

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ СИСТЕМЫ КОМБИНИРОВАННОГО ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ ВИРУСАМ – БИО-НАНО-КОМПОЗИТНЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПАРАЗИТАМ

^{1,2}Сербин А.В.*, ²Егоров Ю.А., ^{1,2}Алиханова О.Л.

¹Научно-инновационный фонд Здоровья

²Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН

*serbin@ips.ac.ru

Рассмотрены преимущества соразмерно адекватной макромолекулярной кооперации полиэлектролитов и разновекторных фармакофоров в целях защиты от вирусов с учетом их биополимерной нанокомпозитной природы. Показаны возможности поливалентного действия и сочетания многоуровневых механизмов: 1 – посредством стимуляции иммунитета (продукции антител, интерферона и др.), 2 – конкуренции с рецепторами клеток за перехват вирионов и 3 – прямой блокады клеточной репродукции генетических паразитов.

Ключевые слова: синтез, полиэлектролит, модификация, вирус, нанокомпозит, противовирусный ингибитор.

POLYELECTROLYTE SYSTEMS FOR COMBINED COUNTERACTION TO VIRUSES – THE BIO-NANO-COMPOSITE GENETIC PARASITES

^{1,2}Serbin A.V.*, ²Egorov Yu.A., ^{1,2}Alikhanova O.L.

¹Health Research & Development Foundation

²A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, RAS

The principal advantages of macromolecular design of polyelectrolytes in cooperation with multi-vector pharmacophores for scale-adequate protection against viruses are considered, accounting the viral biopolymeric-nanocomposite nature. New possibilities for polyvalent impacts and combination of multilevel mechanisms: 1 – mediated by an immune stimulation (of antibody, interferon production, etc.), 2 – competition with cell receptors for interception the virions, and 3 – direct blocking the genetic parasites reproduction, are demonstrated.

Keywords: synthesis, polyelectrolyte, modification, virus, nanocomposite, antivirals.

Вирусы как интер-био-полимерные нанокомпозиты

Стержнем молекулярной эволюции известных нам форм биологической жизни являются биополимеры (БП), объединяющие химические структуры «малых» молекул в стабильно целостные цепочки (и сети). В отличие от «малых» молекул, разобщаемых хаосом теплового движения, именно БП накапливают основной структурно-функциональный и энергетический потенциал устойчивой самоорганизации в более сложные надмолекулярные жизнеспособные системы. Круг наиболее значимых БП можно рассматривать, начиная с полиметилена содержащих липидов (ЛП) – основы клеточных мембран, до полисахаридов (ПС), белков (БЛ) – структурно-функциональной базы и нуклеиновых кислот (НК) – носителей генома. Размеры БП и их комплексов соответствуют масштабам нанообъектов. Они типичны практически для всех живых организмов, включая мельчайшие пограничные формы жизни, – вирусы. Нанокомпозитная природа [(НК)_x(БЛ)_y(ЛП)_z] внеклеточных вирусных частиц – «вирионов» (типично 30–500 нм) на примере вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) и схема репродукционного цикла генетических паразитов клеток представлены на рис. 1 [1, 2].



Рис. 1. Биополимерно-нанокompозитная природа вирусов, репродукционный цикл их паразитической интервенции в клетки и приоритеты медикаментозной контр интервенции в жизненный цикл самих вирусов соразмерно масштабам терапевтических мишеней: посредством низко- или высокомолекулярных препаратов – на этапах III или I, II и IV, соответственно

Концепция молекулярно-соразмерной этиотропной защиты

В медицинской практике противовирусных лекарств доминируют пока низкомолекулярные соединения (НМЛ) – «малых» (≤ 1 нм) молекул. Однако потенциал и диапазон их возможностей имеют фундаментально-объективные ограничения в силу геометрической, функциональной и энергетической несоразмерности ключевым БП-наномишеням ($\geq 10-100$ нм), (рис. 1). НМЛ способны эффективно нейтрализовать лишь сопоставимо малые молекулярные объекты, или небольшие фрагменты макромолекул БП, которые в рамках жизненного цикла вирусов наиболее доступны и уязвимы на этапе внутриклеточной репликации – III (рис. 1). Именно здесь дезинтеграция нанокompозитного вириона максимальна, а его НК геном запускает интенсивный биосинтез своего потомства, массово вовлекая «малые» структуры метаболитов и реакционных центров специфических ферментов. Существенно менее представлены подходящие для НМЛ мишени в составе вириона (I), на входе в клетку (II) или после репликации – в процессе сборки – созревания дочерних вирусных частиц и их выхода (IV) из клетки [2]. С точки зрения ограниченных возможностей НМЛ показателен пример аминокпроизводных адамантана и родственных структур (рис. 2).

