

На правах рукописи

Ю.Егоров

ЕГОРОВ

Юрий Анатольевич

**МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ И БИОСЕЛЕКТИВНОСТИ
ПОЛИМЕРНЫХ КАРБОКСИ- И СУЛЬФОКИСЛОТ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ
АЛИЦИКЛИЧЕСКОГО РЯДА**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Москва - 2006

Работа выполнена в ордена Трудового Красного Знамени Институте нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН и Исследовательском центре биомодуляторов и лекарственных соединений Научно-инновационного фонда Здоровья.

Научный руководитель: доктор химических наук
Сербин Александр Владимирович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Штильман Михаил Исаакович
доктор химических наук, профессор
Маковецкий Кирилл Львович

Ведущая организация: **Институт химической физики
им. Н.Н.Семенова РАН**

Защита диссертации состоится « 12 » октября 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.234.01 в Институте нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН по адресу 119991, ГСП-1, Москва, Ленинский проспект, 29, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН.

Автореферат разослан « 12 » сентября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Сорокина Е.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Развитие новых подходов для создания биоселективных макромолекулярных систем медицинского назначения является одной из наиболее востребованных и интенсивно развивающихся областей современной науки и технологии ВМС. В качестве иммуномодуляторов, микробицидов и противовирусных агентов наибольший интерес представляют синтетические и полусинтетические полиэлектролиты, ценные свойства которых определяются макромолекулярной кооперацией электрически заряженных (анионных или катионных) групп и их многоочечным воздействием на биологические мембраны и рецепторы. Однако один лишь электростатический фактор ионных функциональных групп не обеспечивает достаточно высокой биоселективности, существенно ограничивая возможности эффективного и безопасного применения синтетических полиэлектролитов в медицинской практике. В этой связи особую актуальность приобретает разработка новых стратегий макромолекулярной трансформации полиэлектролитов в более совершенные «комбинированные» формы, в которых фактор электростатически-обусловленной («монофункциональной») избирательности был бы синергически усилен дополнительными факторами структурно-специфических и гидрофобных воздействий на биологические мишени. В развитие соответствующих исследований по созданию нового поколения ВМС комбинированного противовирусного действия в рамках данной диссертационной работы были поставлены нижеследующие цель и задачи.

Цель работы и основные задачи исследования

Цель – функционально направленный синтез новых ВМС, сочетающих в себе свойства анионных полиэлектролитов со структурными фрагментами алициклического ряда в таких внутримолекулярных комбинациях, которые обеспечивают биоселективное усиление противовирусных функций макромолекул при их минимальной токсичности в отношении клеток.

Задачи исследования:

- 1) синтез новых ВМС на основе сополимера малеинового ангидрида с дивиниловым эфиром и природного полисахарида – декстрана, с поэтапной полимераналогичной модификацией по двум направлениям: по электростатическому фактору - в ряду карбокси- и сульфокислотных производных и по фактору структурно-специфических гидрофобных фармакофоров преимущественно алициклического ряда (моно-, би-, три- и полициклического типа);
- 2) синтез производных алициклов, содержащих «спейсерные» мостики регулируемой длины (и конфигурационной подвижности) с концевыми реакционно-активными группами для ковалентной прививки к полимерной цепи;
- 3) синтез низкомолекулярных «модельных» соединений - аналогов модифицированных звеньев исследуемых полимеров;
- 4) выявление и исследование закономерностей «структура – биологическая активность» (SAR-анализ) синтезированных ВМС по биофункциональному критерию «индекс селективности» противовирусного действия $IS = TC/EC \rightarrow \max$, где TC и EC – пороговые концентрации цитотоксической безопасности и противовирусной эффективности вещества, соответственно.

Научная новизна

Впервые осуществлен синтез более 50 ранее не изученных продуктов полимераналогичной модификации декстрана и сополимеров малеинового ангидрида, сочетающих свойства анионогенных полиэлектролитов с полимер-кооперированными функциями различных алициклических структур, связанных с полимером через «спейсерные» мостики. В ряду синтезированных ВМС впервые исследованы закономерности «структура-цитотоксичность – противовирусная активность». Разработаны новые подходы к целенаправленной оптимизации макромолекулярных сочетаний и соотношений различных типов анионогенных (карбокси и сульфокислотных) и алициклических (предпочтительно каркасных или стероид-подобных) структур, позволяющие достигать высоких степеней IS противовирусного действия в отношении вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) и герпеса.

Практическая значимость

Полученные результаты представляют практическую ценность для разработки высокоэффективных противовирусных препаратов нового поколения, остро необходимых для современной медицины (защиты от СПИДа и иных вирусных заболеваний), а также для решения аналогичных задач в ветеринарии и агропромышленном производстве.

Апробация работы.

Результаты работы докладывались на IX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва 2002), научной конференции ИНХС РАН (Москва, 2003), Международной конференции «Перспективы развития химии и практического применения алициклических соединений» (Самара, 2004), XII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, Марий-Эл, 2005), Европейском полимерном конгрессе – EPF 2005 (Москва, 2005), Международной конференции «Биологические мишени для действия лекарственных препаратов нового поколения. Перспективы интеграции российских ученых в международную кооперацию» (Химки, МО, 2006), 19-ой Международной конференции по противовирусным исследованиям (Сан Хуан, Пуэрто-Рико, США, 2006).

Публикации.

По материалам диссертационной работы опубликованы 1 статья и тезисы 9-ти докладов на конференциях, краткие сообщения двух докладов опубликованы в международном журнале *Antiviral Research (Elsevier)*.

Объем и структура работы.

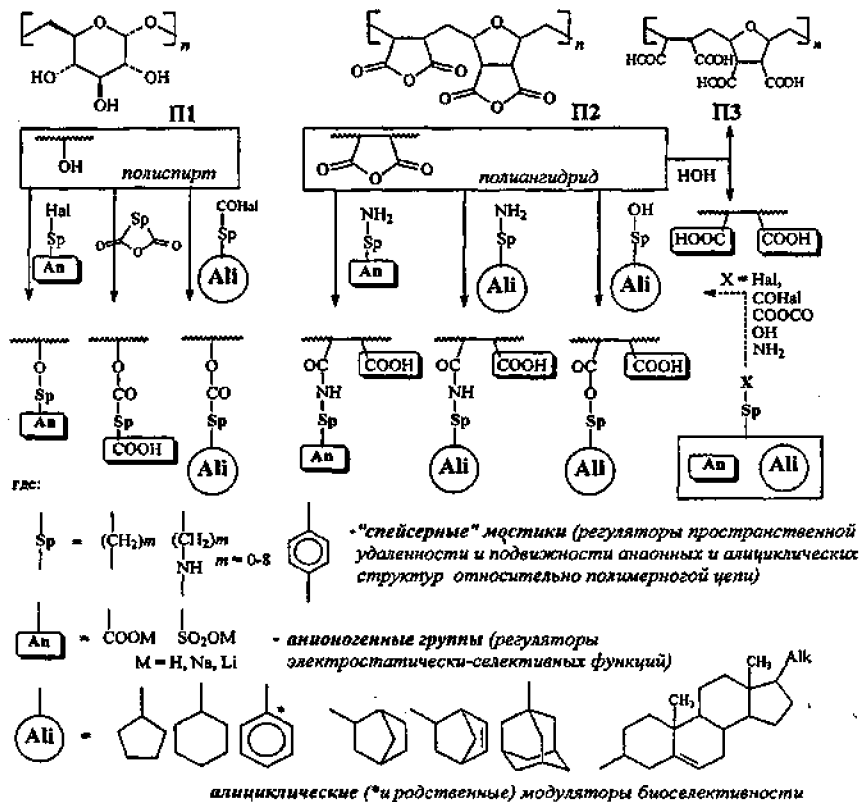
Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава I), постановки задач и обсуждения результатов собственных исследований (главы II-IV), экспериментальной части (глава V), выводов и списка цитируемой литературы (245 наименований). Диссертация изложена на 122 страницах, содержит 6 таблиц, 30 схем и рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования

В качестве «базовых» полимерных матриц для полимераналогичного синтеза на их основе новых ВМС были выбраны два типа полимерных объектов (схема 1): типичный представитель природных водорастворимых полимеров полисахаридного ряда – декстран (П1) и синтетический продукт радикальной чередующейся циклосополимеризации малеинового ангидрида и дивинилового эфира (П2), гидролизованная поликарбоксилатная форма которого (П3) также прекрасно растворима в водных (в том числе в физиологических) средах.

Схема 1.



Согласно литературным данным П1 и П3, в области молекулярных масс (ММ) до 30-50 кДа характеризуются низкой токсичностью в отношении клеток человека и животных ($ТС_{50}$ порядка 1000-2000 мкг/мл [данные НИФЭ])¹. Полисахаридный остов П1 подвержен биодеструкции, что может быть полезным для более быстрого выведения его производных из организма. С другой стороны, устойчивость к ферментам синтетической полимерной основы П2/П3 предпочтительнее для обеспечения стабильности как структуры (в т.ч. ММ), так и всего комплекса функциональной активности производных П2/П3. Исходный неионный полисахарид П1 не проявляет каких-либо признаков специфического противовирусного действия, тогда как синтетический анионный поликарбоксилат П3 широко известен и описан в литературе (включая результаты предшествовавших исследований ИНХС РАН и НИФ Здоровья) в качестве стимулятора реакций иммунитета, в т.ч. индуктора вируцидных форм интерферона.

Однако указанные иммунные реакции являются лишь «ответными», укрепляя сопротивляемость целостного организма (*in vivo*), но на уровне клеток (*in vitro*) они не обеспечивают селективной защиты от проникновения вирусных паразитов (инфицирования). Сами же макромолекулы П1 и П3, как было показано ранее [Букринская А.Г. и др.], также не способны к прямой блокаде проникновения вирусов в клетки, хотя согласно разработкам последних лет [Стоцкая Л.Л., Сербин А.В. и соавт.], продукты полимераналогичной модификации поликарбоксилатов, содержащие фрагменты каркасных углеводов, способны обретать такую активность. В развитие этих исследований в данной работе осуществлен синтез производных П1-П3, модифицированных алициклическими структурами расширенного диапазона (моно-, би-, три-, поли-циклов), а также ряда «модельных» аддуктов янтарной кислоты, имитирующих модифицированные звенья П2/П3. Кроме того, с учетом анализа литературных данных о

¹ $ТС_{50}$ - пороговая концентрация цитотоксической безопасности - концентрация вещества, вызывающая 50% подавление жизнеспособности клеток

макромолекулярно-полиэлектrolитной природе внешних оболочек вирусных частиц, несущих избыточный положительный заряд, особое внимание было уделено одновременному наращиванию потенциала электростатически-селективной нейтрализации вирусов поли-противоинным действием синтезируемых ВМС. Желаемый эффект ожидался за счет варьирования кислотных групп различной анионогенной силы (карбоксикислотные: изолированные $-\text{COOH}/\text{Na}$, вицинально-кооперированные $-\text{CH}(\text{COOH})-\text{CH}(\text{COOH}/\text{Na})-$; сульфокси-кислотные $-\text{SO}_2\text{OH}/\text{Na}$ и их смешанные композиции) в составе производных П1-П3. В обоих случаях модификации «базовых» ВМС, как алициклическими, так и анионогенными структурами, важная роль отводилась факторам пространственной структурно-функциональной оптимизации, что подразумевало разработку схем синтеза модификаторов с заготовками «спейсерных» мостиков ($-\text{Sp}-$) и реакционно-активных концевых групп ($-\text{X}$) для прививки к полимеру.

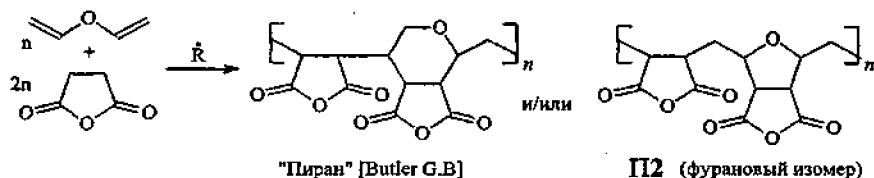
«Базовые» полимерные матрицы

Декстран (П1)

В работе использован коммерческий продукт фирмы *Pharmacia*, $\text{MM} = 10\,000$. В качестве реакционных центров для проведения целевых полимераналогичных модификаций рассмотрены окси-группы, преимущественно в положении 3 пиранового цикла, как наиболее реакционно-активные.

Сополи(малешниковый ангидрид-черед-дивиниловый эфир) (П2)

Синтез опытных образцов П2 осуществляли методом радикальной циклосополимеризации в растворе бензола или хлороформа в присутствии инициатора 2,2'-азо-бис-изобутиронитрила (схема 2). В целом была использована методика, описанная ранее [Butler G.B.], но впоследствии отработанная в ИХХС РАН и приводящая, как показали спектральные исследования [Горшкова М.Ю. 1996], к «фурановой» модификации, которая наиболее активна в качестве индуктора α -интерферона [Стоцкая Л.Л. и др.].



Наличие в структуре П2 ангидридных циклов, определяет его высокую гигроскопичность и гидролитическую лабильность, и если не принимать дополнительных мер, получаемый продукт содержит заметные количества гидролизованых звеньев ПЗ. Это является существенной проблемой при последующем проведении целевых модификаций в тех случаях, когда гидролитической конверсии П2 в ПЗ предшествуют реакции с окси- или амино-реагентами (см. далее). Поэтому в данной работе все операции, включая подготовку реагентов, синтез, выделение, очистку полимерного продукта и его хранение, выполнены в условиях исключающих доступ влаги: в инертной атмосфере (Ar, бокс) или в вакууме. ИК-спектр полученного сополимера характеризуется отсутствием признаков адсорбированной влаги или гидролиза, если подготовку образца для ИК-спектроскопии также проводить в сухой инертной атмосфере. Напротив, кратковременная (3-х минутная) экспозиция образца на воздухе приводит к появлению интенсивной полосы поглощения адсорбированной влаги, $3300-3600\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{O-H}}$, H_2O), и появлению плеча в области 1730 см^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$, COOH).

Состав и структура П2 подтверждена также данными элементного анализа и ЯМР (^1H и ^{13}C). В целях ограничения образования нежелательных высокомолекулярных фракций ММ П2 регулировали введением агента передачи цепи — тетрагидрофурана. Эбулископические и вязкозиметрические данные отвечают средней ММ = 15000-20000.

