

СОПОЛИМЕРЫ АКРИЛАМИДОВ И АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ С ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2024 г. Е. Ф. Панарин^а*, О. Н. Журавская^а, А. В. Ситко^а,
Е. Н. Власова^а, А. А. Штро^б

^аФилиал федерального государственного бюджетного учреждения "Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова" Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" -
Институт высокомолекулярных соединений.

199004 Санкт-Петербург, В.О. Большой пр., 31

^бНаучно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева

197376 Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 15/17

*e-mail: efra99@mail.ru

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 09.10.2024 г.

Принята в печать 23.10.2024 г.

Реакциями в цепях полиакрилового ангидрида с ароматическими аминами впервые синтезированы карбоксильные полиэлектролиты – водорастворимые сополимеры акриловой кислоты с N-замещенными акриламидами. Установлена структура сополимеров и состав, определены их молекулярно-массовые характеристики. Показана возможность получения чередующихся сополимеров акриловой кислоты. Синтезированы сополимеры разного состава, обладающие низкой цитотоксичностью и активностью в отношении вируса простого герпеса.

DOI: 10.31857/S2308113924040028, EDN: MNIMEE

Несмотря на значительные достижения в области вакцинотерапии, вирусные инфекции по-прежнему остаются важной проблемой здравоохранения. Появление устойчивых к вакцинам вирусов происходит очень быстро. Кроме того, хранение вакцин и их транспортировка требуют соблюдения строгого температурного режима. В условиях сезонных респираторных инфекций и с появлением в мире опасных патогенных вирусов, таких как Ebola, Zika, SARS, HIV и других, против которых вакцины отсутствуют, особенно актуальна потребность в поиске и разработке новых противовирусных средств широкого спектра действия, нейтрализующих вирусы или блокирующих их проникновение в клетку. Среди перспективного класса противовирусных веществ особый интерес представляют высокомолекулярные соединения – водорастворимые синтетические и природные анионные полиэлектролиты.

Впервые противовирусная активность была обнаружена в середине прошлого столетия у полиакриловой и полиметакриловой кислоты [1]. Их активность обусловлена способностью блокировать взаимодействия вирусов с клетками "хозяи-

на", а также индуцировать выработку организмом специфического противовирусного белка – интерферона, который вырабатывается зараженной клеткой для предупреждения соседних клеток [2]. Эпидемия ВИЧ, начавшаяся в 80-х годах XX века, стимулировала исследования по поиску полимеров с противовирусной активностью. Высокую активность продемонстрировали многие полианионные полиэлектролиты синтетические и природные, содержащие ионогенные, фосфатные, фосфонатные, карбоксильные и сульфо-группы [3, 4]. В современных условиях с появлением новых мутантных штаммов коронавируса и волнами сезонных респираторных инфекций целесообразно вести активный поиск макромолекул различного химического строения, обладающих противовирусной активностью, и установления взаимосвязи их строения с биологической активностью.

Целью настоящей работы являлся синтез анионных полиэлектролитов: сополимеров акриламидов различного строения с акриловой кислотой реакциями в цепях полиакрилового ангидрида, установления влияния их химического строения акриламидного звена на противовирусную активность и цитотоксичность.

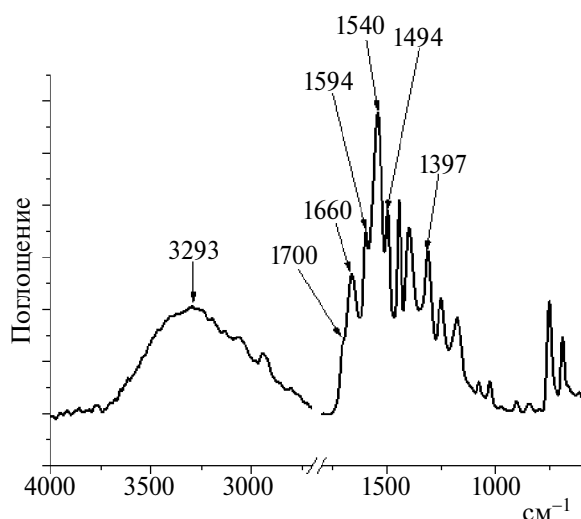


Рис. 1. ИК-спектр сополимера натриевой соли акриловой кислоты с акрилоиланилидом

$[\eta] = 1.05 \times 10^{-3} \text{ М}^{0.54}$ [7]; молекулярная масса находилась в интервале $(75-81) \times 10^3$.