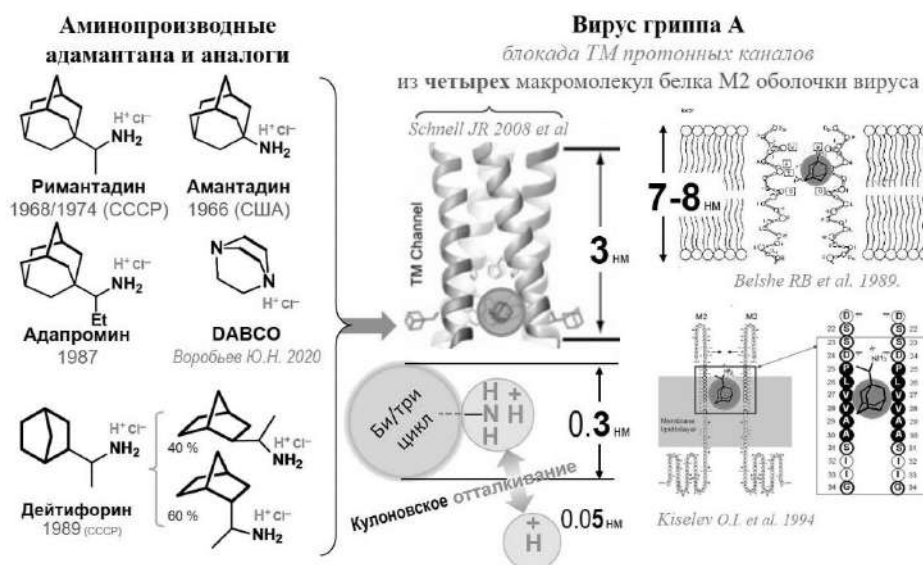


Рис. 2. Молекулярные структуры ряда аминокпроизводных адамантана (и аналогов) и основной механизм их ингибирующего действия против вирусов гриппа типа А

Ещё во второй половине прошлого века амантадин, ремантадин, а затем и их аналоги нашли широкое применение, как НМЛ против гриппа А. Основным механизмом их действия – блокада протонных каналов оболочки вируса, необходимых для её слияния с лизосомальной мембраной клетки [3, 4]. Хотя размеры молекул этих НМЛ на порядки меньше габаритов тетрамерных комплексов белковых макромолекул $(M2)_4$, формирующих канал, они вполне соразмерны узкому туннелю канала, эффективно блокируя трансмембранный транспорт на порядок ещё более малых протонов [2]. Тем не менее, размер НМЛ определяет ряд закономерных ограничений. **1.** Соразмерно *малый и узко специализированный диапазон действия*, в частности, каналы $(M2)_4$ специфичны для вирусов гриппа типа А, но большинство других вирусов, таких каналов не имеют и практически не восприимчивы к данной группе препаратов. **2.** Возможность *связывания лишь с малым сайтом мишени* (в случае $(M2)_4$ – в пределах аминокислот -Val27--Ala30-Ser31--Gly34- [3, 4]) предопределяет *лёгкость выхода вирусов из-под контроля* НМЛ путем простейших точечных мутаций. В результате повсеместное применение ремантадина привело к глобальному распространению новых мутантных популяций вируса гриппа А, резистентных к данным препаратам [5]. Кроме того, *лёгкость проникновения* НМЛ *через* мембраны и др. *защитные барьеры* сопряжена со значительной побочной токсичностью [6]. Преодоление указанных проблем возможно лишь на пути соразмерно-адекватного проектирования лекарств именно против нанообъектов. Это внеклеточные вирионы (**I**), макромолекулярные медиаторы их проникновения в клетки (**II**), интермедиаты сборки и выхода вирусного потомства (**IV**). Все они могут и должны быть "законными" мишенями для сопоставимо крупных – полимерных ингибиторов [1, 2] (рис. 1).