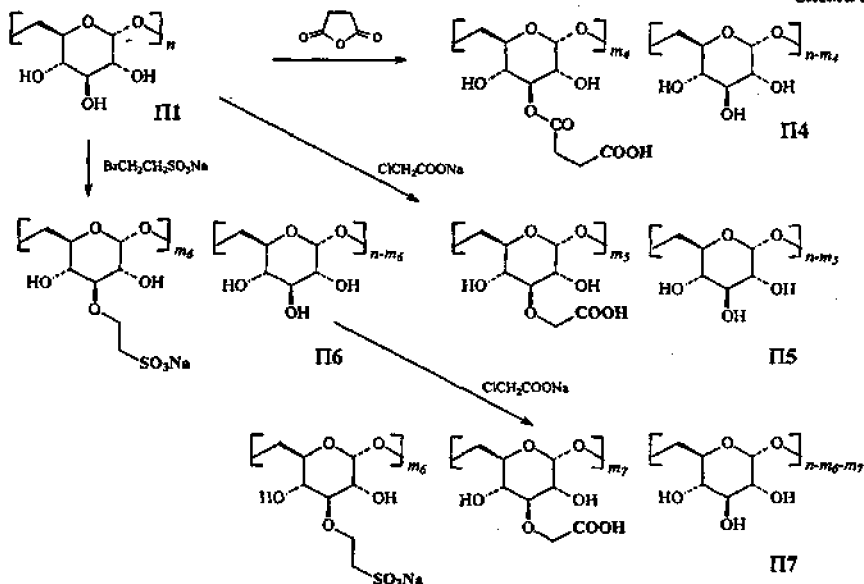
Полимераналогичные превращения базовых полимеров в анионные полиэлектролиты (поликислоты)

Химическая конверсия исходных неионных полимеров в анионные полиэлектролиты осуществлялась различными методами – с учетом различий химической природы П1 (полиспирт) и П2 (полиангидрид), при этом в обоих случаях целью данного этапа работы являлось получение набора полимерно-кислотных модификаций: карбоксилатного, сульфокислотного и смешанного типа.

Поликислотные производные декстрана

Модуляцию полиэлектролитных свойств П1 осуществляли по схеме 3:

Схема 3.

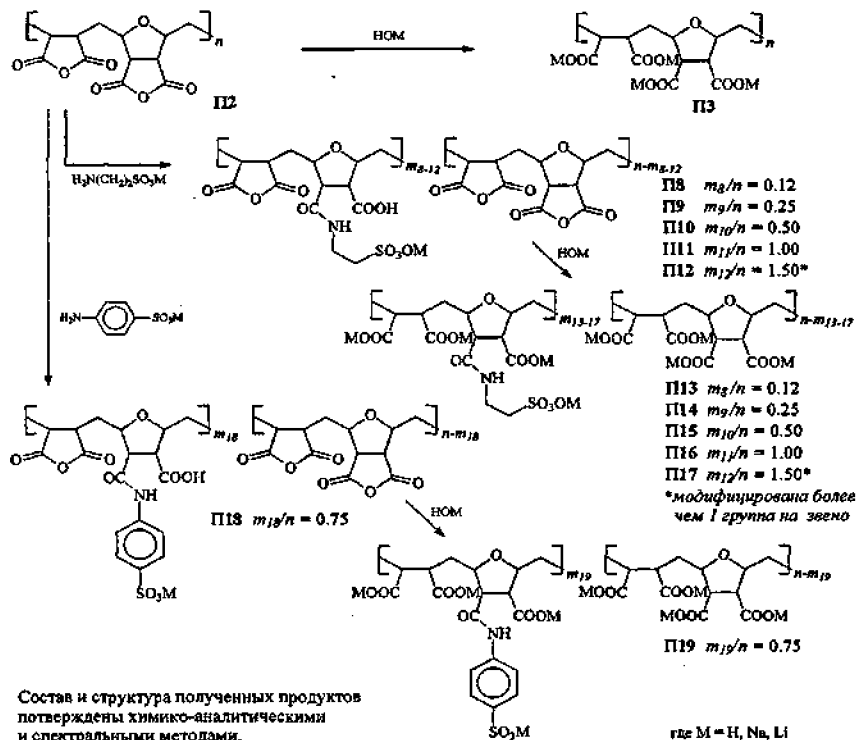


Полученные поликислоты П4 и П5 представляют собой слабоанионогенные поликарбоксилаты, П6 – более сильный анионоген сульфокислотного типа, а П7 – смешанную карбокси-сульфокси-поликислоту. Степень модификации варьировали в пределах: $m_4/n \leq 0.50$, $m_5/n \leq 0.80$, $m_6/n \leq 0.80$, и $m_7/n \leq 0.35$. Продукты охарактеризованы данными элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Поликислотные производные сополимера малеинового ангидрида

Очевидный способ перевода ангидридов в кислотную форму – гидролиз. Однако в конкретном случае П2 данный подход приводит только к карбоксилатной форме П3 – с умеренной анионогенной активностью, хотя и более выраженной, чем в случае полисахаридных аналогов П4 и П5 из-за кооперативного эффекта попарно-в vicinally расположенных $-\text{COOH}$ групп, усиленного стерическими возможностями дополнительной кооперации вдоль всей полимерной цепи. Получение еще более сильных анионогенов осуществляли двухстадийным способом: 1) первичная модификация ангидридных реакционных центров аминопроизводными сульфокислот и 2) исчерпывающий гидролиз остаточных ангидридных групп (схема 4):

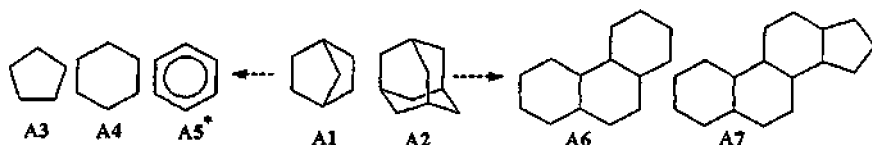
Схема 4.



Введение в макромолекулы алициклических структур

Выбор алициклических модуляторов

Выбор модификаторов структуры полиэлектролитов в качестве потенциальных модуляторов их биоселективности и синергистов противовирусной активности основан на анализе литературных данных о противогриппозном действии низкомолекулярных производных норборнана (A1) и адамантана (A2) (препараты дейтифорин, амантадин, ремантадин и др.), и позитивных результатах предшествовавших исследований [ИНХС РАН, НИФ Здоровья], обнаруживших мощный потенциал усиления противовирусной активности в условиях макромолекулярной кооперации указанных каркасных структур на базе ряда поликарбоновых кислот. В развитие этих исследований в данной работе акцентировали внимание на расширение диапазона исследуемых алициклических и родственных* структур как в сторону более простых моноциклических аналогов (A3-A5), так и сложных полициклических, но сочлененных не по каркасному принципу (A6, A7).



В последнем случае особый интерес представляют аналоги и производные холестерина, поскольку, согласно последним литературным данным, именно холестерин-обогащенные микродомены – «платформы» ("raft") клеточных мембран являются эпицентрами повышенного риска паразитической интервенции в клетку не менее 80% известных вирусов человека, включая ВИЧ – возбудитель СПИДа.

