

СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ И ПЕПТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ И ИХ ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Халиков Ш.Х., Зафаров С.З., Умархон М.*

Научно-исследовательский институт,

кафедра органической химии

Таджикского Национального Университета,

734025. г. Душанбе, пр. Рудаки 17, тел. 907-11-55-13

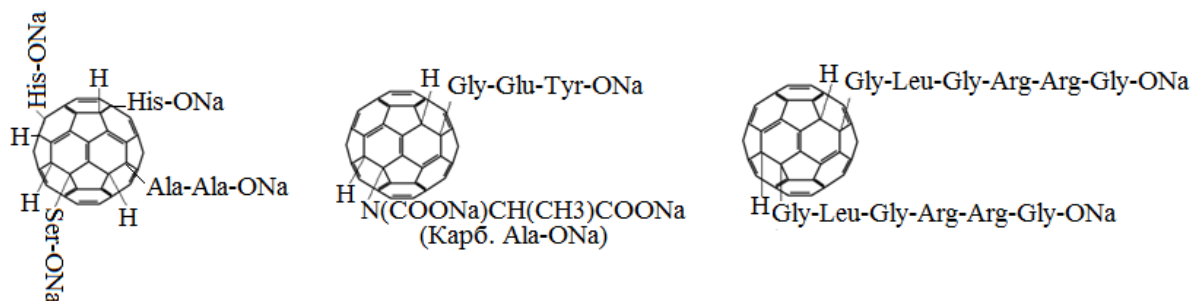
Аннотация. Синтезированы новые композитные производные фуллерена C₆₀ с аминокислотами и пептидами и исследованы их противовирусная активность в отношении вируса гепатита С (ВГС) *in vitro*. На клеточной культуре Vero(V) показано, что производные фуллерена C₆₀ с аминокислотами и пептидами обладают свойством подавлять репликацию ВГС.

Ключевые слова: вирус, гепатит, вакцина, аминокислота, птичий грипп, композит.

Существуют разные формы заболевания, вызываемые вирусом гепатитов А, В, G, D, E, С. Кроме гепатита С, остальные наиболее распространённые и изученные. Гепатит А (ВГА) менее опасен по сравнению с гепатитом В и для его лечения создана генноинженерная вакцина, а также удалось создать противовирусный препарат ламивудин. Гепатит D (ВГD) не размножается в организме самостоятельно, а только в присутствии вируса гепатита В. Гепатит G (ВГG) близок к гепатиту С. Он широко распространён среди наркоманов. Однако, для него не характерно присущее гепатиту С прогрессирование инфекционного процесса с развитием заболевания с труднопредсказуемым исходом. Основной путь лечения является приём альфа интерферона в сочетании с рибавирином. Гепатит E (ВГE), возбудителем которого является вирус гепатита E, неустойчив во внешней среде, но хорошо сохраняется в водной среде. Против вируса гепатита E разработана специфическая вакцина.

В 1989 году обнаружили гепатит С. Сейчас известно основных генотипов ВГС: 1а, 1в, 1с, 2а, 2в, 2с, 3а, 3в, 4а, 4в, 4е, 4d, 4е, 5а, 6а, 7а, 7в, 8а, 8в, 9а, 10а, 11а. Отличительной особенностью вируса гепатита С является существенная изменчивость с образованием множества одновременно существующих, иммунологически различающихся антигенных вариантов – квазивидов, возникающих в результате мутации. Он пока считается неизлечимым, против него не разработана вакцина. Исключительно важными становятся профилактические меры, требуется совершенствование и лечение гепатита С, существующие препараты (интерферон, вирозол, рибавирин) малоэффективны. Опасность этого вируса заключается в том, что он вызывает цирроз и первичный рак печени. Ежегодно в мире от патологий, связанных с вирусными гепатитами, погибают более 2 миллионов человек. Количество инфицированных вирусом гепатита С достигает 130-200 млн. человека [1, 2, 3]. В большинстве развитых странах мира интенсивно ведется исследование относительно приготовления менее или нетоксичных препаратов и вакцин, с целью излечения или предотвращения гепатита С [4, 5]. Разработанная в Институте Вирусологии г. Москва модель экспериментальной инфекции, вызванной ВГС *in vitro*, позволила реализовать уникальную возможность оценки противовирусной активности различных соединений в отношении инфекции, вызванной ВГС, а именно, проводить доклинические испытания препарата *in vitro* ленокметодом.

Ранее был предложен ряд синтезированных нами аминокислотных производных фуллерена C₆₀ с высокими антивирусными свойствами, против вируса птичьего гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05(H5N5) [6]. В этой связи, представляло интерес изучить противовирусную активность определённых образцов-аналогов фуллерена C₆₀, синтезированных нами со следующими структурами:



Фрагмент H - Gly - Leu - Gly - Arg - Arg - Gly - OH брали из антигендетерминантной части (140-145) белка VP₁ вируса ящура A₂₂.

Для синтеза соединений **1-3** мы использовали схему синтеза, заключающуюся во взаимодействии фуллерена C_{60} со свободными или натриевыми и калиевыми солями аминокислот, а также их композитных составов и свободных пептидов в щелочной среде диметилформамида (ДМФА) и галогенбензолов по схеме 1:

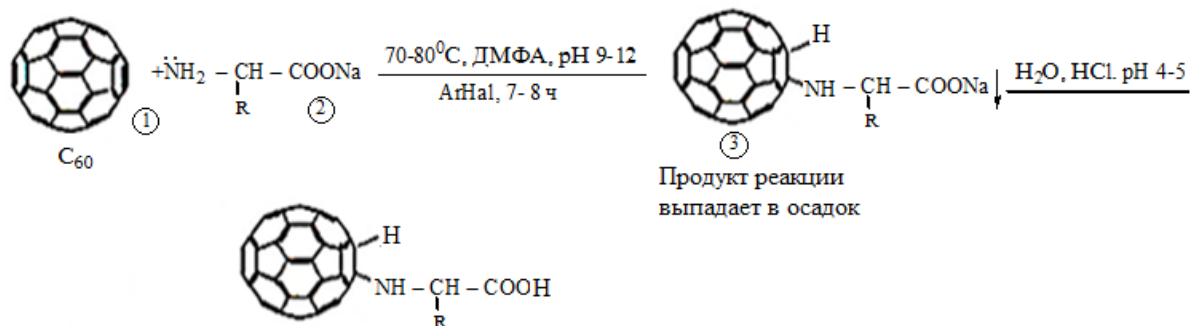


Схема 1

2 - аминокислота, пептид, композиты аминокислот с пептидами. При необходимости можно получить соединение, растворив соединением (3) в воде и подкислять HCl.