Экспериментально-теоретические основы и подходы

Приведенный пример НМЛ на основе соединений ряда адамантана и каркасно-циклических аналогов показывает их весьма ограниченную эффективность, которая легко преодолевается вирусом. Но есть ли у тех же соединений потенциал стать более активными, в том числе и против других вирусов? Оценка вероятных мишеней на примере ВИЧ-1 в экспериментах *in vitro* показала, что ни амантадин, ни ремантадин сами по себе не активны против ВИЧ. Но их ковалентные конъюгаты с полимерными электролитами способны проявлять высокую активность уже на входе (**II**, рис. 1) в клетку – блокируя слияние оболочки вириона с клеточной мембраной [7]. Это привлекло наше внимание к тримолекулярному комплексу гликопротеина $(gp41)_3$ как медиатору слияния и, следовательно, наиболее вероятной мишени [8]. Дальнейшее моделирование методами докинга и молекулярной динамики, выполненное в сотрудничестве с Цветковым В.Б., подтвердило эту гипотезу [9–11]. На рис. 3 показана разница между атакой на NHR регион $(gp41)_3$ одиночных молекул НМЛ и полимер-связанной «команды» тех же молекул.

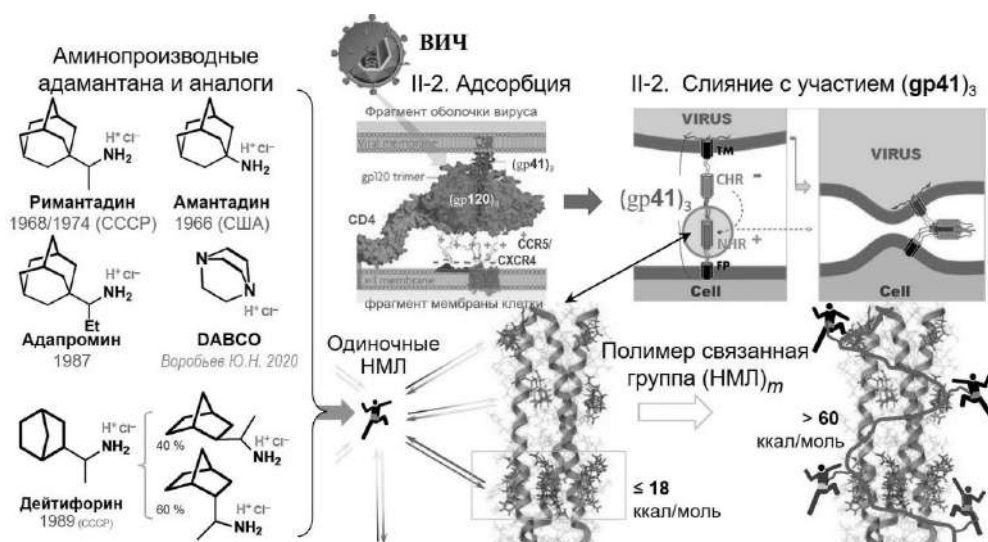


Рис. 3. Оценка потенциала атакующей эффективности одиночных (разрозненных во времени и пространстве) «малых» молекул НМЛ и их полиэлектролит-связанной «команды» (согласованной в пространстве и по времени за счет полимерной связи) в отношении NHR региона $(gp41)_3$ – критической мишени для блокады слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной.