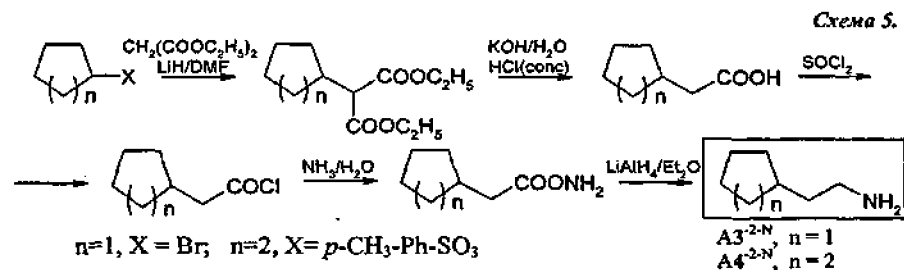
В задачи работы входило варьирование не только алициклических структур, но и природы реакционных центров модификации макромолекул (П1-П19), а также структуры промежуточных «спейсерных» мостиков. Это

потребовало целевого решения промежуточной задачи - разработки схем синтеза соответствующих функциональных производных алициклов А1-А7.

Синтез функциональных производных алициклов

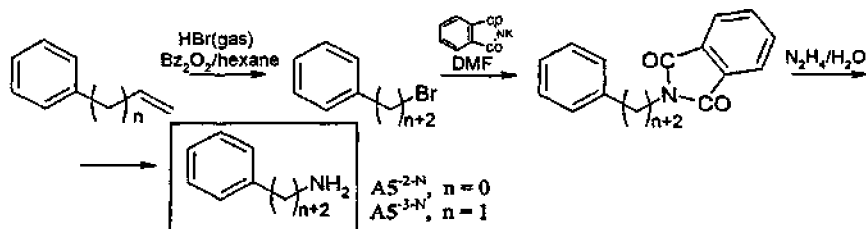
Синтез аминопроизводных моноциклических углеводов.

Синтез 2-циклопентилэтиламина ($A3^{2-N}$) и 2-циклогексилэтиламина ($A4^{2-N}$) осуществляли из бромциклопентана и циклогексил-*пара*-толуолсульфоната согласно схеме 5, с общим выходом 22% и 14%, соответственно.



Для синтеза 2-фенилэтиламина ($A5^{2-N}$) и 3-фенилпропиламина ($A5^{3-N}$) использовали по новому назначению (схема 6) классические сырьевые источники химии ВМС - стирол и аллилбензол с общим выходом 62% и 56% соответственно

Схема 6.

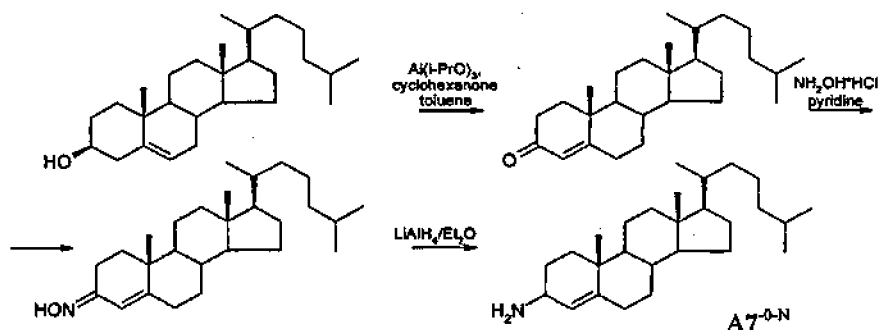


Синтез холестеренаминов.

4-Холестен-3 α , β -амин ($A7^{0-N}$) получен в три стадии (схема 7) из 5-холестен-3 β -ола (холестерина) с общим выходом 73%, в результате

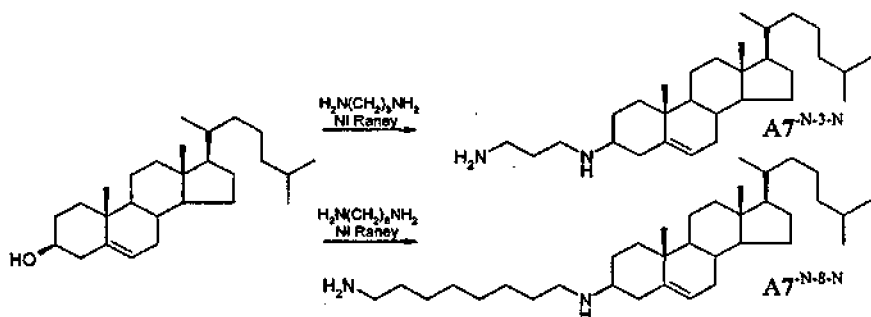
последовательного его окисления до кетона (по Оппенауэру), получения оксима и восстановления последнего до амина.

Схема 7.



N-(3-аминопропил)-5-холестен-3 α , β -амин (A7^{N-3-N}) и N-(8-аминооктил)-5-холестен-3 α , β -амин (A7^{N-8-N}) получали алкилированием 1,3-диаминопропана и 1,8-диаминооктана 5-холестен-3 β -олом в присутствии никеля Ренея с выходом 92% и 94%, соответственно (схема 8).

Схема 8.



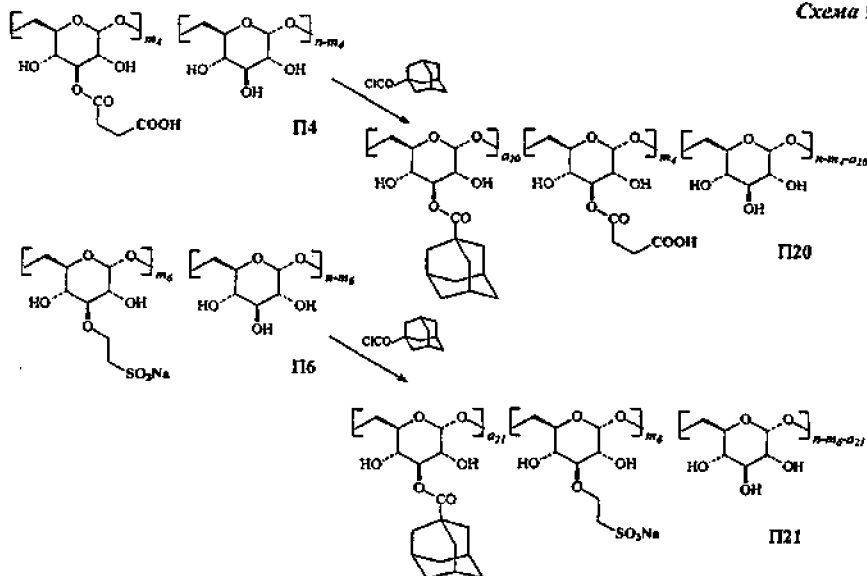
Полученные аминопроизводные охарактеризованы данными элементного анализа, масс-спектрометрии и ИК-спектроскопии.

Модификация декстрана и его поликислотных производных

Модификацию кислотных производных полисахарида П1 апробировали на примере адамантана - одного из наиболее эффективных фармакофоров противовирусной активности, из числа ранее изученных на примере других поликарбоксилатов. Здесь был использован адамантанкарбонил-

хлорид для этерификации оксигрупп П1 или продуктов его модификации П4 и П6 в присутствии триэтиламина в растворе диметилсульфоксида (схема 9):

Схема 9.



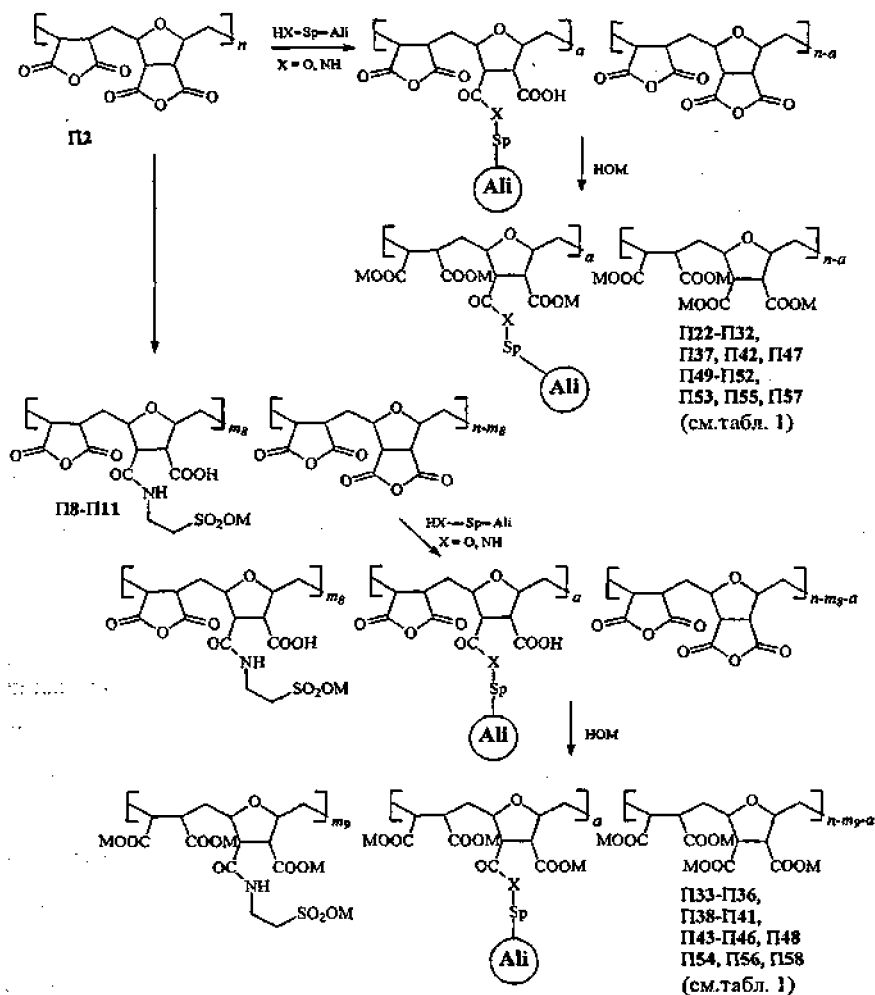
Структура полученных продуктов модификации подтверждена методом ИК-спектроскопии, а степени модификации, рассчитанные из данных элементного анализа, составляют: $(a_{20} + a_{21})/n \approx 0.07-0.08$

Модификация сополимера малеинового ангидрида

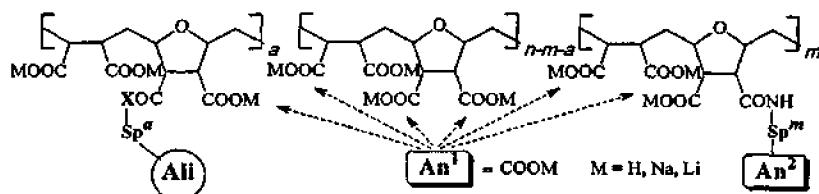
В отличие от декстрана и его производных для модификации сополимеров малеинового ангидрида наиболее удобны ангидридные реакционные центры полимера с применением amino- или окси-реагентов. Поэтому основными направлениями синтеза были избраны реакции amino- или окси-производных алициклов с ангидридными циклами исходного полнангидрида П2, либо его частично кислотно-модифицированных продуктов П8-П12 или П18 (но не гидролизованных аналогов – П13-П17 и П19). При этом в случае П8-П12, П18 предварительно введенные в макромолекулу кислотные функциональные группы нейтрализовали

противоионами (Na^+ , Li^+ или HN^+Et_3) - более сильными, чем используемые аминпроизводные алициклов. Лишь после завершения алициклической модификации (в неводных средах) осуществляли исчерпывающий гидролиз оставшихся ангидридных центров, получая по общей схеме 10 конечные водорастворимые продукты (таблица 1).

Схема 10.



**Структура* конечных продуктов
модификации - производных сополимера малеинового ангидрида П2**



Шифр	-Ali	X	-Sp ^a -	a/n**	m/n**	-Sp ^m -	-An ²
П3	-	-	-	0	0	-	-
П13-17	-	-	-	0	0.13-1.50	-(CH ₂) ₂ -	-SO ₃ M
П19	-	-	-	0	0.75		-SO ₃ M
П22		NH	-(CH ₂) ₂ -	0.25	0	-	-
П23		NH	-(CH ₂) ₂ -	0.25	0	-	-
П24		NH	-	0.25	0	-	-
П25-29		NH	-CH ₂ -	0.13-2.00	0	-	-
П30			-(CH ₂) ₂ -	0.25			
П31			-(CH ₂) ₃ -	0.25			
П32		NH	-CH ₂ -	0.30	0	-	-
П33-36					0.13-1.00	-(CH ₂) ₂ -	-SO ₃ M
П37					0	-	-
П38-41					0.13-1.00	-(CH ₂) ₂ -	-SO ₃ M
П42		NH	-CH ₂ -	0.30	0	-	-
П43-46					0.13-1.00	-(CH ₂) ₂ -	-SO ₃ M
П47		NH	-CH ₂ -	0.03	0	-	-
П48		NH	-CH ₂ -	0.03	0.25	-(CH ₂) ₂ -	-SO ₃ M
П49-52		O	-	0.02-0.10	0	-	-
П53		NH	-	0.02	0	-	-
П54			-	0.02	0.25	-(CH ₂) ₂ -	-SO ₃ M
П55			-(CH ₂) ₂ NH-	0.02	0	-	-
П56			-(CH ₂) ₂ NH-	0.02	0.25	-(CH ₂) ₂ -	-SO ₃ M
П57			-(CH ₂) ₆ NH-	0.02	0	-	-
П58			-(CH ₂) ₆ NH-	0.02	0.25	-(CH ₂) ₂ -	-SO ₃ M

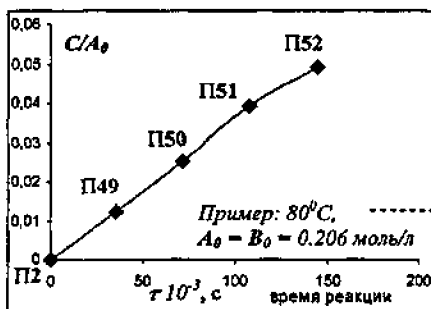
* Состав и структура продуктов синтеза исследованы стандартными методами аналитической химии и спектроскопии (ИК, ЯМР, УФ). В частности, в ИК-спектрах продуктов аминолиза полиангидридных форм по мере роста концентрации аминореагентов наблюдаются следующие превращения: 1) исчерпание ангидридных

циклов, 1850 см^{-1} , 1780 см^{-1} , 2) образование амидных связей, $1640\text{--}1660\text{ см}^{-1}$ (полоса амид I), и $1540\text{--}1550\text{ см}^{-1}$ (полоса амид II), 3) образование карбоксильных групп, $1700\text{--}1730\text{ см}^{-1}$ и их связывание в аммониевые соли $-\text{COOH}^+\text{NHEt}_3$, $1560\text{--}1570\text{ см}^{-1}$; $2450\text{--}2600\text{ см}^{-1}$, 4) рост характеристических полос алициклов — в зависимости от структуры конкретного модификатора. В контрольных реакциях взаимодействия аминокрепителей с предварительно гидролизованым сополимером ПЗ образование амидных связей не наблюдается. В целях корректной интерпретации спектральных данных была синтезирована также ряд низкомолекулярных модельных соединений взаимодействием тех же аминокрепителей с янтарным ангидридом и янтарной кислотой, имитирующих структурно-реакционные центры, соответственно ангидридной и гидролизованной формы сополимера. В основном, положение характерных спектральных полос модельных соединений отвечает интерпретации ИК- (ЯМР и УФ)-спектров полимерных продуктов. Однако более детальный анализ позволяет выявить закономерные микроструктурные различия. Так, кристаллический бензиламид янтарной кислоты характеризуется фиксацией транс-конфигурации амидной связи (узкий интенсивный пик 3300 см^{-1} , типичный для высококристаллических форм полиамидов [The Aldrich Library of Infrared Spectra]). А для синтезированных нами полимерных продуктов это не характерно, поскольку противоречит энтропийному фактору конформационной подвижности макромолекулы в целом.

** указание интервалов степеней модификации (a/n или m/n) соответствует синтезу серии ВМС с различными степенями модификации, при этом значения, превышающие единицу, соответствуют модификации в среднем более, чем одного ангидридного цикла из числа двух, приходящихся на каждое звено в исходном полиангидриде П2.

В частности, осуществлен синтез серии **raft**-тропных поликислотных ВМС П49-П58 с ковалентно связанным сложно эфирными связями холестерина или амидными связями — с его аминокрепительными: 4-холестен-3 α , β -амином, N-(3-аминопропил)-5-холестен-3 α , β -амином, N-(8-аминооктил)-5-холестен-3 α , β -амином. Получены также контрольные конъюгаты с дегидроабетиламином (структурно более простым биосинтетическим аналогом холестерина).

Если аминолиз полиангидридов П2, П8-П11 протекает количественно уже при умеренных температурах (до 40°C), то алкоголиз существенно менее активным, чем амины, спиртовым реагентом - холестерином потребовал более жестких условий. Поскольку верхний температурный порог реакции $\sim 80\text{--}90^\circ\text{C}$ ограничивался недопустимостью побочной термодеструкции (нежелательной для продуктов медицинского назначения), то для достижения строго заданных степеней модификации в области целевых значений малых степеней экранирования анионных групп алициклами были отработаны кинетически-управляемые условия синтеза (рис.1).



$$\frac{C}{A_0} = \left(\frac{A_0}{B_0} \right)^{0.5-Z} \cdot \frac{\exp(|A_0 - B_0| k \tau) - 1}{\exp(|A_0 - B_0| k \tau) + (A_0/B_0)^{2Z}}$$

$Z = -0.5$ при $A_0 > B_0$, либо $Z = +0.5$ при $A_0 < B_0$
 а если $A_0 = B_0$, то $\frac{C}{A_0} = \frac{k \tau A_0}{1 + k \tau A_0}$

Расчетные значения $k \cdot 10^6$ л.моль⁻¹с⁻¹

П49	П150	П151	П152
1.66	1.76	1.83	1.74
$k = (1.7 \pm 0.1) 10^6$ л.моль ⁻¹ с ⁻¹			

Рис.1. Кинетика алкоголиза П2 холестерином в гомогенных растворах циклогексанола в рамках математической модели (система уравнений), ранее примененной для описания этерификации полиангидридных аналогов. A_0 и B_0 – начальные концентрации, соответственно, ангидридных групп полимера и окси-групп моно-спирта, τ – время реакции, k – константа скорости реакции, C – текущая концентрация этерифицированных групп, C/A_0 – степень модификации ангидридных групп полимера спиртовым реагентом (а/н ~ $2C/A_0$). Значения C/A_0 определяли количественным анализом ЯМР-спектров.

Подготовка полимерных образцов для биологических испытаний

Биологические испытания предъявляют повышенные требования к чистоте и стерильности испытуемых соединений. Кроме того, желательно получение субстанции вещества в такой форме, которая обеспечивает быструю растворимость в водно-физиологических растворах. С учетом этого целевые и контрольные полимерные продукты (П1, ПЗ-П7, П13-П17, П19-П32, П37-П58) проходили специальные процедуры многоэтапной очистки от низкомолекулярных примесей и выделения опытных субстанций: 1) последовательная экстракция хлороформом, а затем диэтиловым эфиром в аппарате Сокслета (в инертной атмосфере, предохраняющей от окисления), 2) удаление следов растворителя в высоком вакууме при 40-50°C, 3) 10^3 - 10^4 -кратная отмывка водного раствора полимера от возможных водорастворимых примесей бидистиллированной водой с сепарацией полимера методом многократных циклов ультрафильтрации на селективных мембранах (фирмы Миллипор) с проницаемостью $MM < 1-3 \cdot 10^3$, 4) при необходимости - стерилизация фильтрацией очищенного раствора через мембраны с порогом проницаемости $MM \geq 100000$, 5) выделение чистого образца в форме высокопористого и быстрорастворимого продукта лиофильной сушки.

Исследование зависимостей биофункциональных свойств синтезированных ВМС от их структурных параметров (SAR-анализ)

В ряду биометрических методов экспериментального изучения свойств химических соединений, в том числе ВМС, в данной работе были использованы два направления: оценка цитотоксической безопасности и противовирусной эффективности. Исследования осуществлялись совместно со специалистами медико-биологического профиля НИФ Здоровья, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва) и ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово). Ряд экспериментальных измерений токсикологических параметров на компьютерно-автоматизированном стенде оценки безопасности полимеров в отношении мужских половых клеток млекопитающих освоены и выполнены соискателем лично.

Цитотоксичность (*in vitro*)

Количественная мера снижения цитотоксичности – рост значений $ТС_{50}$ - пороговых концентраций вещества, вызывающих 50% подавление жизнеспособности клеток. Экспериментальная оценка безопасности испытуемых ВМС в отношении клеток человека и животных проведена *in vitro* - на клеточных культурах: мужские половые клетки млекопитающих (быка), экспериментальные аналоги лимфоцитов человека (MT4) и выборочно – на других клетках (MDCK, Hella, Vero).

При планировании стратегии синтеза мы учитывали опыт ранее полученных данных о диапазоне цитотоксически безопасного насыщения аналогичных поликарбоксикислотных макромолекул алициклами (адамантана/норборнана) до степеней модификации не более 15-20% от общего числа анионогенных групп. В частности, на новых ВМС объектах - производных П2 (таблица 1) внутримолекулярное соотношение AlI/Aln , рассчитываемое по формуле: $AlI/Aln = a/n/(4-a/n)$, было выдержано в пределах 1-7%, за исключением контрольного ряда алициклически-родственных фенилсодержащих модификаций (П28 и П29 с соотношением

$Al_i/A_n = 0.33$ и 1.00 , соответственно). В целом SAR-анализ: $TC_{50} = f(\text{химическая структура})$ подтвердил тенденцию усиления токсикогенного потенциала макромолекул по мере увеличения пространственного объема алицикла и соотношения Al_i/A_n . Особо следует выделить обнаруженный нами критически существенный «скачок» потенциала токсичности интрамакромолекулярной интеграции производных холестерина, стероида, селективно нацеленного на «raft»-зоны клеточных мембран. На примере экспериментального ряда П149-П158 установлено, что в отличие от моноциклов и каркасных би-, или три-циклов, холестен-модифицированные ВМС проявляют достаточно высокий уровень безопасности ($TC_{50} \geq 800$ мкг/мл) лишь при условии содержания в среднем не более одного «raft»-тропного холестенового «якоря» на макромолекулу полиэлектролита ($a/n \leq 0.02$; $Al_i/A_n < 0.01$). Введение второго фрагмента холестена ($a/n \simeq 0.04$) резко (двукратно) снижает TC_{50} – т.е. повышает цитотоксичность.

В целом, SAR-минимизация цитотоксического риска ($Al_i/A_n \leq 0.1$) с понижающей коррекцией на холестен-содержащие ВМС ($Al_i/A_n < 0.01$), позволила получить новые полиэлектролитные конъюгаты алициклических производных, которые по цитотоксической безопасности ($TC_{50} \geq 800-2000$ мкг/мл) на порядок превосходили применяемые сегодня в клинике низкомолекулярные противовирусные прототипы (производное норборнана – дейтифорин и адамантана – ремантадин, $TC_{50} \sim 100-200$ мкг/мл).

Противовирусная активность и уровень ее селективности (*in vitro*)

Количественная мера роста противовирусной эффективности – снижение значений EC_{50} - пороговых концентраций вещества, достаточных для 50% подавления репродукции вируса, а *критерием роста биоселективности* служит повышение значений $IS = (TC_{50}/EC_{50})$ - индекса селективности. Ингибирующее действие синтезированных ВМС на жизненный цикл вирусов к настоящему времени апробировано на экспериментальных моделях инфицирования клеток вирусами

иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) - возбудители СПИДа, семейство *Retroviridae*, а также вирусами простого герпеса 1 типа и цитомегаловирусом, семейство *Herpesviridae*.

В рамках изучения действия синтезированных ВМС на репродукцию ВИЧ-1 было установлено, что, в отличие от каркасных структур адамантанового или норборнанового ряда, частично исследованных в составе поликарбоксилатов в предшествовавших работах, более простые и доступные аналоги моноциклической структуры (циклопентил, циклогексил) и родственный фенильный цикл хотя и предпочтительнее с точки зрения минимизации токсичности модифицируемых полианионов, но, как внутри-макромолекулярные синергисты анти-ВИЧ-1 активности, малоэффективны ($IS < 10$). Напротив, *raft*-тропные полициклы холестерина типа продемонстрировали способность, к существенному усилению анти-ВИЧ-1 эффективности производных П2/П3 даже при минимальном уровне модификации $Al/An \sim 0.01$. В настоящее время новые холестер- и родственные абиетил-содержащие полимерные кислоты П47-58 находятся на стадии расширенных исследований [НИФ Здоровья, НИИ вирусологии].

В целях дальнейшего развития системного SAR-анализа противовирусных эффектов ВМС в настоящей работе на основе синтезированных рядов П3-П19, П32-П46 впервые получены данные о многофакторной модуляции анти-ВИЧ-1 активности не только в зависимости от природы модифицирующего алицикла, но и от одновременно варьируемого электростатического фактора биоселективности: по мере последовательной конверсии умеренно кислотных $-COOH/Na$ -групп в сильно ионизированные производные $-CO-NH-Sp-SO_3^-Na^+$. В частности, на рис.2 видно, что: 1) без алициклических модификаторов индекс селективности анти-ВИЧ активности П15-П19, по мере наращивания содержания сульфоксид-анионных групп лишь незначительно колеблется в интервале значений $IS = 20-30$; 2) адамантильный модификатор структуры полимеров П43-П46 по критерию IS проявляет антагонистическую

тенденцию макромолекулярной кооперации с сульфокислотными группами (IS падает со 150 до 40); напротив, 3) *норборнильный модификатор* (в экзo-изомерной конфигурации положения «спейсерного мостика» $Sr = CH_2$), будучи исходно малоактивным (IS ~ 20), проявляет слабый синергизм внутри-макромолекулярной кооперации с сульфокси-анионом (выравниваясь по значению IS с адамантильным аналогом при 25% конверсии); и, наконец, 4) казалось бы, незначительное структурное изменение – *введение в бицикл норборнила стерически доступной двойной связи* – приводит к мощному росту биофункционального синергического эффекта (IS возрастает на порядок). Очевидно, стерически доступная донорная система π -электронов двойной связи играет существенную роль в усилении кооперативного блокирующего воздействия синтетической макромолекулы на вирус-специфические мишени природных полимерных объектов.

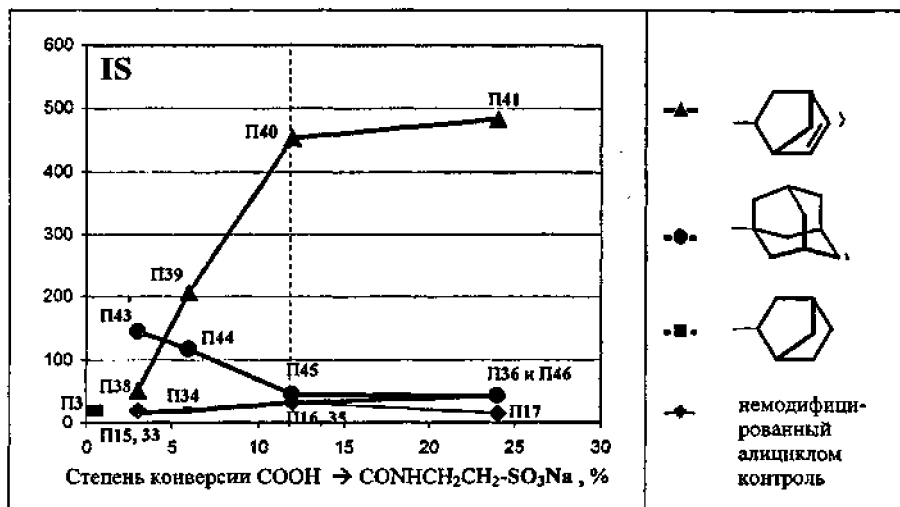


Рис. 2. Модуляция индекса селективности (IS) ВПЧ-1 –ингибирующего действия полимерных макромолекул в зависимости от природы алициклического модификатора при фиксированной степени модификации (25%) в сочетании с фактором усиления анионогенной активности полиэлектролита (по мере конверсии карбоксильных групп в сульфокислотные производные). Экспериментальная модель: ВПЧ-1, штамм EVK, на МТ4 клетках; вирус и полимерные препараты в варьируемых концентрациях вводятся одновременно.

