

УДК 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31

**СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И СТАБИЛЬНОСТЬ К
ДЕЙСТВИЮ АМИЛАЗЫ АЦИЛЬНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА**

Мартынов А.В., Лисняк Ю.В., Клемчук Л.В.

**Институт микробиологии и иммунологии
им.И.И.Мечникова АМН Украины
ул.Пушкинская 14, Харьков 61057, Украина**

Среди природных биополимеров – продуктов биотехнологии – циклодекстрины занимают особое место. Это группа циклических полисахаридов с 6-10 пиранозными циклами, соединенных 1,4 гликозидными связями. Как правило, подобные циклические декстрины являются продуктами переработки крахмала микроорганизмом *Vacillus macerans* [1,2]. Самым востребованным на фармацевтическом рынке в этой группе является β -циклодекстрин (ЦД) [3,4,5], представляющий собой циклический декстрин из семи пиранозных колец (рис).

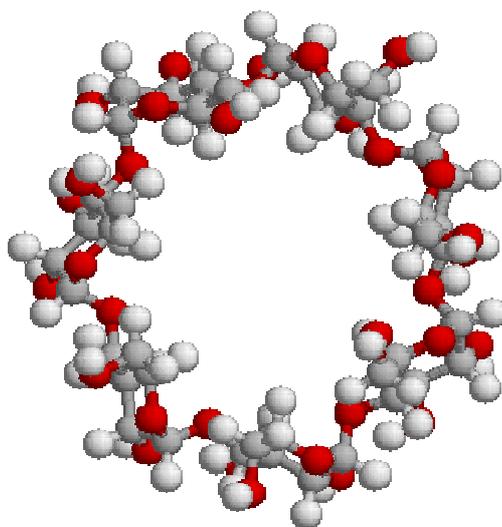


Рисунок – Структура β -циклодекстрина (состоящего из семи глюкопиранозных остатков)

На протяжении последних 15 лет его использовали как вспомогательное вещество, способное образовывать клатратные комплексы с малорастворимыми в воде веществами, тем самым солюбилизирова последние [5]. Известен целый ряд субстанций, растворимость которых увеличивается в 10-100 раз благодаря образованию таких комплексов. К таким препаратам можно отнести противораковый препарат таксол и его синтетические производные [6] и противораковые глюкокортикоиды [4]. В 2003 году появилось ряд ссылок на мощный противовирусный эффект ЦД *in vitro* [7,8]. Образование комплекса включения между ЦД и холестерином из клеточных мембран каким то образом тормозит инфицирование культур клеток целым рядом вирусов: ВИЧ, ВЭБ, ВПГ1 [9,10]. Но нативный ЦД имеет целый ряд недостатков: он быстро разрушается амилазами в крови, благодаря чему имеет низкую биодоступность.

Соответственно целью исследований было получить такие производные циклодекстрина, которые бы обладали устойчивостью к действию амилаз. В структуре ЦД имеется 21 свободный гидрооксил, стерически доступный для ацилирования (по три в каждом пиранозном цикле).

В экспериментах использовали β -циклодекстрин Fluka, любезно предоставленный для исследований компанией ICN-Pharmaceuticals; янтарный, малеиновый и аконитовый ангидриды фирмы Aldrich-Sigma (США). Использовали амилазу КФК (Ensimetech, UK). Молекулярную массу производных ЦД устанавливали с использованием пульс – гель электрофореза на приборе ПФ-3 (ФТИНТ НАН Украины), в качестве электролитного буфера использовали 0,05 М тетраборат натрия при pH 9,2 [11]; электрофорез проводили при напряжении 500 В (импульс 2/1 с) и силе тока 30 мА в 10% ПААГ [12].

