

## БИОНАГААХ

Сульфатжсан полисахаридын вирусийн эсрэг үйлдлийн  
механизмын судалгаа

Тунгалаг Б.<sup>1</sup>, Такаши Ёшида<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Эм зүйн сургууль, Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, Монгол

<sup>2</sup>Китами Технологийн Их Сургууль, Хоккайдо, Япон

E mail: [tungalag.b@mnums.edu.mn](mailto:tungalag.b@mnums.edu.mn)

Abstract

**Antiviral mechanism study of sulfated polysaccharidesf**

*Tungalag Battulga<sup>1</sup>, