

УДК 541.64

СИНТЕЗ И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ СОПОЛИМЕРОВ ОКСИКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ С *N*-ВИНИЛАМИДАМИ

© 2023 г. Н. А. Нестерова^{1,*}, А. А. Штро², член-корреспондент РАН Е. Ф. Панарин¹Поступило 08.06.2023 г.
После доработки 19.09.2023 г.
Принято к публикации 22.09.2023 г.

Радикальной сополимеризацией кумарина с *N*-виниламидами (*N*-винилпирролидон, *N*-метил-*N*-винилцетамид, *N*-винилформамид) синтезированы сополимеры различного состава и варьируемой молекулярной массой, последующими реакциями в цепях которых получены водорастворимые сополимеры солей оксикоричной кислоты и ее гидразидов. Соплимеры солей и гидразидов оксикоричной кислоты с *N*-виниламидами имеют низкую цитотоксичность и проявляют выраженную противовирусную активность в отношении респираторно-синцитиального вируса человека А2.

Ключевые слова: кумарин, сополимеры оксикоричной кислоты, *N*-виниламиды, противовирусная активность, гидразиды оксикоричной кислоты

DOI: 10.31857/S2686953523600320, **EDN:** BJCGOS

Респираторные сезонные вирусные инфекции являются важной проблемой здравоохранения. В этих условиях высока потребность в эффективных средствах противовирусной химиотерапии. Создание новых нетоксичных противовирусных препаратов неспецифического действия в отношении вирусов разных групп является актуальной задачей.

В последние десятилетия внимание исследователей привлечено к поиску противовирусных веществ среди высокомолекулярных соединений. Противовирусная активность обнаружена у большого числа различных природных и синтетических полимеров: анионных полиэлектролитов, содержащих фосфонатные, фосфатные, карбоксильные и сульфо-группы [1–4], у поликатионов [5, 6], содержащих amino- и аммониевые группы и дендримеров [7, 8].

Наибольший интерес вызывают анионные полиэлектролиты, макромолекулы которых способны блокировать взаимодействие вирионов с клетками, препятствуя их инфицированию [6].

Целью настоящего исследования был синтез новых водорастворимых полианионов на основе

N-виниламидов (ВА) и оксикоричной кислоты (ОК), содержащих карбоксильные, гидразидные и фенольные группы, а также оценка их цитотоксичности и противовирусной активности на клеточной культуре в отношении респираторно-синцитиального вируса человека.

Синтез сополимеров проводили в две стадии на основе ранее разработанных нами методик [9]. На первой стадии (схема 1, реакция А) проводили радикальную сополимеризацию в массе кумарина (К) с *N*-виниламидами — *N*-винилпирролидоном (ВП), *N*-винилформамидом (ВФА) и *N*-метил-*N*-винилацетамидом (МВАА). Соплимеризацию вели в массе в инертной атмосфере при 65°C в течение 24 ч в присутствии динитрила азобисизомасляной кислоты (ДАК) в качестве инициатора. Соплимеры очищали от непрореагировавших компонентов осаждением из раствора в диметилформамиде (ДМФА) в диэтиловый эфир или ацетон. Отделяли на фильтре и сушили под вакуумом до постоянной массы.

Условия сополимеризации и характеристики синтезированных сополимеров ВА-К представлены в табл. 1.

Строение сополимеров ВА-К подтверждали методами ИК-, УФ- спектроскопией. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрофотометре Vertex-70 (Bruker, Германия) с приставкой ATR (Pike, США). Полоса с частотой 1660 см⁻¹, относящаяся к С=О-группе амида, подтверждает наличие в сополимере звеньев *N*-виниламидов, а полоса с частотой 1765 см⁻¹, относящаяся к груп-

¹Институт высокомолекулярных соединений
Российской академии наук, 199004 Санкт-Петербург,
Россия

²Научно-исследовательский институт гриппа
им. А.А. Смородиной, 197376 Санкт-Петербург,
Россия