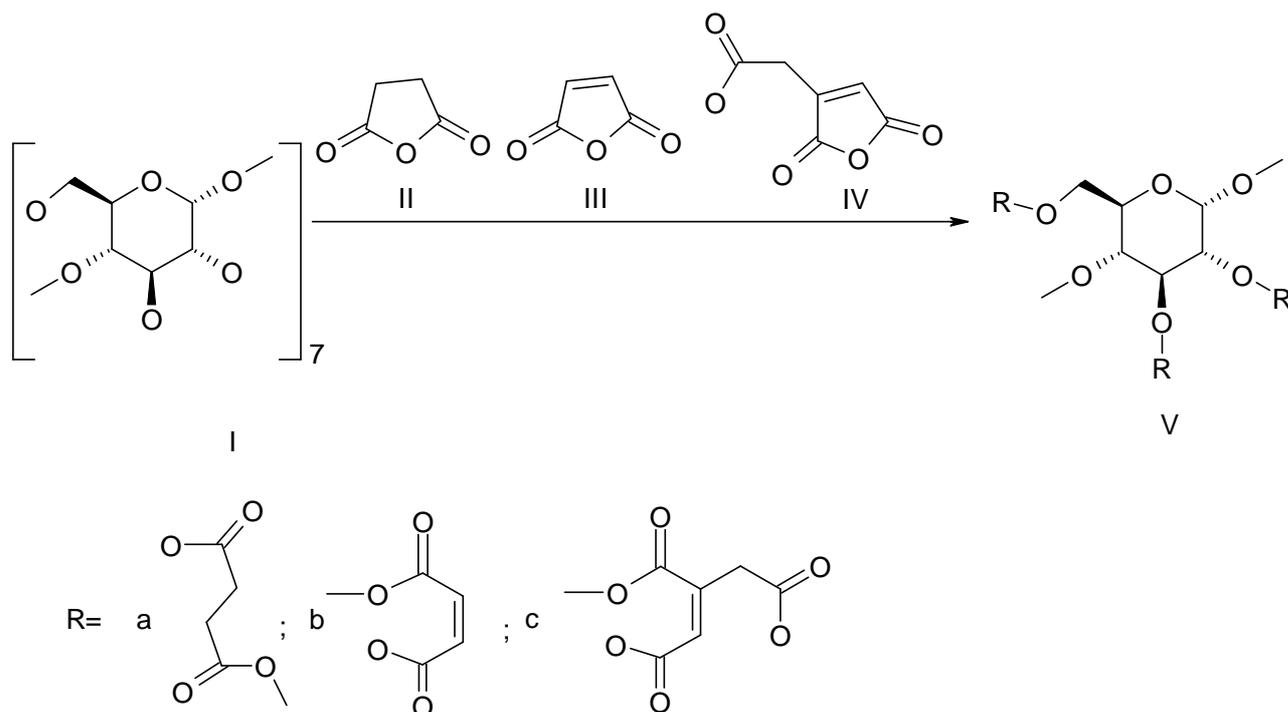


Рисунок 2.- Схема синтеза ацильных производных сукцинированного β- циклодекстрина

Материалы и методы

В качестве проявителя использовали этидия бромид, который предварительно вводили в гель в концентрации 0,002% (Благодаря наличию большого количества карбоксильных групп ацилированные производные ЦД образовывали флуоресцирующие комплексы с этидия бромидом, подобные аналогичным комплексам с ДНК). В качестве свидетелей массы использовали

набор белков-маркеров (денатурированных меркапто-этанолом) фирмы Pharmacia. Заряд молекул ацилированных производных устанавливали путем титрования эквивалентного количества соляной кислоты, выделившейся при пропускании соответствующего производного ЦД через анионообменную колонку (длинной 30 см и диаметром 1,2 см) с анионитом А-500. Расчеты заряда вели по формуле:

$$n = \frac{M_{\text{NaOH}}}{C_{\text{NaOH}}} * \left(\frac{V_{\text{ацил ЦД}} * C_{\text{ацил ЦД}}}{V_{\text{NaOH осн}} * M_{\text{ацил ЦД}}} - \frac{V_{\text{контр ЦД}} * C_{\text{контр ЦД}}}{V_{\text{NaOH контр}} * M_{\text{контр ЦД}}} \right)$$

n – количество избыточных карбоксильных групп у структуре производного ЦД или заряд молекулы;

M_{NaOH} – молекулярная масса гидроксида натрия, Да;

C_{NaOH} – концентрация гидроксида натрия в растворе, которым титруют полианион (%);

$V_{\text{ацил ЦД}}$ – объем раствора ацильного производного ЦД, введенного в колонку (мл);

$C_{\text{ацил ЦД}}$ – концентрация ацилированного ЦД, внесенного в колонку (мг/мл);

$M_{\text{ацил ЦД}}$ – молекулярная масса ацилированного ЦД, внесенного в колонку (Да);

$V_{\text{NaOH осн}}$ – объем титранта (гидроксида натрия), который пошел на титрование образца по основному опыту (мл);

$V_{\text{контр ЦД}}$ – объем раствора неацилированного ЦД, внесенного в колонку (мл);

$C_{\text{контр ЦД}}$ – концентрация неацилированного ЦД, внесенного в колонку (мг/мл);

$V_{\text{NaOH контр}}$ – объем титранта (гидроксида натрия), который пошел на титрование контрольного образца (мл);

$M_{\text{контр ЦД}}$ – молекулярная масса неацилированного ЦД, внесенного в колонку в контрольном опыте (Да);

Синтез сукцинированного ЦД (Va)

0,001 моль (1,135 г) ЦД (I) растворяют в 100 мл бидистиллированной воды, всыпают 0,021 моль (2,100 г) янтарного ангидрида (II), перемешивают раствор на магнитной мешалке до полного растворения ангидрида. Раствор охлаждают до +5 °С. Наблюдают выпадение сукцинилциклодекстрина (Va) в осадок, который отфильтровывают и перекристаллизовывают из воды при +5 °С. Выход 74±5%. Тпл= 270 с разл.

