv@doclinika.ru

Озеров Александр Александрович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Мин-

здрава России. ORCID ID: 0000-0002-4721-0959. E-mail: prof_ozarov@yahoo.com

Макарова Марина Николаевна – доктор медицинских наук, заместитель ген. директора по науке ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации». ORCID ID: 0000-0003-3176-6386. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Макаров Валерий Геннадьевич – доктор медицинских наук, профессор, генеральный директор ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации». ORCID ID: 0000-0002-2447-7888. E-mail: makarov.vg@doclinika.ru

Балабаньян Вадим Юрьевич – доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии, факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». ORCID ID: 0000-0002-5744-7060. E-mail: bal.pharm@mail.ru