*E-mail: lab.2305@mail.ru

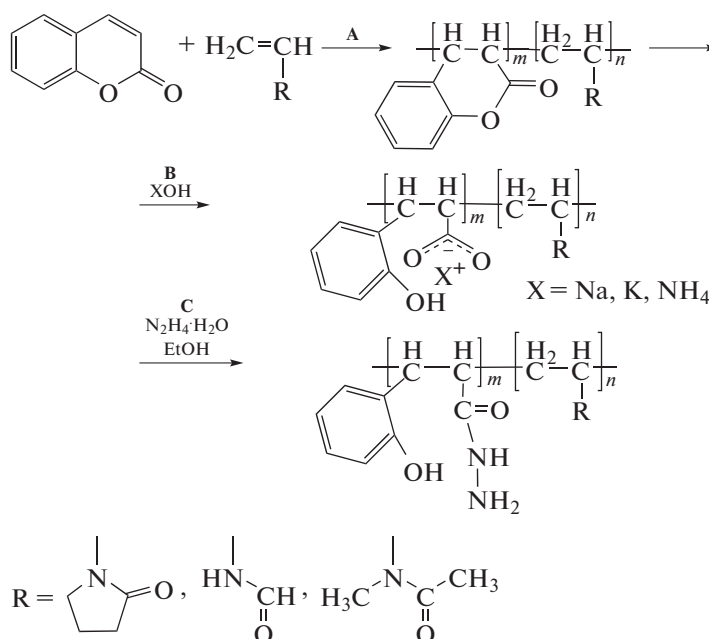


Схема 1

пе С=О лактонного цикла, подтверждает наличие в сополимере звеньев кумарина (рис. 1, спектр 1).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1280 (Япония).

Состав продуктов определяли по данным элементного анализа на азот, УФ-спектроскопии при $\lambda_{\text{max}} = 266.5$ нм, а также обратного титрования СООН-групп после раскрытия лактонного цикла звена кумарина под действием 0.1 н водного раствора NaOH. Молекулярную массу M_w и характеристическую вязкость $[\eta]$ определяли методом светорассеяния в ДМСО.

На второй стадии проводили раскрытие лактонного цикла реакциями щелочного гидролиза (схема 1, реакция В) и гидразиолиза (схема 1, ре-

акция С). Щелочной гидролиз сополимеров ВА-К осуществляли 0.1 н водным раствором NaOH при 40–50°C. Целевой сополимер оксикоричной кислоты (ОК) с N-виниламидом выделяли подкислением реакционной массы 0.1 н водным раствором HCl, выпавший продукт отфильтровывали и сушили. Нейтрализацией ВА-ОК гидроксидами NaOH, KOH и NH₄OH получали водорастворимые соли сополимеров. Состав сополимеров ВА-ОК определяли потенциометрическим титрованием, а строение подтверждали методами ИК- и УФ-спектроскопии. На раскрытие лактонного цикла и образование ОК указывает отсутствие в ИК-спектре полосы с максимумом при 1765 см⁻¹, соответствующей группе С=О лактона,

Таблица 1. Условия синтеза и характеристики сополимеров кумарина с N-виниламидами, T = 65°C

Условия сополимеризации				Характеристика сополимеров		
ВА	[M _к] : [M _{ВА}], мол. %	Выход, %	c _{дак} ^а , мас. %	[M _к], мол. %	[M _{ВА}], мол. %	M _w × 10 ⁻³
ВП	50 : 50	86	3	46	54	57
	30 : 70	83	3	36	64	63
	10 : 90	89	3	11	89	74
ВФА	17 : 83	84	1	16	84	130
	50 : 50	69	1	41	59	73
МБАА	10 : 90	78	3	13	87	40
	50 : 50	77	3	38	62	45

^а c_{дак} — Концентрация инициатора.

и появление полосы $C=O$ -связи карбоксильной группы при 1720 см^{-1} или полосы при 1569 см^{-1} $C=O$ -связи карбоксилат-иона (рис. 1, спектр 2). На УФ-спектре полоса с максимумом при 276 нм указывает на наличие фенольной группы.

Гидразинолиз сополимеров проводили в спиртовом растворе 2-х кратным избытком гидрата гидразина при комнатной температуре в течение 24 ч. Полученные гидразиды ОК очищали диализом против воды и выделяли методом лиофилизации. Формирование полигидразидов подтверждается отсутствием на ИК-спектре полосы с максимумом при 1765 см^{-1} группы $C=O$ лактона и появлением широкой полосы при 3300 см^{-1} , соответствующей группе NH_2 (рис. 1, спектр 3). Содержание гидразидных групп в сополимерах определяли йодометрическим методом.

Условия синтеза сополимеров оксикоричной кислоты и ее гидразидов с *N*-виниламидами, их характеристики и данные о цитотоксичности и противовирусной активности представлены в табл. 2.