Суть данного процесса заключается в следующем: к щелочному раствору ДМФА добавляют аминокислоту, пептида или смесь композитных составов аминокислот и пептидов, взятую от 4-до 10-кратного избытка, и при перемешивании по каплям при 70 - 80⁰ С добавляют раствор фуллерена C_{60} в хлор или дихлорбензол, бромбензол или бромнафталин и перемешивают 7-8ч при установленной температуре. Основной продукт самопроизвольно из реакционной среды выпадает в осадок в виде натриевой соли. При этом выход $N-C_{60}$ моно- или олигоаминокислот и пептидов и их аналогов составляет от 40 до 70%. Данный метод удобен тем, что, во-первых, он позволяет получать фуллеро C_{60} аминокислот и пептидов с достаточно хорошими выходами и чистый без применения трудоёмких способов очистки. Во-вторых, на корковую часть фуллерена C_{60} можно присоединить до шести остатков одинаковых или разных аминокислот и пептидов. Во-третьих, данным способом в реакцию с фуллереном одновременно можно вводить в виде композиции от двух до четырёх разных аминокислот или коротких пептидов. В результате аминокислоты и пептиды, входящие в композитный состав в разном количественном соотношении, могут присоединиться на корковой поверхности фуллерена, образуя N - фуллеро C_{60} - аминокислотный олигомерный композитный комплекс с разными количествами аминокислотных остатков или пептидных фрагментов с общей формулой N - фуллеро C_{60} $(H)_m[NH-CH(R)-COOH]_n$ или N - фуллеро C_{60} $-(H)_m[-\text{пептид}]_n$.

При синтезе соединения (1) в виде композита были взяты L-His, L-Ser и пептид, L-Ala-Ala в щелочном растворе ДМФА, успешно присоединившиеся к молекуле фуллерена C_{60} . Продукт (2) получили, исходя из трипептида Gly-L-Glu-L-Tyr и $HOOC-NH-CH(CH_3)COOH$ (карбамил L-аланин в ДМФА + NaOH) в виде композита, присоединяя к C_{60} . Выход продукта в порошкообразном состоянии был количественным и после очистки хроматографически чистым.

Соединение (3) фуллеро $C_{60}(H)[Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-ONa]$ было синтезировано, исходя из фуллерена C_{60} и свободного $H-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-OH$ по осуществленной нами схеме 2 путем присоединения аминокислот по принципу поэтапного классического пептидного синтеза [7] с применением конденсирующих реагентов и защитных групп, для блокирования реакционноспособных функциональных групп, не участвующих в реакции пептидного синтеза, и снятия защитных групп после завершения синтеза гексапептида.

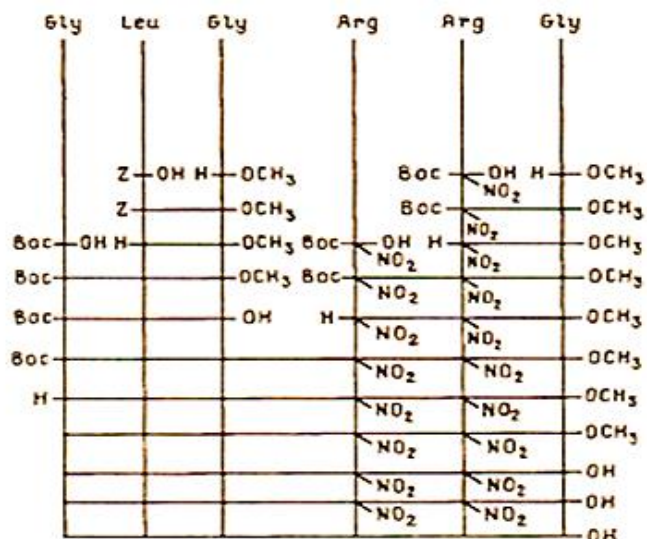


Схема 2

Синтез фрагмента Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly Z и NO₂, защитные группы удаляли с помощью H₂/Pd. Boc защитную группу снимали действием HCl/CH₃COOH(лед.). Омыление метиловых эфиров проводили щёлочью.

Все синтезированные продукты растворимы в максимальном количестве диметилсульфоксида, воде и твине. В масс-спектре соединений (1) фуллера C₆₀ (H)₃(His ONa) (Ser ONa)₂ (Ala-Ala-ONa)] присутствовали пики молекулярных ионов с m/z 1308, 1285, 1260, 1236, 1213, 1191, 1164, 1140, 1116, 1092, 1008, 721, 720, 699. Наиболее интенсивные пики фрагментов 1285, 1092 и 720 принадлежат фуллерену C₆₀.

