

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ № 1 2015
СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК

УДК 547.915.5:543.25

Ю. В. КОРНОУШЕНКО¹, В. А. НИКОЛАЕВИЧ¹, М. А. КИСЕЛЬ¹, А. М. АНДРИАНОВ¹,
С. В. АДАМЧИК¹, И. И. КУЧЕРОВ², В. Ф. ЕРЕМИН²

ПОЛУЧЕНИЕ И АНТИ-ВИЧ АКТИВНОСТЬ β -ГАЛАКТОЗИЛСФИНГОЗИНА

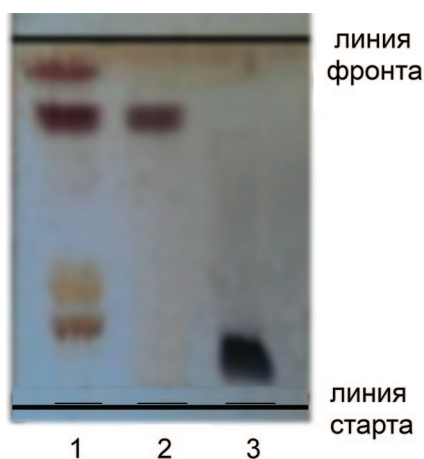
¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси

²Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии

(Поступила в редакцию 04.04.2014)

Специфические взаимодействия ВИЧ-1 с первичным рецептором CD4 и с хемокиновыми ко-рецепторами CCR5 и/или CXCR4 осуществляются через петли V1-V5 белка gp120, обнаруживающие высокую изменчивость аминокислотного состава у разных подтипов вируса [1–3]. Среди указанных петель особое внимание заслуживает третий вариабельный домен (петля V3) белка gp120: именно этот участок ВИЧ-1 образует основную мишень для нейтрализующих антител, а также отвечает за выбор корцептора, определяющего предпочтительность вируса в отношении Т-клеток лимфоидного ряда или первичных макрофагов [1–3]. Данные многочисленных исследований, свидетельствующие об исключительной роли петли V3 в процессе клеточного тропизма, позволяют рассматривать ее в качестве перспективной мишени для создания новых противовирусных препаратов. Поэтому одной из актуальных задач, связанных с разработкой эффективных анти-ВИЧ агентов, является поиск химических соединений, способных блокировать этот функционально важный участок белка gp120 оболочки вируса (см., например, обзор [3]). К числу таких соединений относятся аналоги гликолипида β -галактозилцерамида (β -GalCer), представляющего в некоторых чувствительных клетках первичный рецептор для ВИЧ-1 [4, 5], альтернативный молекуле CD4, используемой вирусом для проникновения в макрофаги и Т-лимфоциты. Исследования, выполненные в работах [6–8], показали, что в связывании ВИЧ-1 с β -GalCer и его модифицированными формами принимает участие петля V3, а именно ее центральная область Gly-Pro-Gly-Arg/Gln-Ala-Phe, формирующая инвариантный элемент структуры белка gp120 [3, 9, 10]. Данные компьютерного моделирования структурных комплексов β -GalCer с пептидами петли V3 ВИЧ-1 подтипов А и В свидетельствуют о том [11], что подавляющее число результативных контактов гликолипида с V3-доменом белка gp120 приходится на углеводную часть молекулы, а остаток ее жирной кислоты обладает высокой конформационной подвижностью и не участвует в межмолекулярных взаимодействиях. Результаты исследования [11] создали структурные предпосылки для получения «водорастворимых» форм β -GalCer, способных к эффективной блокаде петли V3 путем модификаций остатка жирной кислоты гликолипида. Потенциальная нейтрализующая активность одного из таких аналогов – β -галактозилсфингозина (психозина) – была оценена в цитируемой статье методами молекулярного моделирования, предсказавшими высокую вероятность проявления им противовирусной активности. С целью подтверждения такого предсказания в данной работе был получен β -галактозилсфингозин из цереброзидов мозга свиньи и проведена оценка его анти-ВИЧ активности.

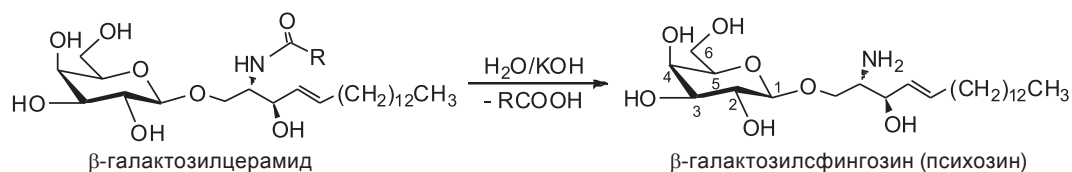
В качестве исходного сырья для получения цереброзидов – предшественника β -галактозилсфингозина – использован липидный экстракт гомогената мозга свиньи, предварительно освобожденный от холестерина обработкой ацетоном. Основное содержание такого экстракта составляли цереброзиды и фосфолипиды. Фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и анионные фосфолипиды (фосфатидилсерин и фосфатидилинозит) удаляются из экстракта при пропускании через хромато-



Тонкослойная хроматография цереброзидов в системе хлороформ–метанол–вода (65:25:4). 1 – смесь нейтральных липидов мозга до хроматографии, 2 – цереброзиды, 3 – β -галактозилсфингозин

графическую колонку, заполненную окисью алюминия, при элюировании смесью растворителей хлороформ–метанол в отсутствие воды. При последующей хроматографии элюата на колонке с силикагелем, который удерживает фосфатидилхолин и сфингомиелин, были выделены практически чистые цереброзиды (рисунок). Эти соединения в соответствии с данными работ [4, 5] могут проявлять анти-ВИЧ-активность, но не представляются перспективными для разработки противовирусных препаратов в связи с нерастворимостью в воде и неспособностью образовывать стабильные наноструктуры при их солюбилизации [12]. В то же время простейший аналог цереброзидов – β -галактозилсфингозин – хорошо солюбилизируется при контакте с водой, образуя устойчивые мицеллярные структуры размером 14–100 нм при pH среды 4–7 [13]. β -Галактозилсфингозин образуется при щелочном гидролизе цереброзидов с сохранением природной конфигурации (см. схему). Метод его получения, предложенный в монографии [14], был существенно нами модифицирован, что привело к получению β -галактозилсфингозина высокой степени чистоты.

При анализе целевого продукта с помощью ТСХ на пластинке наблюдается единственное пятно, окрашиваемое в малиновый цвет при проявлении нингидрином, что свидетельствует о наличии в молекуле свободной аминогруппы. В ИК-спектре исчезают полосы поглощения амидной группы при 1640 (амид I) и 1545 см^{-1} (амид II) и появляется полоса при 1590 см^{-1} , характерная для аминогруппы. Строение β -галактозилсфингозина также подтверждено данными хромато-масс-спектрометрического анализа и ЯМР-спектроскопии



где RCO – преимущественно остатки насыщенных, ненасыщенных и гидроксигирных кислот с 24 атомами углерода.

В результате проведенных испытаний β -галактозилсфингозина установлено, что полученный «водорастворимый» аналог β -GalCer обладает анти-ВИЧ активными свойствами. Индекс защиты клеток в диапазоне концентраций 1,0–0,2 мкг/мл составил 51–53 % (для азидотимидина этот показатель колебался в диапазоне 56–100 %). Максимально переносимая концентрация β -галактозилсфингозина для клеток МТ-4 оказалась равной 8,0 мкг/мл. Химиотерапевтический индекс (соотношение максимально переносимой концентрации и минимально активной концентрации препарата) составил 40, что свидетельствует о высокой степени антивирусной активности.

Таким образом, исследования *in vitro* показали ВИЧ-ингибирующие свойства деацелированного аналога β -GalCer. В связи с этим представляется перспективным продолжить изучение этого соединения или его производных с помощью других методик для подтверждения данных первичных испытаний. В результате проведенных исследований показано, что полученный деацелированный аналог β -GalCer обладает ВИЧ-ингибирующими свойствами и формирует перспективную базовую структуру для создания новых противовирусных препаратов с широким спектром нейтрализующей активности.

Методика эксперимента. ^1H и ^{13}C ЯМР-спектры регистрировали на приборе Avance 500 (Bruker, Германия). ИК-спектры получали на FTIR-спектрометре Bomem-Michelson 100 в области 700–3600 см^{-1} . Масс-спектры регистрировали на комплексе ВЭЖХ Accela с масс-детектором LCQ-Fleet (трехмерная ионная ловушка) в режиме химической ионизации при атмосферном

давлении (APCI) (детектирование положительных ионов). Элементный анализ проводили на элементном анализаторе «EUROEA3000». Анализ дисперсии оптического вращения осуществляли на спектрополяриметре Jasco J-20 (Япония).