В первом случае связывание мишени нестабильно и легко разрушается тепловым движением, а во втором многоточечная кооперация группы лигандов НМЛ, ковалентно объединенных цепочкой полиэлектролита (имеющего также заряд-избирательную адгезионную активность), многократно усиливает суммарную энергию и стабильность связывания наномишени

Таким образом, низкомолекулярные соединения, включая традиционные НМЛ, могут кардинально расширить диапазон своей противовирусной компетенции и эффективности. Это становится возможным, если «малые» молекулы рациональным образом объединять в укрупненные по структуре, функциональности и энергии «команды» на полимерной платформе. Именно такой подход и составляет стратегическую линию исследований нашей группы [1, 2, 6–11]. Но вначале предстояло решить вопрос синтеза и отбора вариантов полимерных цепей, наиболее соответствующих поставленным целям. Алгоритм движения к цели заключался в последовательности ключевых критериев, предъявляемых к кандидатам в качестве полимерной основы. **1.** Растворимость в водных физиологических средах. **2.** Избирательность кулоновской ориентации на вирусные мишени – приоритет анионных полиэлектролитов, отрицательный заряд которых в конкуренции с одноименным зарядом клеточной поверхности будет направлен на поликатионную поверхность вирионов. **3.** Возможность стабилизации ионных связей связями водородными – для этого в диапазоне физиологических значений pH пригодны фрагменты янтарной кислоты с двумя карбоксильными группами, одна из которых ионизируется, а вторая сохраняет атом водорода. Требования **1–3** легко достигаются синтезом и гидролизом сополимеров малеинового ангидрида (МАН). **4.** Удобство ковалентной модификации цепи также реализуется в рамках сополимеров МАН путем частичного предгидролизного аминоллиза или алкоголиза (с образованием амидных или сложноэфирных связей, соответственно). **5.** Минимальная токсичность. **6.** Желательность собственной активности полимера, полезной для целевых противовирусных эффектов. Способность полиэлектролитов (ПЭ) ускорять продукцию антител (Ig), известная в литературе [12], обнаружена и в ряду сополимеров МАН [8]. При этом анионные ПЭ (АПЭ), подобные остову нуклеиновых кислот, активны также и как индукторы противовирусных форм интерферона (IFN) [8, 9]. Они же, в силу отрицательного заряда, способны быть избирательными перехватчиками вирионов, замедляя их адсорбцию на клетках [1, 2, 8]. Таким образом, АПЭ – это уникальная платформа для реализации противовирусной защиты на уровнях как стимуляции иммунитета, так и прямой нейтрализации вирусов. Рациональный маршрут синтеза и результаты предварительного отбора вариантов не модифицированных ($m = 0$) образцов – прекурсоров показаны на рис. 4. Механизмы полимеризации и параметры управления размером, составом и изомерией цепей – в публикациях [8, 13, 14].