Для определения цитотоксичности (50% цитотоксичная доза CTD_{50} — доза препарата, вызывающая гибель половины клеток) и противовирусной активности (средняя эффективная доза $ЭД_{50}$ — доза препарата, которая уменьшает количество вируса на 50%) использовали клеточную культуру Нер-2 (эпидермоидная карцинома гортани человека). Противовирусную активность оценивали с использованием респираторно-синцитиального вируса человека, штамм А-2. Показатель цитотоксичности CTD_{50} сополимеров определяли по жизнеспособности клеток при помощи микро-

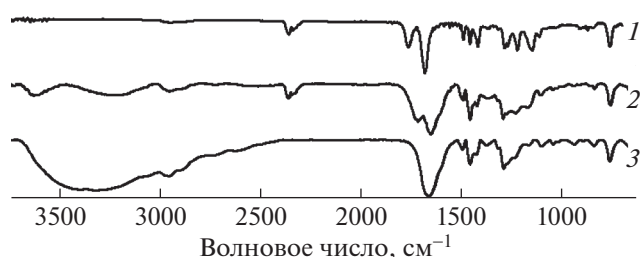


Рис. 1. ИК-спектры сополимеров: ВП-К (1), ВП-ОК (2), ВП-гидразид ОК (3).

тетразониевого теста [10], а противовирусную активность — иммуноферментным анализом [11]. Критерием оценки противовирусной активности является статистически значимое снижение титра вируса в клетках в присутствии полимера по сравнению с контролем. На основе этих данных проводили расчет $ЭД_{50}$. Перспективность применения синтезированных полимеров в качестве противовирусных средств оценивали по индексу селективности (ИС) — отношению $CTD_{50}/ЭД_{50}$; вещества, имеющие ИС более 10, считались перспективными [12]. Результаты биологических тестов представлены в табл. 2.

Установлено, что все синтезированные полимеры — соли и гидразиды сополимеров оксикоричной кислоты с *N*-виниламидами проявляют высокую противовирусную активность в отношении респираторно-синцитиального вируса человека. Противовирусная активность, цитотоксичность, а также значение ИС в основном определяются составом сополимеров. Эти показатели

Таблица 2. Условия синтеза сополимеров оксикоричной кислоты, ее солей и гидразидов с *N*-виниламидами и их противовирусная активность

ВА	Состав ВА-ОК, мол. %		Температура реакции T , °C	X^+	$[\eta]_{0.1\text{ н NaOH},}^{25^{\circ}\text{C}}$ дл г $^{-1}$	ЦТД $_{50}$, мкг мл $^{-1}$	ЭД $_{50}$, мкг мл $^{-1}$	ИС a
	ВА	ОК						
Соли ОК								
ВП	56	44	60	NH $_4$	0.26	1000	3.7	270
	59	41	60	K	0.21	345	2.6	130
	89	11	70	K	0.27	1000	300	3.3
ВФА	83	17	22	Na	0.42	1000	3.7	270
	59	41	22	Na	0.2	220	2.5	90
МВАА	87	13	22	Na	0.27	570	2.5	228
	62	38	22	K	0.2	345	2.7	128
Гидразиды ОК								
ВП	73	27	22	—	0.46	420	12.5	34
МВАА	89	11	22	—	0.17	525	5.1	100

^a ИС — индекс селективности.