Выделение цереброзидов проводили по модифицированной нами методике, описанной в монографии [14]. К гомогенату мозга свиньи (200 г) добавляли 200 мл ацетона и перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин. Затем смесь отфильтровывали и промывали остаток на фильтре 200 мл ацетона. Далее осадок растворяли в 200 мл смеси хлороформ–метанол (2 : 1, по объему), не растворившийся компонент отделяли фильтрованием. Фильтраты объединяли и упаривали, остаток растворяли в 200 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 2, по объему), в раствор добавляли 50 г силикагеля и перемешивали в течение 20 мин. Надосадочную жидкость декантировали, к остатку добавляли 100 мл смеси хлороформ–метанол 1 : 2 и перемешивали в течение 20 мин. Надосадочный слой отделяли декантацией, объединяли с ранее полученным после декантации раствором и упаривали. Удаление остатков фосфатидилхолина и сфингомиелина из обогащенной цереброзидами липидной смеси осуществляли методом флеш-хроматографии на силикагеле при элюировании системой растворителей хлороформ–метанол 2 : 3. Выход выделенных цереброзидов составил 440 мг.

Получение β -галактозилсфингозина проводили по методике [14] с некоторыми модификациями. К раствору 1,4 г гидроксида калия в 2 мл воды добавляли раствор 0,440 мг цереброзидов в 18 мл *n*-бутанола и смесь кипятили в течение 4 ч. Далее реакционную смесь нейтрализовали хлорной кислотой. Перхлорат калия удаляли фильтрованием, который на фильтре промывали 20 мл метанола, при этом большая часть жирных кислот осаждалась при добавлении метанола. К фильтрату добавляли 1,3 мл 5 М раствора хлорной кислоты (доводя pH до 3–4), а затем 67,5 мл воды и 135 мл гексана. Смесь интенсивно перемешивали, водно-метанольную фазу отделяли, доводили pH до значения 10 добавлением 2 н. раствора NaOH. После добавления к водно-метанольному раствору одного объема хлороформа смесь интенсивно встряхивали в делительной воронке. Нижний слой отделяли, дважды промывали 67,5 мл смесью метанол–вода (1 : 1) и упаривали досуха. Далее очистку β -галактозилсфингозина проводили с помощью флеш-хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента смесь хлороформ–метанол с повышающимся ступенчатым градиентом метанола. Чистота полученного β -галактозилсфингозина подтверждается методом ТСХ при обработке пластинки нингидрином (реактив на аминогруппу) и раствором серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием. В обоих случаях на пластинке проявляется только одно пятно с хроматографической подвижностью ($R_f = 0,2$) при элюировании смесью растворителей хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4, по объему). Выход β -галактозилсфингозина составил 128 мг ($\eta = 54\%$).

Данные ИК-спектра для цереброзидов: (ν , см^{-1} , KBr): 3400, 2920, 2850, 1640, 1545, 1470, 1380, 1235, 1085, 970, 720. Данные спектров для β -галактозилсфингозина: $[\alpha]_D = -8.5$ (с1, CH_3OH), лит. данные $-8,0$ [15]. ИК-спектр (ν , см^{-1} , KBr): 3365, 2920, 2855, 1590, 1470, 1145, 1075, 970, 790. Спектр ^1H ЯМР (CD_3OD): δ , м.д.: 0.86 (т, 3H, CH_3), 1.25–1.29 (м, 20H, $(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$), 1.39 (м, 2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 2.02–2.06 (м, 2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 2.82–2.88 (м, 1H, CHNH_2), 3.41–3.49 (м, 3H, C_2H , C_4H , C_5H), 3.64–3.81 (м, 5H, C_6H_2 , CH_2O , C_3H), 3.93 (т, 1H, CHOH), 4.18 (д, 1H, C_1H), 5.42–5.47 (м, 1H, $\text{CHCH}=\text{CH}$), 5.68–5.74 (м, 1H, $\text{CHCH}=\text{CH}$), ^{13}C ЯМР (CD_3OD): δ , м.д.: 13.18; 22.45; 29.10; 29.19; 29.36 ($\times 2$); 29.51 ($\times 5$); 31.78; 32.16; 54.98; 61.25; 69.01; 70.45; 71.23; 73.41; 73.56; 75.47; 103.75; 129.62; 134.23. Масс-спектр (m/z): 462.92 ($[M]^+ + 1$).

Биологические испытания проводили на перевиваемой Т-лимфобластоидной линии клеток человека MT-4 (Т-клетки человека, трансформированные путем сокультивирования с инфицированными HTLV-1 лимфоцитами). Посевная доза – $4\text{--}5 \times 10^5$ клеток/мл на питательной среде RPMI-1640 («Sigma», ФРГ). Состав полной ростовой среды: RPMI-1640 – 90 %, эмбриональная сыворотка коровья – 10 %, NEPES – 10 мМ, гентамицин сульфат – 50 мкг/мл, тилозина тартрат – 10 мкг/мл, L-глутамин – 2,0 мМ. Пассажи проводили через каждые 72 ч с определением жизнеспособности клеток с помощью прижизненной их окраски витальным индикатором (0,2%-ный водный раствор трипанового синего). В экспериментах использовали высокорепликативный штамм ВИЧ-1_{zmb}, выделенный у проживавшего на территории Республики Беларусь