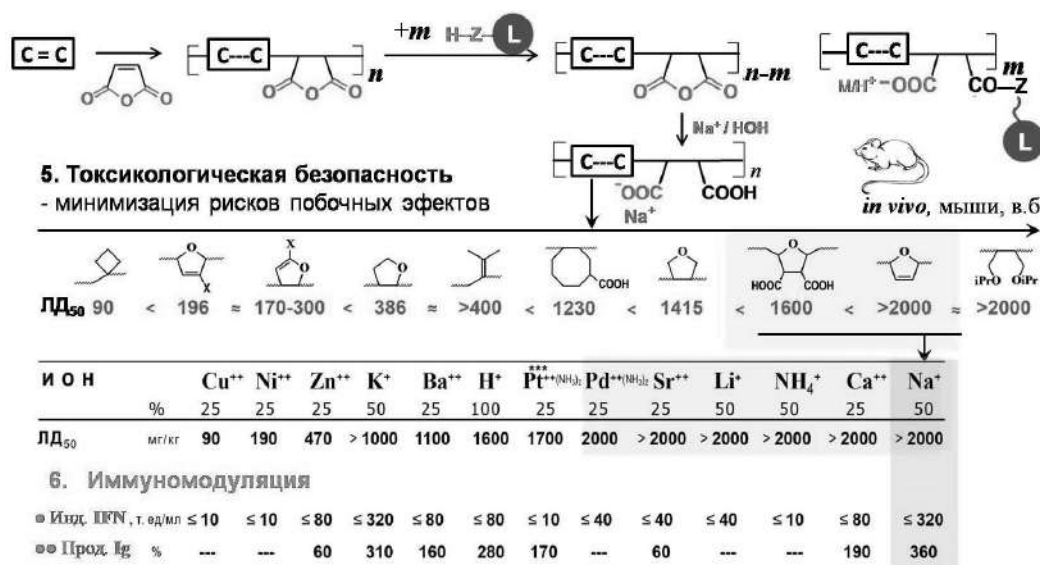


Рис. 4. Радикальная сополимеризация МАН с ненасыщенными [C=C] мономерами, контролируемая модификация порции m звеньев взаимодействием ангидридных групп цепи с amino- ($Z=NH$) или спиртовыми ($Z=O$) производными желаемых лигандов (L) с завершающим гидролизом остаточных ($n-m$) ангидридных групп до фрагментов янтарной кислоты. Ниже показаны значения переносимых с 50 %-ной смертностью доз (LD_{50} , мг/кг) вариаций для различных мономерных структур цепи, а затем и вариаций катионов. Показана также иммуномодулирующая активность на примере индукции интерферона и стимуляции продукции антител в ответ на антиген эритроцитов барана [8]




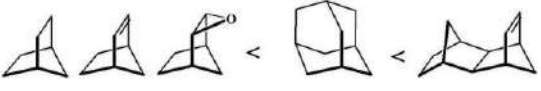
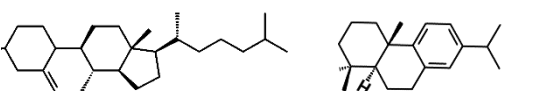
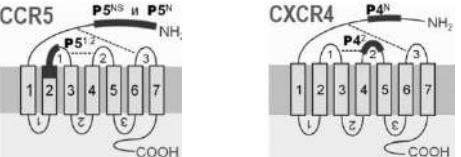
Результаты и их обсуждение

В числе лидеров отбора следует выделить полу Na соли гидролизатов сополимеров МАН с дивиниловым эфиром и фураном, рис. 4. Они проявляют одновременно низкую токсичность ($LD_{50} \geq 1600-2000$ мг/кг) и

способность стимулировать как гуморальные (IFN, Ig), так и клеточные факторы иммунитета. Это дает высокий уровень защиты экспериментальных животных от поражения летальными дозами нейровирусов, опасных для человека [8]: клещевого энцефалита (ВКЭ), бешенства (ВБ), энцефаломиелита (ВВЭЛ)... Наряду с иммуноопосредованной противовирусной активностью, эта же группа показала также ожидаемую от отрицательно заряженных АПЭ ($m=0$) тенденцию прямого подавления вирусов на клеточных культурах (*in vitro*). Такая активность подтверждена в отношении различных штаммов ВИЧ, вирусов гриппа (ВГ) и цитомегаловируса (ЦМВ) [13], табл. 1, Серия 1.

Таблица 1

Целевая эффективность АПЭ ($m=0$) и их модификаций ($m > 0$)

СЕРИЯ ПРЕПАРАТОВ			ПРОТИВОВИРУСНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ					
№	Тип модификатора * 	Степень модификации m/n	Достижимые <i>in vitro</i> значения $SI = CC_{50}/IC_{50}$			Наблюдаемая <i>in vivo</i> защита, %		
			ВИЧ	ВГ	ЦМВ	ВКЭ	ВБ	ВВЭЛ
1	Без модификаторов	0	10–100	≤ 30	≤ 350	65(-)	55(82)	65(95)
2	-Z-мостик-SO ₃ ⁻	≤ 0.80	>680	→10000	7500	 Испытания <i>in vivo</i> проводили с жесткими летальными дозами вирусов до 200 ЛД ₅₀ (в скобках – защита совместно с вакциной)		
3	-Z-мостик-Nb	0.1-0.3	>3300	>2140	240			
4	-Z-мостик-Ad	0.1-0.3	>1100	→10000	25			
5	-Z-мостик-Chol	≤ 0.03	>220	5400	–			
6	-Z-мостик-Pept ^{Cell CCR}	≤ 0.02	→10000	–	–			
7	-Z-мостик-Pept ^{VirMAPr}	≤ 0.01	+	← Подготовлены опытные образцы				
* Молекулярная природа модификаторов			Потенциальные мишени					
3–4		Каркасные циклы норборна (Nb), адамантана (Ad) и производных				II вход в клетку: объекты кл. мембран, вирусные оболочки и белки слияния		
5		Холестерин и аналоги (Chol)				II вход в клетку: "raft" домены кл. мембран – порталы входа вирусов		
6		Пептидные фрагменты ВИЧ-восприимчивых CCR5 и CXCR4 хемокиновых рецепторов клеток человека				I вирионы и II вход в клетку: рецептор- конкурентный перехват вирионов ВИЧ		
7		Пептидные фрагменты капсидного белка ВИЧ	Полипептидные участки до 33 аминокислот с аминогруппами для амидной «прививки» к цепям АПЭ в различных позициях			IV сборка вирионов белок- конкурентная блокада сборки ВИЧ		

