

УДК 578.7 : 615.281.8 : 541.64

## СИНТЕЗ И ПРОТИВОГРИППОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ (СО)ПОЛИМЕРОВ ВИНИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2022 г. В. В. Зарубаев<sup>1</sup>, Е. В. Бучков<sup>2</sup>, О. В. Назарова<sup>3</sup>, Ю. И. Золотова<sup>3,\*</sup>,  
член-корреспондент РАН Е. Ф. Панарин<sup>3</sup>

Поступило 15.06.2022 г.  
После доработки 08.07.2022 г.  
Принято к публикации 08.07.2022 г.

Синтезированы новые сополимеры винилфосфоновой кислоты (ВФК) с 2-дезоксид-2-метакриламидо-D-глюкозой, 4-акрилоилморфолином (4-АМ) и акриламидом, изучена их противовирусная активность в отношении вируса гриппа в опытах *in vitro* и *in vivo*. Оптимальными противовирусными характеристиками и низкой цитотоксичностью обладал сополимер ВФК с 4-АМ состава 56:44 мол. %, молекулярной массой 33000. Полимер проявлял вирусингибирующие свойства с  $IC_{50} = 1$  мкг/мл и индексом селективности 302. Профилактическое интраназальное применение полимера на модели гриппозной пневмонии у мышей полностью предотвращало специфическую смертность при гибели 90% животных в группе плацебо. Полученные результаты свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале полимерных соединений на основе ВФК.

**Ключевые слова:** фосфорсодержащие полимеры, винилфосфоновая кислота, сополимеры, грипп, противовирусные соединения

**DOI:** 10.31857/S2686738922050328

Грипп, несмотря на очевидные успехи в области вакцинологии и химиотерапии, продолжает оставаться трудно контролируемой инфекцией. Это обусловлено особенностями самого возбудителя, в первую очередь, высокой скоростью эволюции, что приводит к ускользанию от иммунного ответа и формированию лекарственно-устойчивых мутантов [1]. Поэтому наряду со средствами специфической терапии применяются патогенетические препараты, направленные на подавление реактивных процессов, таких как цитокиновый шторм, воспалительная инфильтрация тканей органов-мишеней и пр. [2]. В этой связи поиск новых противовирусных лекарственных средств, в особенности неспецифических и эффективных в отношении вирусов разных антигенных групп, является приоритетной задачей медицинской науки.

Полимерные синтетические соединения проявляют широкий спектр биологической активности, в том числе в отношении самых разных групп

вирусов. Так, активность сульфатированных полисахаридов из морских водорослей, таких как галактансульфат, сульфатированный ксиломаннан, каррагенан и пр., была показана в отношении аденовируса, вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, коронавируса и пр. [3]. Фосфат-содержащие полимеры синтезируются в клетках и являются одним из факторов противовирусной защиты, в частности, против вируса SARS-CoV-2 [4]. Сходную активность проявляют и синтетические полифосфаты против коронавируса [5, 6] и в отношении ВИЧ [7, 8].

Целью настоящего исследования были синтез новых синтетических полимеров на основе винилфосфоновой кислоты (ВФК) и оценка их противовирусной активности в отношении вируса гриппа в экспериментах на клеточной культуре и на модели гриппозной пневмонии у лабораторных животных.

Гомополимер ВФК и сополимеры с 2-дезоксид-2-метакриламидо-D-глюкозой (МАГ), 4-акрилоилморфолином (4-АМ), акриламидом (АА) получили методом свободно-радикальной (со)полимеризации в запаянных стеклянных ампулах в атмосфере аргона в течение 24 ч. При проведении процесса в *N,N*-диметилформамиде (ДМФА) или метаноле в качестве инициатора использовали 2,2'-азобис-изобутиронитрил (ДАК), в водных растворах — 2,2'-азобис-(2-метилпропионами-

