

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Polimerowe inhibitory i adsorbenty wirusów wywołujących choroby układu oddechowego

Justyna Ciejka

Promotor: dr hab. Krzysztof Szczubińska, prof. UJ

Promotor pomocniczy: dr hab. Krzysztof Pyró

Praca wykonana

w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów

Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Wydziału Chemii UJ

oraz

w Zespole Wirusologii

Zakładu Mikrobiologii, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Na rynku dostępnych jest stosunkowo niewiele leków, które mogą być zastosowane do profilaktyki i leczenia chorób układu oddechowego wywołanych takimi wirusami jak wirusy grypy, ludzki metapneumowirus, rinowirusy czy koronawirusy. Ich skuteczność jest często niezadowalająca, a ponadto pojawia się dużo obaw związanych z ich wysoką toksycznością, lekoopornością wirusów oraz wysokimi kosztami produkcji leków małowcząsteczkowych. Dlatego też w dalszym ciągu poszukuje się skuteczniejszych i tańszych środków terapeutycznych w walce z chorobami wywołanymi przez te wirusy. Celem tych poszukiwań jest opracowanie substancji mających zastosowanie w leczeniu chorób układu oddechowego, posiadających możliwie szerokie spektrum działania antywirusowego i niepowodujących powstawania szczepów wirusowych opornych na działanie leku. Efekt ten można osiągnąć przez zwielokrotnienie oddziaływań pomiędzy cząstką wirusa a inhibitorem, który to efekt umożliwia zastosowanie polimerów.

W pracy wyróżniamy dwa główne nurty badawcze.

Celem pierwszego z nich było otrzymanie i scharakteryzowanie pod względem fizykochemicznym rozpuszczalnych w wodzie polimerów (polielektrolitów), które w założeniu mają hamować replikację szeregu wirusów wywołujących infekcje układu oddechowego człowieka. Badanymi polimerami były:

- polimery syntetyczne: N-sulfonowane polialliloaminy (NSPAH), chlorek O-2-hydroksypropylo)-3-trimetyloamoniowy poli(alkoholu winylowego) (HTPVA), poli(chlorowodorek alliloaminy) (PAH);
- polimery otrzymane na bazie naturalnych polisacharydów: chlorek N-(2-hydroksypropylo)-3-trimetyloamoniowy chitozanu (HTCC) i jego hydrofobowa pochodna chlorek N-dodecylo-N-(2-hydroksypropylo)-3-trimetyloamoniowy chitozanu (HM-HTCC),
- polimery naturalne: iota- oraz kappa-karagenany.

Aktywność antywirusową polimerów zbadano w warunkach *in vitro* (linie komórkowe wrażliwe na infekcję danym patogenem) i/lub *ex vivo* (całkowicie zróżnicowane ludzkie komórki nabłonka dróg oddechowych, ang. *Human Airway Epithelial cell line* HAE) względem takich wirusów jak wirus grypy typu A szczep H3N2 (IAV), ludzki metapneumowirus (hMPV), ludzki rinowirus (HRV) oraz ludzkie koronawirusy NL63 i OC43 (HCoV-NL63, HCoV-OC43). Badania przeprowadzono również na zwierzęcym koronawirusie – mysim wirusie zapalenia wątroby (MHV).

Wykazano, że N-sulfonowane polialliloaminy (NSPAH) podobnie jak iota- i kappa-karagenany są bardzo silnymi inhibitorami replikacji wirusa grypy typu A. Masa cząsteczkowa oraz stopień podstawienia grupami sulfonowymi znacząco wpływa na efektywność antywirusowego działania polimerów. Spośród badanych NSPAH najsilniejszą aktywność przeciwigrypową wykazywał polimer o największej masie cząsteczkowej i wysokim stopniu podstawienia grupami sulfonowymi tj. polimer NSPAH o masie cząsteczkowej ~65 kDa oraz stopniu podstawienia 89% (NSPAH-65-89). Na podstawie oceny wizualnej obserwowano całkowite zahamowanie efektu cytopatycznego (CPE) w komórkach HAE zainfekowanych wirusem grypy w obecności NSPAH-65-89 o stężeniu zaledwie 50 µg/ml. Wykazano, że działanie NSPAH-65-89 jest porównywalne z działaniem znanego polimerowego inhibitora wirusa grypy, iota-karagenanu, przy czym polimer wykazuje zdecydowanie lepszy profil fizykochemiczny niż karagenany, które przy wyższych stężeniach są nierozpuszczalne i tworzą żele. Co ważne, NSPAH nie są toksyczne nawet przy bardzo wysokich dawkach (> 5000 µg/ml). Wyniki przeprowadzonych badań nad mechanizmem antygrypowego działania polimerów NSPAH oraz karagenanów wskazują, że ich działanie przejawia się głównie na późnym etapie cyklu replikacji wirusa grypy – składania i/lub uwalniania nowych cząstek wirusowych z zainfekowanej komórki, a nie jak przypuszczano wcześniej poprzez hamowanie wejścia wirusa do komórek. Dodatek polimerów na wczesnym etapie zakażenia powodował tylko nieznaczne zahamowanie infekcji. Wykazano również, że

iota- oraz kappa-karagenany, w przeciwieństwie do NSPAH, częściowo również hamują replikację wirusa wewnątrz zainfekowanych komórek. Ponadto wykazano, że polimery NSPAH oraz karagenany mają szerokie spektrum działania przeciw wirusom układu oddechowego, bowiem hamują replikację nie tylko wirusa grypy typu A, ale również ludzkiego metapneumowirusa oraz ludzkiego rinowirusa, które wymieniane są jako jedne z ważniejszych patogenów wywołujących przeziębienia u ludzi. Badane polianiony, NSPAH oraz karagenany, nie hamowały jednak replikacji koronawirusów.

Właściwości antykoronawirusowe wykazują polikationy takie jak HTCC, HM-HTCC, HTPVA oraz PAH, przy czym najsilniej działa polimer HTCC, który hamuje efekt cytopatyczny wywołany infekcją HCoV-NL63 już przy stężeniu 10 µg/ml. Wykazano wysoką specyficzność działania antykoronawirusowego HTCC, gdyż hamuje replikację zarówno HCoV-NL63 (alfa-koronawirus), jak również koronawirusa należącego do drugiej linii filogenetycznej rodziny *Coronaviridae* – MHV (beta-koronawirus). HTCC nie hamuje natomiast replikacji wirusów należących do innych rodzin tj. IAV czy hMPV. Ponadto wykazano, że HTCC jest nietoksyczny w efektywnym zakresie stężeń.

Drugim kierunkiem badań było otrzymanie adsorbentów cząstek wirusowych. Ze względu na objęcie tej części doktoratu zgłoszeniami patentowymi informacji na temat wyników badań nie mogą być na tym etapie publikowane.