Согласно вышеизложенным прогнозам, мощный ресурс дальнейшего усиления и расширения противовирусной эффективности АПЭ следует ожидать на пути их рациональной модификации в качестве платформы для кооперации потенциалов «малых» молекулярных структур в полифункциональные «наноконпетентные» полимерные системы. На практике нами выполнено проектирование и синтез не менее шести рядов производных АПЭ, представленных в табл. 1 Сериями 2–7. Усиление отрицательно заряда (Серия 2) нацелено на перехват положительно заряженных вирионов (этапы I и II, рис. 1) в

конкуренции с отрицательным зарядом рецепторов клеток. Фактор гидрофобности (Серии 3-5) фокусирует защиту на клеточные мембраны (этапы II и IV), при этом модификации 3 и 4 способны активировать блокаду слияния вирусных оболочек с мембранами, а 5 – акцентируют действие на “raft”-домены мембран – эпицентры проникновения вирусов. Пептидные вставки Серии 6 ориентированы на рецептор-конкурентный перехват вирионов ВИЧ на этапах I и II, а Серии 7 – на подавление сборки вирионов на завершающем этапе IV рис. 1.

Выводы и перспективы

Результаты испытаний на экспериментальных моделях *in vitro* (табл.1), а также анализ молекулярных механизмов активности методами моделирования [9–11] показали исключительную эффективность адекватно соразмерных многоточечных воздействий на ключевые нано мишени вирусов для усиления противовирусной защиты и предотвращения вирусной резистентности. Это свидетельствует о высоком практическом потенциале дальнейшего развития предложенных подходов. По сравнению с низкомолекулярными прототипами, полимер-кооперированные производные оптимальной конфигурации проявили многократно ($10\text{-}10^3$) усиленный защитный эффект, существенно расширенный по спектру вирусов, подавляемых препаратами нового поколения [16–20]. Их наномасштабная компетенция кардинально дополняет имеющийся арсенал более узкой эффективности традиционных низкомолекулярных лекарств.

Работы выполнены в сотрудничестве с научными центрами химии органических соединений и смежного медико-вирусологического профиля.