вирусоносителя. Титр вируса составлял 6,0 lg ТЦД₅₀. «Маточный» раствор образца препарата в концентрации 10 мг/мл готовили на дистиллированной воде и хранили при 4 °С до 7 сут включительно. При проведении испытаний исходный раствор титровали с 5-кратным шагом на полной ростовой среде RPMI-1640. Диапазон испытанных концентраций препарата составил 1,0 мг/мл–0,0128 мкг/мл. Определение анти-ВИЧ активности образцов проводили с помощью формазанового теста (МТТ-вариант) в собственной модификации. Основа метода – контроль за происходящими в клетках метаболическими изменениями при добавлении в питательную среду реактива МТТ ((4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола бромид). В результате взаимодействия МТТ с митохондриальными дегидрогеназами живых клеток образуется нерастворимый МТТ-формазановый продукт, после растворения которого в диметилсульфоксиде можно колориметрически измерить интенсивность развившегося окрашивания. Его уровни позволяют оценивать антивирусную активность проверяемых соединений по показателю индекса защиты клеток. Реакцию проводили на 96-луночных культуральных панелях («Sarstedt», США) в конечном объеме реакционной смеси 200 мкл/луночку, которые инкубировали при 37 °С в атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂. Учет результатов осуществляли на 4-е сутки на спектрофотометре «Plate Reader DAS A3» (Италия) из разностного спектра при длинах волн 550/630 нм.

Испытания выполняли по терапевтической схеме, предусматривающей внесение инфекционного агента в клеточные культуры непосредственно после исследуемого препарата. В качестве позитивного контроля на анти-ВИЧ активность в каждой серии экспериментов использовали коммерческий препарат азидотимидина.

Литература

1. Hartley O., Klasse P.J., Sattentau Q.J. and Moore J.P. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2005. Vol. 21. P. 171–189.
2. Sirois S., Sing T. and Chou K. C. // Curr. Protein Pept. Sci. 2005. Vol. 6. P. 413–422.
3. Andrianov A. M. // Expert Opin. Drug. Discov. 2011. Vol. 6. P. 419–435.
4. Bhat S., Spitalnik S.L., Gonzalez-Scarano F. and Silberberg D.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 7131–7134.
5. Fantini J., Cook D. G., Nathanson N., Spitalnik S.L. and Gonzalez-Scarano F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 2700–2704.
6. Fantini J., Hammache D., Delézay O., Yahi N., André-Barrès C., Rico-Lattes I. and Lattes A. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 7245–7252.
7. Yahi N., Sabatier J.M., Nickel P., Mabrouk K., Gonzalez-Scarano F. and Fantini J. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 24349–24353.
8. Cook D. G., Fantini J., Spitalnik S.L. and Gonzalez-Scarano F. // Virology. 1994. Vol. 201. P. 206–214.
9. Andrianov A. M., Anishchenko I. V. and Tuzikov A. V. // J. Chem. Inf. Model. 2011. Vol. 51. P. 2760–2767.
10. Andrianov A. M., Kornoushenko Yu. V., Anishchenko I. V., Eremin V. F. and Tuzikov A. V. // J. Biomol. Struct. Dynam. 2013. Vol. 31, P. 665–683.
11. Анищенко И. В., Тузиков А. В., Андрианов А. М. // Математическая биология и биоинформатика. 2011. Т. 6, №2. С. 161–172.
12. Ruocco M.J., Atkinson D., Small D.M., Skarjune R.P., Oldfield E., Shipley G. G. // Biochemistry. 1981. Vol. 20, N21. P. 5957–5966.
13. Orfi L., Lasive C. K., LeVine S. M. // Lipids. 1997. Vol. 32, N 10. P. 1035–1040.
14. Препаративная биохимия липидов / Под ред. Л. Д. Бергельсона, Э. В. Дятловицкой. М.: Наука, 1981.

YU. V. KORNOUSHENKO, V. A. NIKOLAYEVICH, M. A. KISEL, A. M. ANDRIANOV, S. V. ADAMCHIK,
I. I. KUCHEROV, V. F. EREMIN

PREPARATION AND ANTI-HIV ACTIVITY OF β -GALACTOSYLSPHINGOSINE

Summary

β -Galactosylsphingosine a potential anti-HIV agent, has been prepared from pig brain cerebroside and tested for antiviral activity. HIV-inhibitory properties of this compound, predicted previously by molecular modeling, have been confirmed. Consequently, the glycolipid obtained is considered as a promising basic structure for designing its more efficient derivatives.