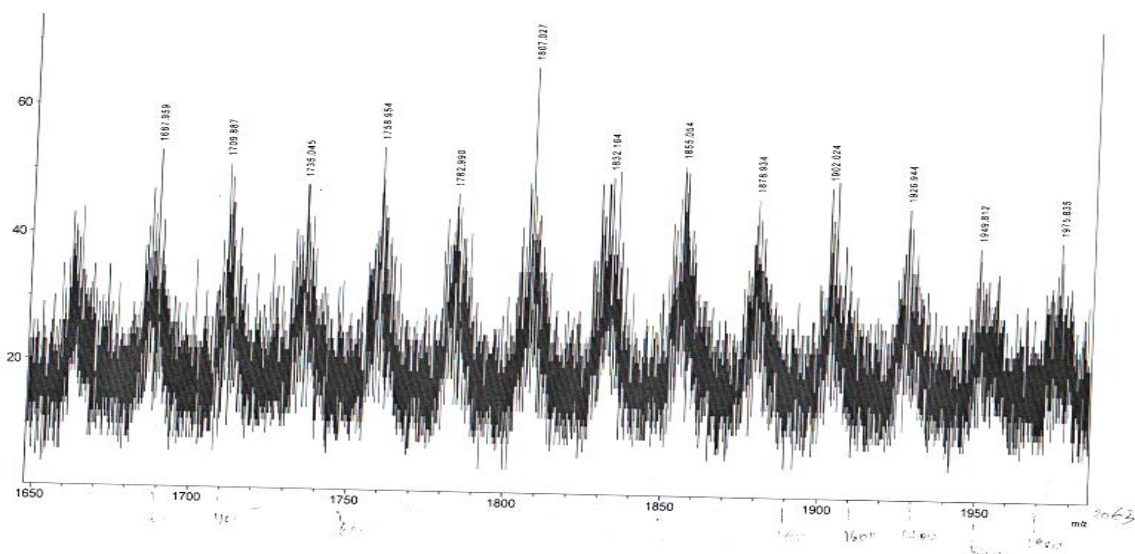


Рисунок 1. Масс-спектр C₆₀-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-ONa с ионизацией электронным ударом

На рис. 1 показан масс-спектр натриевой соли C₆₀-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-ONa с образованием протонированного кластера [M_n + X_m + H]⁺ (n, m = 0, 1, 2...) молекул исследуемого вещества и матрицы X. В присутствии Na в молекуле аддукта положительных ионов появляются кластеры типа [M_n + X_m + Na]⁺. В результате их сигналы располагаются через определённые интервалы с потерей ионов натрия.

Элементный состав синтезированных веществ соответствовал вычисленному. При температуре выше 450⁰C соединения 1-3 интенсивно разрушались с отщеплением остатков C₆₀ и лигандов, претерпевших окисление, либо обугливание – продукты пиролиза. Для определения количества лигандов, присоединившихся к поверхности C₆₀, использовали формулу молекулярной массы [5], полученную на основе масс-спектрограммы или рассчитанную молекулярную массу на основе элементного анализа:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{a \cdot m_{n(1.2.3.4)}}$$

где W – количество аминокислот, присоединившихся к C_{60} ; m_1 – общая масса вещества, взятая из спектрограммы; m_2 – масса C_{60} (720); $m_{n(1.2.3.4)}$ – масса аминокислоты или пептида, взятая для реакции, где $m_{n(1.2.3.4)}$ количество аминокислотного композитного состава или пептидов, взятое в реакции присоединения к фуллерену, соответственно 1.2... а - количество аминокислоты или пептида, взятое в реакции присоединения к C_{60} , для соединения (1) His, Ser, Ala-Ala $a = 3$. Для соединения (2) $a = 2$ и для соединения (3) $a = 1$.

При хроматографическом исследовании кислотного гидролизата в соединении (1) обнаружены аминокислоты серин, аланин и гистидин в соединении (2) глицин, аланин, глутаминовая кислота и тирозин, а в соединении (3) глицин, арганин и лейцин с $R_f = 0.294$.

Электрофорез гидролизата продуктов (2-3) проводили на влажной хроматографической бумаге, ватман №3, ММ в буферной системе (Г) при рН 11-12, силе тока 20 мА (400В) в течение 3 ч, проявитель раствор нингидрина (рис.2).

Видимую электрофоретическую подвижность соединений (2-3) определяли по известной формуле:

$$U = \frac{d \cdot l}{v \cdot t} \text{ см}^2 / \text{вольт.сек.}$$

d – путь, пройденный веществом от линии старта, l – длина полосы бумаги, t – время проведения электрофореза, v – напряжение.

Электрофоретический анализ кислотного гидролизата соединения (2) показал 4 окрашенных пятна, относящихся к аминокислотам - глицину, глутаминовой кислоте, тирозину и аланину. В качестве свидетелей на электрофоретическую бумагу рядом нанесли растворы Gly (2), Glu (3), Tyr (4), Ala (5), Leu (6), Arg (7). Все аминокислоты переместились на определённые расстояния по направлению к аноду (рис.2). В данном случае примесей свободных аминокислот при электрофорезе не обнаружено.

Продукт гидролизата соединения (3) на электрофореограмме показал три отдельные аминокислоты, относящиеся к глицину, лейцину и аргинину. Все аминокислоты тоже переместились по направлению к аноду.