возрастают с повышением содержания оксикоричной кислоты и достигают своего максимального значения при предельном содержании 40–45 мол. % кислоты в сополимерах. Однако цитотоксичность остается умеренной. Следует отметить отсутствие существенного влияния на биологическую активность химического строения *N*-виниламидов и замены в сополимерах карбоксильной группы на гидразидную, а также молекулярной массы сополимеров в исследованном диапазоне молекулярных масс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы новые сополимеры *N*-виниламидов (*N*-винилпирролидона, *N*-винилформамида и *N*-метил-*N*-винилацетамида) с кумарином, а также с оксикоричной кислотой и ее гидразидами, как потенциальные функциональные полимеры-носители, обладающие противовирусной активностью. Показана возможность получения сополимеров кумарина разного состава и молекулярной массы. Реакциями в цепях сополимеров ВА-К синтезировали сополимеры оксикоричной кислоты и ее гидразиды с *N*-виниламидами, которые характеризуются низкой цитотоксичностью и выраженной противовирусной активностью в отношении респираторно-синцитиального вируса человека. Установлено, что в исследованном диапазоне молекулярных масс сополимеров значения показателей их цитотоксичности и противовирусной активности зависят в основном от содержания оксикоричной кислоты или ее гидразида, тогда как влияние строения *N*-виниламида и молекулярной массы менее выражено. Полученные результаты свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале синтезированных полимеров и указывают на целесообразность их углубленного изучения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института высокомолекулярных соединений Российской академии наук (регистрационный номер 122012100171-8 “Наноструктурирование и модификация биологически активных веществ синтетическими и природными полимерами”), при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (тема рег. № НИОКТР в ЕГИСУ НИОКТР 121051900142-0 “Генетическая и антигенная вариабельность современных штаммов респираторно-синцитиальных вирусов (РСВ), циркулирующих на территории Российской Федерации”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе исследования на людях или животных не проводились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Anderson R.A., Feathergill K., Diao X., Cooper M., Kirkpatrick R., Spear P., Waller D.P., Chany C., Doncel G.F., Herold B., Lourens J.D., Zaneveld L.J.* // J. Androl. 2000. V. 21. № 6. P. 862–875.
<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03417.x>
2. *Schandock F., Riber C.F., Röcker A., Müller J.A., Harms M., Gajda P., Zuwala K., Andersen A.H.F., Lövschall K.B., Tolstrup M., Keppel F., Münch J., Zelikin A.N.* // Adv. Healthcare Mater. 2017. V. 6. № 23. 1700748.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201700748>
3. *Зарубаев В.В., Бучков Е.В., Назарова О.В., Золотова Ю.И., Панарин Е.Ф.* // ДАН. Науки о жизни. 2022. Т. 506. С. 392–395.
<https://doi.org/10.31857/S2686738922050328>
4. *Donalisio M., Ranucci E., Cagno V., Civra A., Manfredi A., Cavalli R., Ferruti P., Lembo D.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2014. V. 58. № 10. P. 6315–6319.
<https://doi.org/10.1128/aac.03420-14>
5. *Witvrouw M., Fikkert V., Pluymers W., Matthews B., Mardel K., Schols D., Raff J., Debyser Z., De Clercq E., Holan G., Pannecouque C.* // Mol. Pharmacol. 2000. V. 58. № 5. P. 1100–1108.
<https://doi.org/10.1124/mol.58.5.1100>
6. *Bianculli R.H., Mase J.D., Schulz M.D.* // Macromolecules. 2020. V. 53. № 21. P. 9158–9186.
<https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01273>
7. *Pachota M., Klysik K., Synowiec A., Ciejka J., Szczubiatka K., Pyrc K., Nowakowska M.* // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 8620–8630.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01289>
8. *Asaftei S., de Clercq E.* // J. Med. Chem. 2010. V. 53. № 9. P. 3480–3488.
<https://doi.org/10.1021/jm100093p>
9. *Панарин Е.Ф., Нестерова Н.А., Штро А.А.* Сополимеры *N*-виниламидов с солями оксикоричной кислоты. Патент РФ RU2796753. 2023. Бюл. изобр. № 16.
10. *Niks M., Otto M.* // J. Immunol. Methods. 1990. V. 130. № 1. P. 149–151.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90309-j](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90309-j)
11. *Reed L.J., Muench H.* // Am. J. Hyg. 1938. V. 27. № 3. P. 493–497.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
12. *Indrayanto G., Putra G.S., Suhud F.* // Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. 2021. V. 46. P. 273–307.
<https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.005>

SYNTHESIS AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF COPOLYMERS OF OXYCINNAMIC ACID WITH N-VINYLAMIDES

N. A. Nesterova^{a,#}, A. A. Shtro^b, and Corresponding Member of the RAS E. F. Panarin^a

^a*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, 199004 Saint Petersburg, Russian Federation*

^b*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, 197376 Saint Petersburg, Russian Federation*

[#]*E-mail: lab.2305@mail.ru*

Radical copolymerization of coumarin with *N*-vinylamides (*N*-vinylpyrrolidone, *N*-methyl-*N*-vinylacetamide, *N*-vinylformamide) was used to prepare copolymers of various natures and varied molecular masses. After the subsequent reactions in polymer chains, water-soluble copolymers of salts of oxycinnamic acid and its hydrazides were obtained. The synthesized copolymers of salts and hydrazides of oxycinnamic acid with *N*-vinylamides have low cytotoxicity and demonstrate the pronounced antiviral activity against human respiratory syncytial virus (strain A2).

Keywords: coumarin, copolymers of oxycinnamic acid, *N*-vinylamides, antiviral activity, hydrazides of oxycinnamic acid