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: incorporate@inbox.ru

**Таблица 1.** Условия синтеза и характеристики (со)полимеров ВФК (M<sub>1</sub>)

N	Условия (со)полимеризации					Характеристики сополимеров			
	[M <sub>2</sub> ]	[M <sub>1</sub> ]: [M <sub>2</sub> ], мол. %	[M <sub>1</sub> +M <sub>2</sub> ], мас. %	Растворитель	I	[I], мас. % от [M <sub>1</sub> + M <sub>2</sub> ]	Выход, %	[M <sub>1</sub> ], мол. %	M <sub>SD</sub> × 10 <sup>-3</sup>
1*	—	100:0	80	H <sub>2</sub> O	АМП	1	54	100	30
2	МАГ	50:50	10	ДМФА	ДАК	2	71	12	20
3	МАГ	90:10	10	H <sub>2</sub> O	АМП	2	29	53	5
4	4-АМ	25:75	20	метанол	ДАК	2	76	13	77
5	4-АМ	25:75	20	H <sub>2</sub> O	АМП	2	82	14	310
6	4-АМ	50:50	20	H <sub>2</sub> O	АМП	1	38	56	33
7	АА	25:75	20	ДМФА	ДАК	2	93	28	25

24 ч, 60°C.

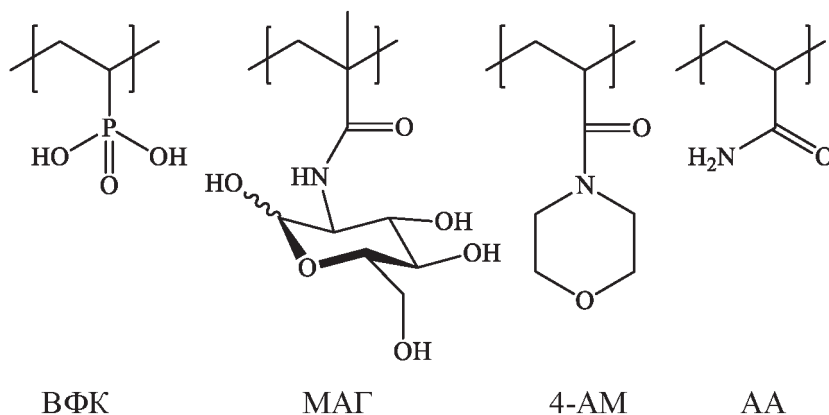
I – инициатор.

\* 80°C.

дин) дигидрохлорид (АМП). Полимеры очищали диализом против воды и выделяли методом лиофильной сушки.

Состав и структуру сополимеров устанавливали с помощью <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P ЯМР-спектроскопии в растворе D<sub>2</sub>O на спектрометре Bruker Avance 400 (Германия). В <sup>1</sup>H спектрах всех синтезированных сополимеров присутствовали сигналы обоих со-

мономеров, а в <sup>31</sup>P спектрах – сигнал ВФК. Для определения состава сополимеров в качестве внешнего стандарта использовали 2-метакрилоилоксиэтилфосфорилхолин, как описано в статье [9]. Молекулярные массы (M<sub>SD</sub>) определяли методом седиментации и диффузии. Данные по условиям синтеза и свойствам полученных полимеров приведены в табл. 1.



Оценку цитотоксических и противовирусных свойств полимеров *in vitro* проводили как описано в [10].

В опытах использовали белых беспородных мышей (самки) массой 16–18 г из питомника “Рапполово” (Ленинградская обл.). Дизайн исследования утвержден Этическим Комитетом НИИЭМ им. Пастера (протокол № 7А от 15.02.2021). Навески полимера растворяли в физиологическом растворе и вводили животным (10 животных на группу) однократно интраназально (300 мкг/мл, 30 мкл на животное) за 1 ч до

инфицирования. Животные контрольной группы (плацебо) получали 30 мкл физиологического раствора.

Мышей заражали интраназально под эфирным наркозом вирусом в дозе 5 × 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> на мышь в объеме 30 мкл. Отдельную группу животных инфицировали вирусом в той же дозе, но предварительно инкубированным в течение 1 ч с раствором полимера (300 мкг/мл). Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней. Ежедневно фиксировали гибель животных. Достоверность различий в гибели животных оцени-

**Таблица 2.** Цитотоксичность и противовирусная активность фосфорсодержащих полимеров в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в культуре клеток MDCK