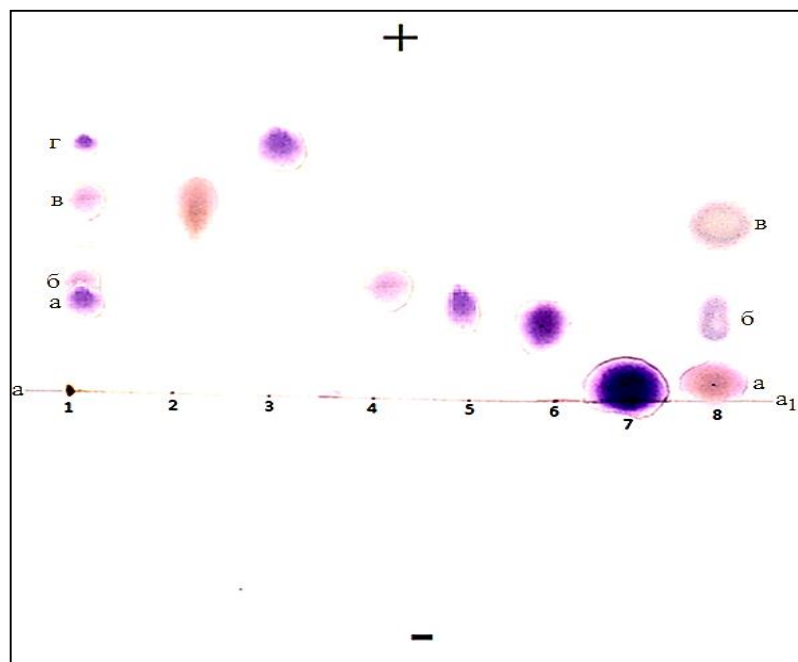


Рис.2. Разделение аминокислот из гидролизатов фуллерен C_{60} -(Gly-Glu-Tyr), (Karb-Ala-ONa) (1) и C_{60} -Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Cly-ONa (8) методом электрофореза. Аминокислоты 2-7 приведены в качестве свидетелей. а а1 - линия старта. Гидролизат C_{60} -(Gly-Glu-Tyr-ONa), (Карбамил-Аланин-ONa)

$U_{1a}=0.0021$, $U_{1б}=0.00256$, $U_{1в}=0.0044$, $U_{1г}=0.00573$ (1). Свидетели (U):
 Gly=0.00449(2), Glu=0.00568 (3), Tyr=0.0256 (4), KarbAla=0.0022 (5),
 Leu=0.00183(6), Arg=0.000458(7). Гидролизат C_{60} -Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Cly-ONa.
 $U_{8a} = 0.000422$, $U_{8б} = 0.00174$, $U_{8в} = 0.0043$ (8).

Исследование противовирусных свойств соединений № (1), (2), (3) в отношении вируса гепатита С. Материалы и методы*: Вирус.

В работе использовали наиболее распространённый в Российской Федерации и наиболее патогенный генотип ВГС-Ib, способный чаще, чем другие генотипы вируса, индуцировать в организме хроническую инфекцию, вызывать цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному. Как известно, это наиболее устойчивый к лечению препаратами интерферона, в том числе, и в сочетании с рибавирином генотип ВГС. Штамм ВГС (генотип Ib)

* Исследование проводили в институте Вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России, г. Москва.

был выделен из сыворотки крови больной, хронически инфицированной вирусом гепатита С, в сыворотке крови которой обнаруживали антитела к ВГС, а методом РТ - ПЦР - РНК ВГС. Для выделения вируса использовали первичные культуры клеток головного мозга мышей-сосунков. Впоследствии вирус приобрёл способность размножаться в культурах клеток человека и животных, индуцируя цитопатогенный эффект в этих культурах клеток и накапливаясь в них в титрах до $7.5 \text{ Ig ТЦИД}_{50}/\text{мл}$. В настоящих опытах использовали вирусодержащую культуральную жидкость, собранную из инфицированных культур фибробластов куриного эмбриона, содержащую $7.0 \text{ Ig ТЦИД}_{50}/\text{мл}$ инфекционного ВГС (генотип Ib).

Соединения. Для исследования использовали вещества: фуллеро $C_{60}(H)_3-[-(HisONa)(-SerONa)(-Ala-AlaONa)]$ в виде композита под номером (1); фуллеро $C_{60}(H)_2-[-(Gly-Glu-TyrONa)(N(COONa)CH(CH_3)COONa)]$ в виде композита под номером (2); фуллеро $C_{60}(H)_2-[(Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-GlyONa)_2]$ под номером (3).

В исследованиях использовали двукратные разведения на питательной среде «Игла МЭМ» всех 3 веществ, начиная с разведения 1:10. Обозначения веществ соответствовали их номерам, а именно: (1), (2), (3).

В качестве положительного контроля использовали активный в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С, препарат, используемый в практическом здравоохранении - рибавирин (производство ИБХ РАН).

Культуры клеток. Для оценки цитотоксических и антивирусной активности веществ использовали свежеприготовленные суспензии пере-виваемых клеток почки эмбриона зеленой мартышки, вакцинный клон – *Vero(v)*, полученный из коллекции клеточных культур лаборатории Госу-дарственной коллекции вирусов РФ. Концентрация клеток составляла око-ло 5×10^5 клеток/мл. Это позволяло получать в течение 24-часовой инкубации клеток при 37°C полный монослой в лунках. Культуры клеток *Vero(v)* выращивали в среде Игла с добавлением 10% сыворотки крови эмбрио-нальной сыворотки телят, глутамина и 100 ЕД/мл пеницилина и стрепто-мицина. В опытах использовали однодневный монослой клеток, выращен-ный в 96-луночных пластиковых культуральных панелях. Линия клеток *Vero(v)* является высокочувствительной для репликации генотипа Ib ВГС.

Исследование цитотоксических свойств аналогов фуллерена проводили путем воздействия различных концентраций соединений на монослой клеток *Vero(v)*, выращенный в 96 луночных пластиковых культуральных панелях. Затем после формирования монослоя в лунки вносили по 25 мкл веществ в разных концентрациях: от 20 мкг до 0.31 мкг в 200 мкл. В качестве контроля служили лунки с клетками *Vero(v)* в питательной среде в том же объёме, но без соединений. Культуры клеток выдерживали в атмосфере CO_2 при 37°C в течение 72 часов. Затем клетки из каждой лунки снимали раствором версена, окрашивали метиловым синим, подсчитывали количество и процент жизнеспособных клеток, используя слайдный цитометр (Cauntess) фирмы Invitrogen.

Рассчитывали цитотоксическую 50%-ю дозу (TC_{50}), которая соот-ветствовала концентрации соединения, приводящей к токсической гибели 50% клеток монослоя к 72 часам инкубации при 37°C после обработки клеток соединениями.

С целью изучения **противовирусной активности** веществ использовали цитопатогенный штамм вируса гепатита С, генотипа Ib. Противовирусную активность аналогов *in vitro* изучали микрометодом в соответствии с методом подавления цитопатогенного действия вируса гепатита С, согласно рекомендациям, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств», Москва, 2012, утверждённом Министерством здравоохранения Российской Федерации. Суспензию клеток *Vero(v)* рассеивали по 200 мкл в 96-луночные пластиковые культуральные планшеты с использованием ростовой среды Игла МЭМ с добавлением глутамина, 100 ед/мл пеницилина и стрептомицина и 7% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, предварительно прогретой на водяной бане при 56°C в течение 20 мин. Затем в каждую лунку с сформированным монослоем клеток по 20 мкл вносили вирусосодержащую жидкость (множественность заражения составляла 0.1 $\text{ТЦИД}_{50}/\text{клетка}$).

Разные не цитотоксические концентрации ингибиторов в объёмах 20-25 мкл на лунку добавляли за 6 часов до заражения клеток вирусом, в момент инфицирования клеток и через 6 часов после заражения клеток. Продолжительность инкубации составляла 120 часов при 37°C в атмосфере 5% CO_2 , при этом в контроле вируса развивался 95-100% цитопатогенный эффект (ЦПЭ), т.е. ЦПЭ охватывал весь монослой клеток.

Антивирусный эффект веществ оценивали по их способности предотвращать развитие инфекционного процесса в клетках, а именно вирусиндуцированного цитопатогенного эффекта (ЦПЭ). Это позволяло определять: а) ЕС_{95} – эффективную концентрацию вещества, способствовавшего сохранению жизнеспособности не менее 95%

зараженных ВГС клеток по сравнению с контрольными ВГС инфицированными, которые не обрабатывали веществами; б) EC_{50} – эффективную концентрацию вещества, способствовавшего сохранению жизнеспособности не менее 50% зараженных ВГС клеток по сравнению с контрольными ВГС инфицированными культурами, где происходила гибель более 95% клеток монослоя. EC_{50} и EC_{95} устанавливали в опытах, в которых вещества в нецитотоксических дозах вносили за 24 часа до заражения монослоя клеток, в момент заражения и через 24 часа после заражения клеток. Результаты учитывали на 5-й и 7-й дни после заражения клеток. Рассчитывали в) **химиотерапевтический индекс (ХТИ)** - показатель широты терапевтического действия химиотерапевтического средства, представляющий собой отношение его максимальной переносимой дозы (TC_{50}) к минимальной эффективной - EC_{50} . Полученные результаты представлены в виде табл.1-2.

Результаты исследования цитотоксического действия веществ (TC_{50}). Как видно из табл. 1, 2, вещества, (1), (2), (3) в концентрациях, в которых они были использованы в настоящем исследовании, были нетоксичны для клеток *Vero(v)*. Поэтому TC_{50} для всех 3 веществ составляла больше чем 20.0 мкг/мл. В тоже время цитотоксическая активность 50 для референц-препарата рибавирин соответствовала 10мкг/мл, т.е. цитотоксические свойства рибавирина были выше, чем у изучаемых веществ. Это позволило нам использовать широкий диапазон концентраций веществ для изучения их противовирусной активности: от 20мкг/200 мкл до 031 мкг/ 200 мкл.

Результаты изучения противовирусной активности веществ. Фуллерен $C_{60}(H)_3-[(-HisONa)(-SerONa)(-Ala-AlaONa)]$ (1), фуллерен $C_{60}(H)_2-[(-Karb-AlaONa)(Gly-Glu-TyrONa)]$ (2), фуллерен $C_{60}(H)_2-[(-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-GlyONa)_2]$ (3) отражены в виде данных таблиц 1 и 2, а именно, представлены данные исследования антивирусных свойств веществ на 5-й и 7-й дни после заражения монослоя клеток *Vero(v)* вирусом гепатита С. Как видно из данных, представленных в табл.1, на 5-й день после заражения клеток *Vero(v)*, когда в контрольных, не обработанных веществами, культурах клеток произошла вирусиндуцированная гибель более 95% клеток, были обнаружены противовирусные свойства у всех веществ в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток *Vero(v)*, однако прослеживались и определённые различия в проявлении противовирусной активности. В частности, было показано, что максимальная противовирусная активность вещества проявляется за 24 часа до заражения вирусом. В этом случае максимальной противовирусной активностью обладало вещество (3) (ХТИ составило >32, а EC_{95} – 1.25 мкг/200мкл). В 2 раза более низкой активностью характеризовались вещества фуллерена $C_{60}(H)_3-[(-HisONa)(-SerONa)_2(-Ala-AlaONa)]$ (1) в виде композита и фуллерена $C_{60}(H)_2-[(-Gly-Glu-TyrONa)(-N-COONa)CH(CH_3)-COONa]$ (2); в этих условиях (ХТИ составлял более 16, что совпадало с данными противовирусной активности препарата рибавирина в этих условиях. В случае внесения веществ сразу же после заражения клеток вирусом противовирусная активность снижалась и для ХТИ для двух веществ: фуллерена $C_{60}(H)_3-[(-HisONa)$

$(-SerONa)(-Ala-AlaONa)]$ и фуллерена $C_{60}(H)_2-[(-Gly-Glu-TyrONa)(-N-COONa)CH(CH_3)COONa]$, для рибавирина составил 4, и выше для вещества фуллера $C_{60}(H)-[(-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-GlyONa)_2]$.