Для идентификации полученных ПАА и ПАК записывали ИК-спектры на приборе “Shimadzu”, “Iraffinity-1S” в таблетках КВг. В спектрах ПАА наблюдали две полосы поглощения карбонильных групп $1750-1800 \text{ см}^{-1}$, а также полосы валентных колебаний $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ при 1040 см^{-1} . После гидролиза ПАА в ИК-спектрах ПАК прослеживается исчезновение двух ангидридных полос в области $1750-1800 \text{ см}^{-1}$ и появление одной карбонильной группы $-\text{CO}$ в области 1700 см^{-1} и $-\text{COOH}$ в области $1420-1300 \text{ см}^{-1}$.

Состав сополимеров определяли по данным элементного анализа на азот и методом УФ-спектроскопии. Спектры регистрировали на спектрофотометре “СФ-256 УВИ” (Общество с ограниченной ответственностью “ЛОМО Фотоника”, Россия): $\lambda_{\text{max}} = 215$ (I), 236 (II), 284 (III), 286 (IV) и 243 нм (V). Строение сополимеров подтверждено данными ИК-спектроскопии (рис. 1; табл. 1) и спектрами ЯМР ^1H .

ИК-спектры регистрировали на ИК-фурье-спектрометре “Vertex 70” фирмы “Bruker” при разрешении 4 см^{-1} , число сканов 60. При регистрации спектров использовали микроприставку однократного НПВО “Pike” с рабочим элементом, изготовленным из ZnSe . При регистрации спектров однократного НПВО вводили поправку, учитывающую глубину проникновения луча в образец в зависимости от частоты.

Исследование противовирусной активности синтезированных сополимеров в отношении вируса простого герпеса первого типа и цитотоксичности осуществляли на культуре клеток Vero в лаборатории химиотерапии вирусных инфекций Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России с использованием стандартных методов [8, 9]. Вирус простого герпеса получали из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций (накоплен на культуре клеток Vero), далее из вирусосодержащей культуральной жидкости готовили серию аликвот. Полученные аликвоты хранили при температуре -80°C .

В работе использовали клеточную культуру Vero (почечный эпителий зеленой мартышки), полученную из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций. Для оценки противовирусной активности в отношении простого герпеса первого типа готовили серию 3-кратных разведений веществ, начиная от 2 ЦТД₅₀ (50%-ная цитотоксичная доза, доза препарата, вызывающая гибель половины клеток) на поддерживающей среде “Альфа-МЕМ”, содержащую 20 мкг/мл ципрофлоксацина и 2% фетальной бычьей сыворотки (“Биолот”, Россия). Эти растворы вносили в культуру клеток Vero по 100 мкл на лунку 96-луночного планшета в двукратной концентрации и сразу же добавляли по 100 мкл вируса с концентрацией вирусных частиц в аликвоте не менее 10^6 в серии из семи 10-кратных разведений ($10^{-1}-10^{-7}$) и инкубировали в течение 1 ч при $T = 37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . Далее клетки отмывали от вируса поддерживаю-

Таблица 1. Основные характеристические ИК-спектральные полосы синтезированных сополимеров

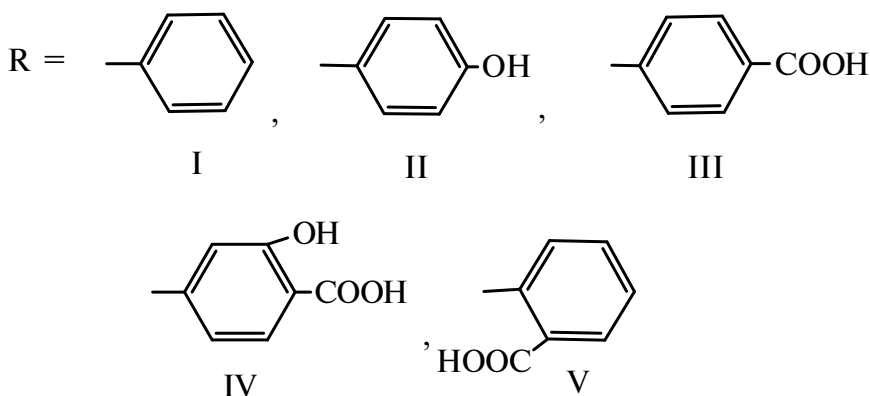
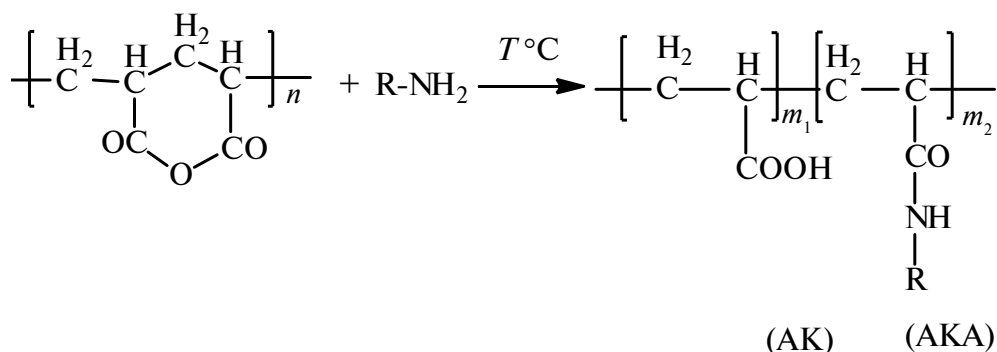
R	NH валентные колебания (см^{-1})	$-\text{CH}_2-$ (см^{-1})	COOH (см^{-1})	$\text{C}=\text{O}$, амид I (см^{-1})	Колебания ароматического скелета (см^{-1})	COO^- , асимм./симм. (см^{-1})
I	3293	2920–2850	1700	1660	1594, 1494	1540/1397
II	3280	2920–2850	–	1645	1606, 151	1544/1410
III	3294	2920–2850	1700 плечо	1673	1599, 1447	1526/1384
IV	3289	2920–2850	1698	1670	1598, 1501	1544/1305
V	3300	2920–2850	1701, 1683	1657	1587, 1508	1510/1387

щей средой и снова вносили в лунки по 100 мкл разведений тестируемого средства, после чего во все лунки вносили по 100 мкл поддерживающей среды. Планшеты инкубировали в течение 3-х суток при $T = 37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 в CO_2 -инкубаторе, а затем оценивали выживаемость клеток с помощью микротетразолиевого теста (МТТ-тест). Титр вируса во всех случаях рассчитывали по методу Рида и Менча [8] и выражали в 50%-ных тканевых инфекционных дозах

(ТИД₅₀). На основании полученных данных рассчитывали 50%-ную ингибирующую концентрацию (ЭД₅₀).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ниже показан синтез сополимеров акриловой кислоты (АК) с N-акрилоильными производными ароматических аминов и аминокислот (АКА):



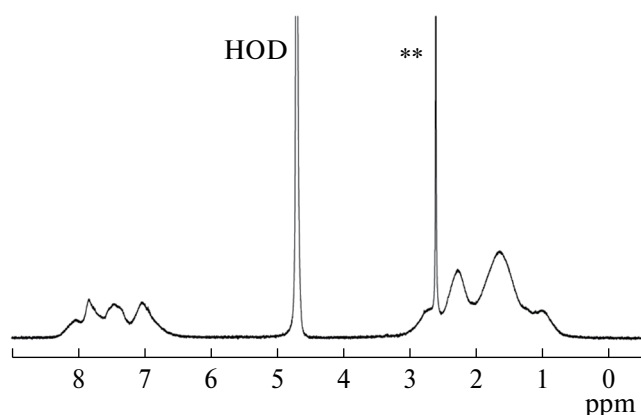
В ИК-спектре (рис. 1) сополимера натриевой соли акриловой кислоты с акрилоиланилидом присутствует широкая полоса $3500\text{--}2500\text{ см}^{-1}$ — колебания связи —OH , на фоне которой заметна полоса 3293 см^{-1} , относящаяся к валентным колебаниям группы —NH вторичного амида, $2945\text{--}2939\text{ см}^{-1}$ — колебания группы —CH_2 полимерной цепи, 1660 см^{-1} — полоса поглощения C=O амидной группы (амид 1), 1594 и 1494 см^{-1} — плоскостные колебания C=C ароматического скелета. Полосы 1540 и 1397 см^{-1} относятся соответственно к антисимметричным и симметричным колебаниям ионизованной карбоксильной группы COO^- . Полоса деформационных колебаний группы —NH вторичного амида (амид 2) должна находиться в интервале $1570\text{--}1515\text{ см}^{-1}$ и не может быть выделена на фоне интенсивной полосы 1540 см^{-1} . Плечо в области 1700 см^{-1}

свидетельствует о неполной ионизации полиакриловой кислоты. Другие сополимеры имеют аналогичные спектральные характеристики (табл. 1).

Спектры ЯМР ^1H были зарегистрированы на спектрометре “Bruker Avance-400” (Германия) с рабочей частотой 400 МГц относительно сигналов растворителя D_2O (4.78 м.д.), которые подтверждают строение и состав полученных сополимеров. На примере спектра (рис. 2) сополимера натриевой соли акриловой кислоты с акрилоиламинобензоатом натрия протоны ароматического кольца обнаруживаются по группе сигналов в интервале $\delta = 7.0\text{--}7.5$ м.д., сигнал продукта разложения ДМФА $\delta = 2.6$ м.д., сигналы CH — основной цепи $\delta = 1.8\text{--}2.8$ м.д., сигналы CH_2 — основной цепи в области 1.2–1.8 м.д.