Интересно отметить, что зона наиболее интенсивной модуляции IS по фактору насыщения алициклически-модифицированных ВМС сильно анионными группами лежит в пределах конверсии $\text{COOH} \rightarrow \text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ до ~12%, тогда как дальнейший рост конверсии мало влияет на противовирусную активность. Указанный порог биофункционально значимой конверсии соответствует соотношению $\text{AlI} : \text{~SO}_3^- = \sim 1:2$ (усреднено: 1 алицикл на 4 звена и 1 сульфоксианион на 2 звена полимера). Таким образом, относительно умеренные уровни изученной конверсии открывают широкие возможности существенной модуляции (целевого регулирования) противовирусной селективности анионных ВМС*.

Сравнительный анализ полисахаридной (П1) и синтетической (П2/П3) полимерной основы в рамках исследуемых структурно-функциональных модификаций и имеющихся данных оценки их анти-ВИЧ-1 активности, приводит к выводу о предпочтительности производных именно синтетической основы. Структура полимерного остова ВМС *таблицы 1* с двумя метиленовыми и двумя карбокси-метиленовыми «шарнирами» на каждое звено предопределяет более высокую конформационную подвижность, а значит и более высокий уровень «адаптируемости» макромолекул к топологии нано-размерных вирус-специфических мишеней.

Помимо вышеописанных SAR-исследований анти-ВИЧ активности для выборочной группы синтезированных ВМС-продуктов из серии П33-П46 недавно получены новые данные [НИФ Здоровья – НИИ вирусологии] о возможностях не менее эффективной целенаправленной модуляции противовирусной биоселективности не только против *ретро*-, но и против *герпес*-вирусов, таких как вирус простого герпеса I типа и более опасный цитомегаловирус. В пределах синтезированных нами групп ВМС* уже сегодня зарегистрированы SAR-оптимальные модификации с противогерпетической активностью до значений IS ~ 1500.

* Во всех случаях контрольные тесты низкомолекулярных «модельных» аддуктов тех же алициклов с янтарной кислотой заметной противовирусной активности не выявили.

ВЫВОДЫ

1. Впервые осуществлен синтез более 50 новых продуктов полимераналогичной модификации декстрана и сополимеров малеинового ангидрида, сочетающих ценные свойства анионных полиэлектролитов (поликислот) с полимер-кооперированными функциями различных алициклических структур, связанных с полимером через «спейсерные» мостики регулируемой длины (и конфигурационной подвижности).
2. Разработаны схемы и условия синтеза необходимых алициклических соединений с карбо- и гетероцепными «спейсерными» мостиками и концевыми amino-группами для ковалентной прививки к полимерной цепи поликислот (или их ангидридных предшественников);
3. Изучены пути конверсии «фурановой» модификации сополимера малеинового ангидрида с дивиниловым эфиром и природного полисахарида декстрана по двум направлениям: 1) модуляция анионогенных функций (в ряду карбокси- и сульфокислотных производных) и 2) введение мембранотропных фармакофоров алициклического ряда (моно-, би-, три- и поли-циклов, включая «raft»-тропные холестереновые структуры);
4. Осуществлен синтез ряда «модельных» соединений - сукцинатных аналогов модифицированных звеньев исследуемых полимеров, изучены аналогии и различия низкомолекулярных и макромолекулярных форм по спектральным и биофункциональным характеристикам;
5. В ряду новых ВМС-продуктов впервые исследованы закономерности структурно-зависимой (анион- и алицикл-специфической) модуляции противовирусной селективности макромолекул в отношении вирусов иммунодефицита человека, герпеса и цитомегаловируса (до значений индекса селективности $IS = 20-1500$). Получены новые фундаментальные знания, имеющие практическую ценность для разработки высокоэффективных противовирусных препаратов нового поколения, остро необходимых в современной медицине, ветеринарии и агроиндустрии.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Стоцкая Л.Л., Сербин А.В., Егоров Ю.А., Букринская А.Г., Иванов П.Е. Механизм противовирусного действия полимерных производных адамантана против вируса иммунодефицита человека различных штаммов. // IX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» 8-12 апреля 2002 г. Москва. Сб. тез. с.703.
2. Егоров Ю.А., Бондаренко Г.Н., Гребиник Т.С., Стоцкая Л.Л., Сербин А.В. Регулирование состава продуктов аминолитического сополимеризации малеинового ангидрида с дивиниловым эфиром. // Научная конференция ИХХС РАН, Москва 12-14 февраля 2003, Сб. тезисов, с. 73.
3. Егоров Ю.А., Гребиник Т.С., Сербин А.В., Еськов А.П., Каюмов Р.И. Синтез аминопроизводных моноциклических углеводородов – модуляторов биологической активности природных и синтетических полианионов. // Научная конференция ИХХС РАН, Москва 12-14 февраля 2003, Сб. тезисов, с. 74.
4. Сербин А.В., Климович Ю.Н., Стоцкая Л.Л., Егоров Ю.А., Козелецкая К.Н., Киселев О.И., Букринская А.Г., Тимофеев И.В., Перминова Н.Г. Алициклические ингибиторы жизненного цикла вирусов. 1. Адамантан содержащие полианионные системы. // Международная научно-техническая конференция «Перспективы развития химии и практического применения алициклических соединений» (Advances of Chemistry and Applications of Alicyclic Compounds), Самара, 1-4 июня 2004, Сб. тезисов, с. 227.
5. Киселева Я.Ю., Перминова Н.Г., Плясунова О.А., Тимофеев Д.И., Сербин А.В., Касьян Л.И., Егоров Ю.А., Гребиник Т.С., Тимофеев И.В. Противовирусная активность мембранотропных соединений, модифицированных адамантановыми и норборненовыми фармакофорами в отношении различных штаммов ВИЧ-1. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2005, № 2, с.33-36.
6. Егоров Ю.А., Бондаренко Г.Н., Перминова Н.Г., Тимофеев И. В., Касьян Л.И., Тарабара И.Н., Сербин А.В. Алициклические модуляторы структуры и биоселективности водорастворимых полимерных систем противовирусной защиты. // XII Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем», Яльчик, Марий-Эл, 27 июня-2 июля 2005, Сб. тезисов, с.72.
7. Egorov Yu.A., Serbin A.V., Stotskaya L.L., Perminova N.G., Alikhanova O.L., Timofeyev I.V., Tarabara I.N., Kas'yan L.I. Inter- and intra-polymeric design of multi-level active antiviral systems. // European Polymer Congress-2005, Moscow, June 2005, Book of abstracts, p. 163.
8. Сербин А.В., Егоров Ю.А., Алиханова О.Л. Нано-био-селективные макро- и супрамолекулярные системы многоуровневой блокады проникновения вирусов в клетки. // Международная конференция «Биологические мишени для действия лекарственных препаратов нового поколения. Перспективы интеграции российских ученых в международную кооперацию», Химки, Московская область, 28-30 марта 2006, Сб. тезисов, с. 24.
9. Egorov Yu.A., Serbin A.V., Kas'yan L.I., Tarabara I.N., Alikhanova O.L. Intramolecular alicyclic synergists for polyanionic antivirals. // Antiviral Research 2006. v.70, N1, p.42.
10. Serbin A.V., Egorov Yu.A., Tykvinski S., Alikhanova O.L. Nano-Responsible Multifunctional Antivirals. // Antiviral Research 2006. v. 70, N1, p:86.

Принято к исполнению 08/09/2006
Исполнено 11/09/2006

Заказ № 607
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56

www.autoreferat.ru