Аналогичная закономерность наблюдалась и в опытах, когда вещества вносили через 24 часа после заражения клеток (табл.2). Несмотря на более низкие показатели противовирусной активности веществ в этих условиях, EC_{95} для вещества фуллерен $C_{60}(H)-[(-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-GlyONa)_2]$ составил 10 мкг/200 мкл против 20 мкг/200 мкл, для вещества фуллерен $C_{60}(H)_3-[(-HisONa)(-SerONa)(-Ala-AlaONa)]$ и фуллерен $C_{60}(H)_2-[(-Gly-Glu-TyrONa)(-N-COONa)CH(CH_3)COONa]$, что повлияло и на показатели ХТИ (>4 и более 2 соответственно).

Представляло интерес выяснить, сохраняются ли противовирусные свойства веществ в течение 7 суток наблюдения за инфекцией, вызванной ВГС в культурах клеток. Данные этих исследований представлены в табл.2. В случае внесения веществ в лунки с монослоем клеток за 24 часа до заражения также наблюдали максимальное проявление противовирусной активности веществ в отношении инфекции, вызванной ВГС в культурах клеток *Vero(v)*. В меньшей степени противовирусные свойства аналогов фуллерена были обнаружены в опытах, когда вещества вносили в лунки сразу же после заражения вирусом клетки, и практически и статически не значимые данные снижения продукции вируса гепатита С инфицированными клетками были получены в экспериментах, когда вещества добавляли через 24 часа после заражения монослоя клеток. В условиях профилактического применения вещества наибольшей активностью характеризовались вещества: Фуллерен $C_{60}(H)_2-[(-Gly-Glu-TyrONa)(-N-COONa)CH(CH_3)COONa]$, фуллерен $C_{60}(H)-[(-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-GlyONa)_2]$; EC_{50} и ХТИ у этих веществ превышали данные этих показателей для вещества рибавирина в 2 раза. Аналогичная закономерность наблюдалась и в опытах при немедленном внесении веществ после заражения вирусом, хотя и показатели противовирусной активности были ниже, чем при профилактическом применении веществ. Исключение составил в этом случае препарат рибавирин. ХТИ и EC_{95} препарата в 2 раза превышали эти значения для 3-х веществ. В то же время следует отметить, что противовирусная активность рибавирина в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток *Vero(v)*, не намного превышала таковую для веществ-аналогов фуллерена, исследованных в данной работе.

Если сравнивать результаты изучения противовирусных свойств предоставленных веществ в течение 5 и 7 дней их воздействия на инфицированные клетки, то следует отметить, что в опытах, когда вещества вносили за 24 часа до заражения клеток, активность веществ была одинаковой как в течение 5, так и 7 дней течения

инфекционного процесса. Однако, в случае применения веществ сразу же после заражения или через 24 часа после заражения их, противовирусные свойства заметно снижались (приблизительно в 2 раза). Полученные результаты свидетельствуют, скорее всего, о необходимости многократного введения веществ в этих условиях, чтобы достичь эффекта сравнимого с активностью при профилактическом применении препарата. Следует также отметить наблюдения, свидетельствующие о том, что при снижении концентрации вносимых веществ ниже приведенных в табл. 1 и 2 значений EC₅₀ часто регистрировали защитные свойства веществ, однако, определить истинное значение EC₉₅ или EC₅₀ не представлялось возможным из-за отсутствия зависимость от дозы эффекта.

Таблица 1.

Противовирусная активность соединений в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток VeroE6

(5-й день после заражения вирусом гепатита С в дозе 0.1 ТЦИД₅₀/клетка)

– Время внесения соединений	– Наименование соединения	– TC ₅₀ – (мкг/200мкл)	– EC ₉₅ – (мкг/200мкл)	– EC ₅₀ – (мкг/200мкл)	– ХТИ
– За 24 часа до заражения вирусом		> 20.0	– 2.5	– 1.25	– >16.0
		> 20.0	– 2.5	– 1.25	>16.0
		> 20.0	– 2	5	16.0
	– Рибавирин	10.0	– 1.25	– 0.62	– 16.0
– Немедленно после заражения вирусом		> 20.0	– 10.0	– 5.0	– >4.0
		> 20.0	– 10.0	– 5.0	– >4.0
		> 20.0	– 5.0	– >2.5	– >8.0
	– Рибавирин	10.0	– 5.0	>2.5	>4.0
– Через 24 после заражения вирусом		> 20.0	– 20.0	– 10.0	– >2.0
		> 20.0	– 20.0	– 10.0	– >2.0
		> 20.0	– 10.0	– 5.0	>4.0
	– Рибавирин	10.0	– 5.0	– >2.5	>4.0

Таблица 2.

Противовирусная активность соединений в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток Vero-E6

(7-й день после заражения вирусом гепатита С в дозе 0.1 ТЦИД₅₀/клетка)

– Время внесения соединений	– Наименование соединения	– TC ₅₀ – (мкг/200мкл)	– EC ₉₅ – (мкг/200мкл)	– EC ₅₀ – (мкг/200мкл)	– ХТИ
– За 24 часа до заражения вирусом		> 20.0	– 2.5	– 1.25	– >16
		> 20.0	25	– 0.62	>32
		> 20.0	– 1.25	– 0.62	>32
	– Рибавирин	10.0	– 1.25	– 0.62	– 16
		3			
– Немедленно после заражения вирусом		> 20.0	0.0	10.0	– >2.0
		> 20.0	0.0	10.0	– >2.0
		> 20.0	.0	– 5.0	– >4.0
	– Рибавирин	10.0	– 2.5	1.25	8.0
– Через 24 после заражения вирусом		> 20.0	– > 20.0	– > 20.0	– >1.0
		> 20.0	>20.0	– >10.0	– >2.0
		> 20.0	> 20.0	20.0	>1.0
	– Рибавирин	10.0	– 10.0	– 5.0	2.0

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали L-аминокислоты L-His, L-Ser и готовые пептиды L-Ala-L-Ala и Gly-L-Glu-L-Tyr фирмы Reanal (Венгрия). ТСХ проводили на хроматографических пластинках Silufol (ЧСФР) и Kiesegel – 60 на стеклянной подложке №5724 (Merck, Германия) в следующих системах растворителей: бутанол - уксусная кислота - вода, 4:1:5; (А); толуол-бромбензол-уксусная кислота, 60:40:50 (Б); хлороформ-метанол-аммиак 20:12:14 (В); триэтиламин-аммиак-метанол-вода, 10:10:200:400 (Г); уксусная кислота-хлороформ, 50:25 (Д); электрофорез проводился на бумаге Ватман ММ в системе (Г) при рН 11-12, 400В. Вещество обнаруживали на хроматограммах и электрофореограммах с помощью нингидрина и паров йода. ИК-спектры записывали на приборе SHIMADRU FTIR Measurement. Данные элементного анализа соединений соответ-вуют расчётным.