№	$M_{SD}, \times 10^{-3}$	$CC_{50}, \text{мкг/мл}$	$IC_{50}, \text{мкг/мл}$	SI
1 (ВФК/100)	30	>330	$1.3 \pm 0.2$	254
2 (ВФК: МАГ/12:88)	20	>330	$280.0 \pm 36.0$	1.2
3 (ВФК: МАГ/53:47)	5	>330	$15.5 \pm 2.3$	21.2
4 (ВФК: 4-АМ/13:87)	77	$30.0 \pm 2$	>30	<1
5 (ВФК: 4-АМ/14:86)	310	>330	$356.0 \pm 44.0$	<1
6 (ВФК: 4-АМ/56:44)	33	$302.0 \pm 15.0$	$1.0 \pm 0.2$	302
7 (ВФК: АА/28:72)	25	$84.0 \pm 6.0$	$72.0 \pm 10.1$	1.2

**Таблица 3.** Активность фосфорсодержащего полимера 6 на модели летальной гриппозной пневмонии у мышей

Группа опыта	Показатели смертности в группе			
	Погибших животных (пало/заражено)	Смертность, %	ИЗ	<i>p</i>
Плацебо	9/10	90	–	1.0000
6 и/н	0/10	0	100	<0.0001
Инкубированный вирус*	9/10	90	0	0.6813

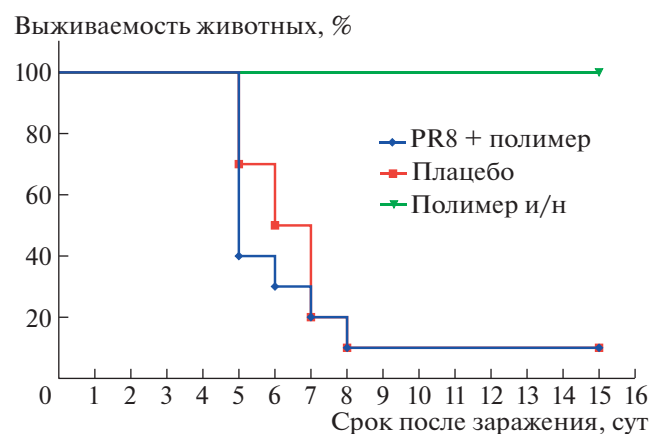
ИЗ – индекс защиты.

*p* – критерий Мантела–Кокса для попарных сравнений с группой плацебо.

и/н – интраназальное введение 6 за 1 ч до инфицирования вирусом.

\* – животные заражены вирусом, предварительно инкубированным с 6.

вали при помощи критерия Мантела–Кокса при анализе кривых выживаемости Каплана–Мейера пакета программ GraphPad Prism v.6.01. Достоверными считали различия между группами, если параметр *p* не превышал 0.05.



**Рис. 1.** Кривые выживаемости Каплана–Мейера в ходе гриппозной пневмонии у мышей, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico (H1N1) в условиях применения фосфорсодержащего полимера 6. PR8+ полимер – животные заражены вирусом, предварительно инкубированным с полимером (300 мкг/мл) в течение 1 ч. Плацебо – животные получали интраназально физиологический раствор. Полимер и/н – животные получали интраназально раствор 6.

Результаты изучения противовирусной активности и цитотоксичности фосфорсодержащих полимеров *in vitro* суммированы в табл. 2.

Из проанализированных максимальную активность ( $SI = 302$ ) имело соединение 6. На биологические свойства полимеров влияли их химический состав и молекулярный вес. Так, токсичность полимеров 4 и 5, имеющих практически идентичное соотношение мономеров ВФК и 4-АМ, различалась более чем на порядок, при этом большую токсичность имел полимер меньшего молекулярного веса.

Результаты изучения динамики гибели животных суммированы в табл. 3 и представлены на рис. 1.