Синтез малеилированного ЦД (5b)

0,001 моль (1,135 г) ЦД (I) растворяют в 100 мл бидистиллированной воды, всыпают 0,021 (2,058 г) малеинового ангидрида (III), перемешивали раствор на магнитной мешалке до полного растворения ангидрида. При этом наблюдается выпадение осадка малеинил-ЦД (Vb) при комнатной температуре. Осадок перекристаллизовывают из воды.

Выход 70±5%. Тпл= 310 с разл.

Синтез аконитилированного ЦД (Vc)

0,001 моль (1,135 г) ЦД (I) растворяют в 100 мл бидистиллированной воды, всыпают 0,021 (3,297 г) аконитового ангидрида (IV), перемешивали раствор до полного растворения ангидрида. Раствор охлаждают до +5 °С. Наблюдается выпадение осадка аконилилированного ЦД (Vc), который отфильтровывают и перекристаллизовывают из воды при +5 °С. Выход 45±5%. Тпл= 210 с разл.

Устойчивость производных ЦД к амилазе изучали следующим образом: в 0,01 мг/мл амилазы в 0,2 % (мг/мл) растворе ТРИС (основание) вносили 0,1% раствор соответствующего производного ЦД, инкубировали при 37 °С 1 час. Затем реакцию останавливали путем внесения в среду уксусной кислоты (на 1 мл реакционной среды вносили 0,2 мл ледяной уксусной кислоты). Затем пробы вносили в гель для дальнейшего проведения гель-электрофореза. В случае гидролиза производного ЦД на геле появлялись несколько дополнительных полос линейных олигосахаридов. Если биополимер становился устойчивым к амилазе, то допол-

нительных полос в пластинке геля не наблюдалось, а основная полоса полностью совпадала с полосой исследуемого производного ЦД.

Результаты и обсуждение

Для синтеза были выбраны наиболее используемые в промышленности и самые дешевые ангидриды малеиновой (III), янтарной (II) и аконитовой кислот (IV). Реакция между гидроксильными спиртовыми группами углеводов и ангидридами хорошо идет на холоду в водной среде. Это связано с отсутствием эффекта дегидратации при ацилировании, как это наблюдается между кислотами и спиртами в реакции кислотной этерификации при образовании сложных эфиров. Характерной особенностью производных циклодекстрина является прямая корреляция между молекулярной массой и подвижностью молекулы в геле при пульсгель-электрофорезе. Физико-химические свойства синтезированных производных ЦД представлены в таблице.

Таблица – Физико-химические характеристики ацилированных производных ЦД

Производное	Mr, Da		n*		Устойчивость к амилазе**
	Рассчитано	Установлено	Рассчитано	Установлено	
I	1135	1130±12	0	0±2	-
Va	3235	3240±20	21	20±2	+
Vb	3193	3200±20	21	19±2	+
Vc	4411	3940±27	42	36±2	-

* - заряд молекулы производного ЦД или количество карбоксильных групп

** - (+) - производное устойчиво к действию фермента и не разрушается; (-) – производное гидролизует амилазой

Как видно из таблицы 1, рассчитанная и установленная массы Vc не совпадают. Это свидетельствует о наличии стерических препятствий для действия IV. Также как и для молекулярной массы, рассчитанный заряд и установленный для Vc отличаются на 6 единиц, что свидетельствует о том, что три гидроксильных группы в структуре Vc остались неацилированными. Приблизительно на три остатка IV отличается рассчитанная молекулярная масса от полученной синтезированного Vc. Физико-химические свойства остальных производных попадали в доверительный интервал и фактически не отличались от рассчитанных.

Очевидно, из-за незащищенности трех гидроксильных групп в структуре Vc наблюдается неустойчивость Vc к действию амилазы. Va и Vb были устойчивы к действию амилазы и не вызвали образование дополнительных полос в геле при инкубации с амилазой.

Таким образом, наиболее стабильными к действию амилазы производными ЦД являются Va и Vc. При этом у обоих производных замещены все 21 гидроксильные группы в пиранозных остатках.