Таблица 2. Условия ацилирования ароматических аминов и аминокислот ПАА, растворитель ДМФА. Состав и характеристики синтезированных сополимеров (M_1 – АК) и (M_2 – АКА)

R	Мол. соотношение ПАА : : R-NH ₂	$[\eta]^{25} \text{ } ^\circ\text{C}$ в 2 N NaOH, дл/г	УФ-спек- троскопия, λ_{max}	ЯМР ^1H	Противовирусная активность против герпеса первого типа	
			M_1 / M_2 , мол. %	M_1 / M_2 , мол. %	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл
Анилин (I)	1 : 3	0.22	57 / 43	59 / 41	>50	47.38
<i>n</i> -аминофенол (II)	1 : 3	0.29	43 / 57	55 / 45	>50	4.5
<i>n</i> -АБК (III)	1 : 3	0.41	61 / 39	60 / 40	>50	1.4
<i>n</i> -АСК (IV)	1 : 3	0.45	78 / 22	77 / 23	>50	<0.6
<i>o</i> -аминобензойная кислота (V)	1 : 3	0.44	86 / 14	77 / 23	>50	<0.6
ПАК	–	$(75-81) \times 10^3$	– / –	– / –	>50	>50

**Рис. 2.** Спектр ЯМР ^1H сополимера натриевой соли акриловой кислоты с акрилоиламинобензоатом натрия.

Из данных (табл. 2) видно, что впервые синтезированные сополимеры акриламидов с акриловой кислотой проявляют высокую противовирусную активность по сравнению с полиакриловой кислотой. Модификация ПАК с введением в ее структуру ароматических фрагментов приводит к резкому повышению противовирусной активности, указывая тем самым на существенную роль гидрофобных факторов при взаимодействии сополимеров с клетками и вирионами (вирусными частицами).

Таким образом, наиболее высокую активность показали сополимеры акриловой кислоты с акрилоил-*n*-аминобензойной кислотой, акрилоил-*n*-аминосалициловой кислотой, акрилоил-*n*-аминофенолом, акрилоил-*o*-аминобензойной кислотой. Эти сополимеры перспективны для дальнейшего изучения.

Авторы выражают благодарность Д.Н. Разгуляевой, А.М. Клабукову, А.В. Галочкиной, А.В. Гаршиной, принимавших участие в оценке противовирусной активности образцов.

Работа выполнена в рамках Госзадания «Полимеры для биомедицины» (регистр.

№ 124013000730-3); а также за счет средств Государственного Задания Министерства Здравоохранения РФ «Молекулярно-биологические подходы к разработке нового лекарственного средства для терапии заболеваний, вызванных штаммами вируса простого герпеса, резистентными к существующим этиотропным препаратам, TVKQ-2024-0004».

Настоящая статья не содержит описания исследований с использованием в качестве объектов животных и людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо сфере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Somer P.D., Clercq E.D., Billiau A., Schonne E., Claesen M.* // J. Virol. 1968. V. 2. № 9. P. 878.
2. *Merigan T.C., Finkelstein M.S.* // Virology. 1968. V. 35. № 3. P. 363.
3. *Anderson R.A., Feathergill K., Diao X., Cooper M., Kirkpatrick R., Spear P., Waller D.P., Chany C., Doncel G.F., Lourens B., Zaneveld L.J.* // J. Andrology. 2000. V. 21. № 6. P. 862.
4. *Schandock F., Riber C.F., Röcker A., Müller J.A., Harms M., Gajda P., Zuwala K., Andersen A.H.F., Lovschall K.B., Tolstrup M., Keppel F., Münch J., Zelikin A.N.* // Adv. Healthc. Mater. 2017. V. 6. № 23. P. 1700748.
5. Кейл Б. Лабораторная техника органической химии. М.: Мир, 1966.
6. Барабашина Р.А., Слепцова О.М. А. с. 888793/23-4 СССР // Б.И. 1965. Бюлл. №13. SU 172313 A1.
7. *Ryuichi S.* // J. Chem. Soc. Japan. Pure Chem. Sec. 1962. V. 83. № 4. P. 386.
8. *Reed L.J., Muench H.* // J. Am. Epidemiology. 1938. V. 27. P. 493.
9. Разгуляева Д.Н., Клабуков А.М., Галочкина А.В., Гаршинина А.В., Журавская О.Н., Гаврилова И.И., Манахов В.А., Нестерова Н.А., Штро А.А., Панарин Е.Ф. // Антибиотики и химиотерапия. 2023. Т. 68. № 9–10. С. 34.