Заражение животных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) приводило к их гибели, начиная с 5-х суток после инфицирования. К 14-м суткам эксперимента смертность животных в группе положительного контроля составила 90%. Предварительная инкубация вируса с изучаемым полимером не снижала показатели смертности животных ( $p = 0.6813$ ), тогда как предварительная интраназальная обработка мышей раствором полимера приводила к 100% их защите от летальной гриппозной инфекции ( $p < 0.0001$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен синтез и изучены свойства сополимеров винилфосфоновой кислоты (ВФК) с 2-деокси-2-метакриламидо-D-глюкозой, акриламидом и 4-акрилоилморфолином (4-АМ) как потенциальных средств ингибирования инфекционной активности вируса гриппа. Показано, что оптимальными противовирусными характеристиками обладает сополимер ВФК с 4-АМ в соотношении 56:44 молекулярной массой 33000. Полимер обладал низкой цитотоксичностью, проявлял вирусингибирующие свойства с  $IC_{50} = 1$  мкг/мл и индексом селективности 302. Профилактическое интраназальное применение полимера на модели гриппозной пневмонии у мышей полностью предотвращало специфическую смертность при гибели 90% животных в группе плацебо. Ранее проведенные исследования свидетельствуют также о способности фосфорсодержащих полимеров к активации неспецифической противовирусной защиты организма [11], что может обуславливать комплексный механизм борьбы с гриппозной инфекцией при использовании полимеров изученного состава. Полученные результаты свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале полимерных соединений на основе винилфосфоновой кислоты.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2020-794).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lampejo T. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2020. V. 39. № 7. P. 1201–1208.
2. Chow E.J., Doyle J.D., Uyeki T.M. // Crit Care. 2019. V. 23. № 1. P. 214.
3. Jabeen M., Dutot M., Fagon R., Verrier B., Monge C. // Pharmaceutics. 2021. V. 13. № 5. P. 733.
4. Schepler H., Wang X., Neufurth M., Wang S., Schröder H.C., Müller W.E.G. // Theranostics. 2021. V. 11. № 13. P. 6193–6213. <https://doi.org/10.7150/thno.59535>
5. Neufurth M., Wang X., Tolba E., Lieberwirth I., Wang S., Schröder H.C., Müller W.E.G. // Biochem Pharmacol. 2020. V. 182. P. 114215.
6. Müller W.E.G., Neufurth M., Wang S., Tan R., Schröder H.C., Wang X. // Mar. Drugs. 2020. V. 18. № 12. P. 639.
7. Yang S., Pannecouque C., Herdewijn P. // Chem Biodivers. 2012. V. 9. № 10. P. 2186–2194.
8. Pérez-Anes A., Stefaniu C., Moog C., Majoral J.P., Blanzat M., Turrin C.O., Caminade A.M., Rico-Lattes I. // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. № 1. P. 242–248.
9. Nazarova O., Chesnokova E., Nekrasova T., Zolotova Yu., Dobrodumov A., Vlasova E., Fisher A., Bezrukova M., Panarin E. // Polymers. 2022. V. 14. № 3. P. 590.
10. Smirnova I., Petrova A., Lobov A., Minnibaeva E., Phoung T.T.T., Van L.T., Khine M.M., Esaulkova I., Slita A., Zarubaev V., Kazakova O. The Journal of Antibiotics. 2022. V. 75. № 5. P. 258–267.
11. Neufurth M., Wang X., Wang S., Schröder H.C., Müller W.E.G. // Mar. Drugs. 2021. V. 19. № 2. P. 64.

## SYNTHESIS AND ANTI-INFLUENZA ACTIVITY OF VINYLPHOSPHONIC ACID (CO)POLYMERS

V. V. Zarubaev<sup>a</sup>, E. V. Buchkov<sup>b</sup>, O. V. Nazarova<sup>c</sup>, Yu. I. Zolotova<sup>c, #</sup>,  
and Corresponding Member of the RAS E. F. Panarin<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences (IMC RAS), Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: incorporate@inbox.ru

New copolymers of vinylphosphonic acid (VPA) with 2-deoxy-2-methacrylamido-D-glucose, 4-acryloylmorpholine (4-AM), and acrylamide have been synthesized, and their antiviral activity against influenza virus has been studied in *in vitro* and *in vivo* experiments. Optimal antiviral characteristics and low cytotoxicity were exhibited by the copolymer of VPA with 4-AM, composition 56: 44 mol.%, molecular weight 33000. The polymer revealed virus-inhibiting properties with an  $IC_{50} = 1$   $\mu$ g/mL and a selectivity index of 302. Prophylactic intranasal application of the polymer in a murine model of influenza pneumonia completely prevented virus-induced death of animals; the level of mortality in the placebo group being 90%. The results obtained indicate a high antiviral potential of polymeric compounds based on VPA.

**Keywords:** phosphorus-containing polymers, vinyl phosphonic acid, copolymers, influenza, antiviral compounds