Библиография

1. Serbin A.V., Karaseva E.N., Tsvetkov V.B., Alikhanova O.L., Rodionov I.L. Hybrid polymeric systems for nano-selective counter intervention in virus life cycle // *Macromol. Symp.* 2010. V. 296, N 1. P. 466–477.
2. Сербин А.В., Алиханова О.Л. Наноразмерные мишени терапевтической контр интервенции в жизненный цикл вирусов // Прогресс науки химии, технологии, экологии: материалы международной научно-методической конференции. Душанбе: 2023. С. 246–248.
3. Belshe B.B., Hay A.J. Drug resistance and mechanism of action amantadine on influenza A viruses // *J. Respir. Dis.* 1989. V. 10, P. S52–S61.
4. Тандура С.Н., Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Киселёв О.И. Противогриппозный химиопрепарат Дейтифорин // *Антибиотики и химиотерапия.* 2013. Т. 58, № 1-2. С. 36–48.
5. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) // *MMWR* 21. 2011. V. 60, N 1. P. 1–26.
6. Stotskaya L.L., Serbin A.V., et al. The efficacy of new adamantane-containing polymers against the influenza virus and their effect on membrane ion transport // *Pharm. Chem. J. (Moscow, Russia).* 1995. V. 29, N 3. P. 171–174.
7. Burstein M.E., Serbin A.V., Khakhulina T.V., Alymova I.V., Stotskaya L.L., Bogdan O.P., Manukchina E.E., Jdanov V.V., Sharova N.K., Bukrinskaya A.G. Inhibition of HIV-1 replication by newly developed adamantane-containing polyanionic agents // *Antiviral Research.* 1999. V. 41, N 3. P. 135–144.
8. Сербин А.В. Пути создания биоселективных полимерных систем комбинированного противовирусного действия: дисс... докт. хим. наук. М., 2005. 333 с.
9. Сербин А.В., Веселовский А.В., Цветков В.Б. Исследование *in vitro* и *in silico* интерферогенных аналогов нуклеиновых кислот, искусственно программируемых на блокаду начальных этапов ВИЧ-инфицирования клеток // *Биотехнология.* 2012. № 1. С. 72–89.
10. Tsvetkov V.B., Serbin A.V. A Novel View of Modelling interactions between synthetic and biological polymers via docking // *J. Comp.-Aid. Mol. Design.* // 2012. V. 26, N 12. P. 1369–1388.
11. Tsvetkov V.B., Serbin A.V. Molecular dynamics modeling the synthetic and biological polymers interactions pre-studied via docking // *J. Comp.-Aid. Mol. Design.* 2014. V. 28, N 6. P. 647–673.
12. Кабанов В.А. От синтетических полиэлектролитов к полимер-субъединичным вакцинам // *Высокомолекулярные соединения А.* 2004. Т. 46, № 5. С. 759–782.
13. Serbin A.V., Karaseva E.N., Dunaeva I.V., et al. Controlled free radical copolymerization of maleic anhydride and divinyl ether in the presence of reversible addition-fragmentation chain-transfer agents // *Polymer Science, Ser. B.* 2011. V. 53, N 3-4. P. 116–124.
14. Bolshchikov B.D., Tsvetkov V.B., Alikhanova O.L., Serbin A.V. How to fight kinetics in complex radical polymerization processes // *Macromol. Chem. Phys.* 2019. V. 220, N 23. 1900389, P. 1–20.
15. Сербин А.В., Карасева Е.Н., Федорова Н.Е., Павлова М.В., Климова Е.В., Леонтьева М.В., Куш А.А. Производные карбокси-миметиков полимерного остова нуклеиновых кислот, ингибирующие

цитомегаловирус человека. 1. Микробицидный эффект *in vitro* // Антибиотики и химиотерапия. 2007. Т. 52, № 11-12. С. 8–13.

16. Патент РФ № 2270690. Комплексное ати-ВИЧ соединение / Тимофеев И.В., Сербин А.В., Перминова Н.Г., Тимофеев Д.И., Плясунова О.А., Неклюдов В.В., Карпышев Н.Н. Оpubл. 27.02.2006 г. Бюл. № 6.

17. Патент РФ № 2281297. Ингибиторы репродукции вируса иммунодефицита человека на основе полианионных производных норборнана и способ их получения / Букринская А.Г., Бурштейн М.Е., Алиханова О.Л., Ермаков И.В., Касьян Л.И., Касьян А.О., Сербин А.В., Тарабара И.Н. Оpubл. 10.02.2006 г. Бюл. № 4.

18. Патент РФ № 2315617. Комплекс мембранотропных соединений для профилактики и лечения ВИЧ-инфекции / Тимофеев И.В., Перминова Н.Г., Сербин А.В., Тимофеев Д.И., Плясунова О.А. Оpubл. 27.01.2008 г. Бюл. № 3.

19. Патент РФ № 2306950. Комплексная аутологичная вакцина против ВИЧ-инфекции и СПИД / Тимофеев И.В., Перминова Н.Г., Блинов В.М., Карпышев Н.Н. Оpubл. 27.09.2007 г. Бюл. № 27.

20. Патент США № 5880154. Polymeric adamantane analogues / Boukrinskaja A.G., Serbin A.V., Bogdan O.P., Stotskaya L.L., Alymova I.V., Klimochkin Yu.N. Оpubл. 09.03.1999 г.