Для идентификации аминокислотных остатков в полученных соединениях проводили кислотный гидролиз в 6н и 12н HCl в запаянной ампуле при 120°C в течение 22ч. Образующиеся свободные аминокислоты и C₆₀ идентифицировали с помощью ТСХ, БХ и электрофореза в системах (А и Г).

Растворители удаляли на роторном испарителе при 40-60°C (если указана температура). Температуру плавления определяли на приборе Voetus (Германия).

Гидролиз C₆₀-гексапептида для аминокислотного анализа проводили в стандартных условиях 6н. HCl (120°C 24 ч). Аминокислотный анализ осуществляли на аминокислотном анализаторе LC 2000 (Германия).

N-фуллероC₆₀(H)₄(-HisONa)(-SerONa)₂(-Ala-AlaONa)(1). В маленькой конической колбочке, снабжённой обратным холодильником, капельной воронкой, установленной на магнитной мешалке, в композитную смесь помещают 0.088г (0.00056моль) L-Ala-L-Ala в 8-кратном избытке, 0.056г (0.00052 моль) серина в 7 кратном избытке, 0.088г (0.00056 моль) гистидина в 4.8 кратном избытке, 6 мл диметилформамида, содержащего 0.4 мл 6н NaOH (pH 10). При интенсивном перемешивании при 70-80°C из капельной воронки прикапывают раствор 0.050г (0.0000694 моль) фуллерена C₆₀ в 3 мл 1.2-дихлорбензоле. Перемешивание при показанной температуре продолжают в течение 5 ч.

После трёхчасового перемешивания происходит помутнение реакционной среды, наблюдается переход окраски из фиолетового цвета в тёмно-коричневый и постепенное выпадение из раствора тёмно-коричневого осадка, по окончании реакции (через 8ч) выпавший осадок фильтруют. Осадок промывают толуолом до исчезновения фиолетовой окраски, содержащей непрореагировавший фуллерен C₆₀, и щелочным метанолом для удаления невступивших в реакцию натриевых солей лигандов, и в конце промывают метанолом. Осадок фильтруют, удаляют, высушивают и получают 0.059г чистого (21%) продукта (1), соответствующего фуллерену C₆₀ и композитному составу соединение (1). R_f 0.49 (Г), проявители пары йода и УФ-лучи и R_f 0.38 (В) пары йода. Продукт растворяется в ДСO, воде и тмине в максимальном количестве. Найдено %: С 74.71; Н 3.15; N 8.60 C₈₁H₄₁N₈O₁₁(1301). Вычислено %: С 75.06; Н 3.28; N 7.81.

ИК- спектр KBr, см⁻¹: 3400 (ОН), 2740 (C₆₀ NH), 365 (NH), 1720-1740 (C=O), 820(C=C), 1430 (C₆₀), 1180 (C₆₀). m/z: 1308, 1285, 1260, 1236, 1213, 1191, 1164, 1140, 1116, 1092, 1008, 721, 720, 699.

Количество аминокислот в соединении (1) определяют по формуле [6].

$$W = \frac{m_1 - m_2}{a \cdot m_n} = \frac{588}{3 \cdot 111} = \frac{588}{333} = 1,76 \sim 2 \text{ остатка Ser}$$

$$W = \frac{588}{531} = 1.10 \text{ остатка His} \quad W = \frac{588}{3 \cdot 184} = \frac{588}{552} = 1.06 \text{ остатка Ala-Ala}$$

Кислотный гидролиз соединения (1) для идентификации аминокислотных остатков проводится в 12н. HCl в течение 22 ч при 122°C. Освобожденные аминокислоты идентифицируют с помощью БХ в системе (А). На хроматограмме обнаруживают три аминокислоты Ser с R_f 0.68; His с R_f 0.62; Ala с R_f 0.44, проявитель раствор нингидрина.

N-фуллероC₆₀(H)₂-[N(COONa)CH(CH₃)(COONa)(-Gly-Glu-TyrONa)](2). Получают аналогично (1), исходя из композитной смеси 0.030г (0.000085 моль) в 1.34-кратном избытке трипептида Gly-Glu-Tyr и 0.050г (0.00037 моль) в 5.38 кратном избытке карбамилаланина, 6 мл ДМФА, содержащего 2мл 6н NaOH, с добавлением 0.070г (0.000097 моль) фуллерена C₆₀ в 4 мл 1.2 – дихлорбензоле. Далее реакцию продолжают согласно методике (1). После очистки выделившегося осадка из реакционной среды последовательно промыванием толуолом, щелочным метанолом и чистым метанолом получают 0.055г (37%) продукта (2) в виде натриевой соли, ТСХ с R_f 0.155 (Г), проявитель пары йода. Продукт в максимальном количестве растворяется в воде и ДМСO. Определенное количество соединения (2) растворяют в воде и подкисляют 0.1 н HCl до pH 5. Выпавший осадок фильтруют и высушивают, получают соединения (3) в свободном виде. Выход 0.087г (70%).