УДК 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31
СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И СТАБИЛЬНОСТЬ К
ДЕЙСТВИЮ АМИЛАЗЫ АЦИЛЬНЫХ ПРОИЗ-
ВОДНЫХ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА
Мартынов А.В., Лисняк Ю.В., Клемчук Л.В.

В работе приведен синтез ацильных производных β-циклодекстрина (сукцинилированного, малеилированного и аконитилированного), определены их молекулярные массы и заряды молекул, изучена стабильность к действию амилазы. Установлено, что реакция аконитилирования протекает неполностью: остаются незамещенными три спиртовых гидроксильных группы в структуре циклодекстрина. Кроме того, именно аконитилированное производное β-циклодекстрина остается неустойчивым к действию амилазы и разрушается подобно неацилированному β-циклодекстрину. Сукцинилированное и малеилированное производные приобретают устойчивость к действию амилазы, а их молекулярные массы и заряды совпадают с рассчитанными.

Ключевые слова: синтез, β-циклодекстрин, амилаза, ацильные производные

UDC 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31
Synthesis, properties and stability to an amylase of β-
cyclodextrin acyl derivatives

Lisnyak Yu.V., Martynov A.V., Klemchuk L.V.
Synthesis of β-cyclodextrin acyl derivatives (succinylated, maleylated and aconitylated) was carried out, their molecular masses and charges were determined, stability to an amylase action was studied. It was determined that reaction of aconitylation is not terminated completely: three alcohol hydroxyls in the structure of cyclodextrin remain unsubstituted. Besides, just aconitylated derivative of β-cyclodextrin remains unstable to an amylase action and is

destroying like non-acylated β -cyclodextrin. Succinylated and maleylated derivatives become stable to an amylase action, their molecular masses and charges coincide with calculated ones.

Key words: synthesis, β -cyclodextrin, amylase, aconitylated, succinylated

Литература

- 1 Абанян В.А., Авакян З.Г., Мелкумян А.Г., и др. Сравнительная характеристика циклодекстрингликозилтрансфераз различных групп микроорганизмов. // Биохимия,-1992.-57, №3.-с. 430-437.
- 2 Абелан В.А., Дехтярев С.И., Африкан Э.Г. О некоторых новых свойствах термофильной циклодекстрингликозилтрансферазы *Vacillus sp*// Биохимия,-1991.-Т.56, №9.-с. 1583-1590.
- 3 Беликов В.Г., Компанцева Е.В., Гаврилин М.В., Умнова Э.Ф.
Изучение возможности использования бета-циклодекстрина в производстве синафлаза// Биотехнология,-1991. №5.-с. 63-64.
- 4 Беликов В.Г., Компанцева Е.В., Гаврилин М.В., Умнова Э.Ф.
Использование возможности бета-циклодекстрина для совершенствования процесса получения преднизалона // Хим.-фарм.журнал,-1991, №2.-с. 48-49.
- 5 Клочков С.В., Компанцева Е.В., Бердник Е.Н., Ботезат-Белый Ю.К., Бабилов Ф.В.Исследование клатратообразования β -циклодекстрина с метапрогеролом // Хим.-фарм.журнал,-1991.-25, №11.-с. 67-69.
- 6 Alcaro S., Battaglia D., Ortuso F. Docking experiments showing similar recognition patterns of paclitaxel when interacting with different macromolecular targets // *Il farmaco*.- 2003.-Vol 58.- P. 691-698
- 7 Liao Z, Graham DR, Hildreth JE.Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells // *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003 Aug;19(8):675-87.
- 8 Katzman RB, Longnecker R.Cholesterol-dependent infection of Burkitt's lymphoma cell lines by Epstein-Barr virus. *J Gen Virol*. 2003 Nov;84(Pt 11):2987-92.
- 9 Bender FC, Whitbeck JC, Ponce de Leon M, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH.Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J Virol*. 2003 Sep;77(17):9542-52.
- 10 Graham DR, Chertova E, Hilburn JM, Arthur LO, Hildreth JE Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *J Virol*. 2003 Aug;77(15):8237-48.
11. Jiang S.M., Xiao Z.M., Xu Z.H. Inhibitory activity of polysaccharide extracts from three kinds of edible fungi on proliferation of human hepatoma SMMC-7721 cell and mouse implanted S180 tumor.// *World J. Gastroenterol*.- 1999.- Vol.5, N 5.-P. 404-407
12. Pae H.O., Seo W.G., Kim N.Y., et al. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer.// *Leuk. Res*.- 2001.-Vol.25, N 4.-P.339-346