Кислотный гидролиз вещества (2) для идентификации аминокислотных остатков проводят в 12н HCl в течение 22 часов при 120-122°C. Освобождённые аминокислоты идентифицируют с помощью БХ в системе (А) R_{f1} = 0.155 (Karb Ala), R_{f2} = 0.53 (Gly), R_{f3} = 0.42 (Glu), R_{f4} = 0.51 (Tyr).

Электрофорез гидролизата продукта (2) проводили в системе (Г), при 400 В и 120 мин. На рис.2 приводится электрофореограмма гидро-лизата. Найдено %: С 84.18; Н 2.41; N3.56 C₇₆H₂₂N₃O₇₁(M 1088). Вычислено %: С 83,82; Н 2.02; N 3.86. ИК-спектр KBr, см⁻¹: 3420 (ОН), 3264 (C₆₀-NH), 3138(NH), 1740 (COOH), 1600(NH), 1473 (CH₂), 1055-1041 (C₆₀NH-C), 750-740 (Ar).

Фуллеро C₆₀(H)-[Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-GlyONa]₂ (3). Получают аналогично (1) из 0.07г (0.0000972 моль) фуллерена C₆₀ в 4мл 1.2 дихлорбен-золе и 0.03г (0.0000228моль) Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-GlyOH в 4мл ДМФА, содержащем 0.5мл 6н NaOH (pH12). Получают 0.041г (51.25%) аморфной натриевой соли фуллеро гексапептида (3), R_{f1} 0.37 (E), R_{f2}=0.535 (CH₃COOH : HCOOH : CH₃OH: H₂O)(15:5:30:50), R_{f3}=0.238 (DMFA : CH₃OH : NH₄OH : HON) (3:4:2:1), пары йода, часть которого растворяют в воде подкисляют 5% HCl до pH 5, получают C₆₀(H)₂[-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly OH]₂]. Найдено %: С 75.91; Н 3.50; N 12.80 C₈₃H₄₂N₁₂O₇(M 1447). Вычислено %: С 75.95; Н 3.53; N 12.76. Аминокислотный анализ: Gly 2.92 (3), Leu 0.9 (1), Arg 1.96 (2). Кислотный гидролиз вещества (3)

проводят в 12н НСl в течение 22ч при 122⁰С, освобожденные аминокислоты иденти-фицируют БХ; в системе (А) и (Г) обнаруживают три аминокислоты Gly-ОН R_f 0.11, Leu R_f 0.57, Arg R_f 0.18, проявитель раствор нингидрина. На рис. 2 приводится электрофореограмма гидролизата соединения (3). Количество гексапептида в соединении (3) на основе молекулярной массы, вычисленной согласно формуле, приведенной в методике (1), соответствуют двум остаткам гексапептида на молекулу фуллерена C₆₀. Согласно расчёту:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{a \cdot m_n} = \frac{1975 - 720}{1 \cdot 621} = \frac{1255}{621} = 2.02.$$

2 - остатка гексапептида
присоединены на поверхности
фуллерена C₆₀

ЛИТЕРАТУРА:

обзин Ю.В., Лихопоенко В.П. Воздушно - капельные инфекции/ Ю.В. Лобзин, В.П.Лихопоенко // СПб.Фолиант. -2006. -С.184.

данов К.В., Лобзин Ю.В., Гусев Д.А., Козлов К.В. Вирусный гепатит / К.В. Жданов, Ю.В. Лобзин, Д.А.Гусев, К.В. Козлов // СПб. Фолиант. -2012. - С.304.

о

z

а

укомолов С.Л., Левакова И.А., Сулягина Л.Г., Синайская Е.В., Болсун Д.Д., Иванова Н.В. Современная эпидемиология гепатита С в России / С. Л. Мукомолов, И.А. Левакова, Л.Г. Сулягина, Е.В. Синайская, Д.Д. Болсун, Н.В. Иванова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Санкт-Петербург. -№6. -2012. -С.21-25.

оболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клущкина В.В., Исаева О.В., Игнатъева М.Е., Романенко В.В., Ооржак Н.Д., Малинникова Е. Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации / Н.В.Соболева, А.А.Карлсен, Т.В.Кожанова, В.С.Кичатова, В.В.Клущкина, О.В Исаева., М.Е.Игнатъева, В.В. Романенко, Н.Д.Ооржак, Е.Ю. Малинникова, К.К.Кюрегян, М.И. Михайлов // Журнал инфектологии. -том 9. -№2. -2017. -С. 56-64.

6. Khalikov Sh.Kh., Sharipova D., Zafarov S.Z., Umarchon M., Jalalifar M. Synthesis of α -Amino Acid Derivatives of Fullerene C₆₀ with Antiviral Properties / Sh.Kh. Khalikov, D. Sharipova, S.Z. Zafarov, M.Umarchon, M. Jalalifar // International Journal of Modern Chemistry. -8(1). -2016. - С.1-18.

7. Халиков Ш.Х., Алиева С.В., Ашууров С.Г. Синтез новых фрагментов белка VP₁ вируса ящура типа А₁₂ / Ш.Х.Халиков, С.В.Алиева, С.Г. Ашууров // Ж. Биоорганической химии. -Том 20. -№4. -1994. -С.399-406.

8. Khalikov Sh.Kh., Sharipova D., Umarchon M., Zafarov S.Z., Kodirov M.Z. Connections to fullerene of C₆₀ of alkyldiamino-, amino- and imino acids with different molecular structures and the nucleophilicity / Sh.Kh. Khalikov, D. Sharipova, M.Umarchon, S.Z. Zafarov, M.Z. Kodirov // International Journal of Modern Chemistry, Флорида. -8(1). - 2016. -С.50-60.

n

К

L

i

m

S

S

h

i

b

u

y

a

К

А

b

o

y

a

n

s

V. Глобальная и региональная смертность от 235 причин смерти для 20 возрастных групп в 1990 и 2010 годах: систематический анализ для Глобального исследования бремени болезней 2010 года / R. Lozano, M.Naqhavi,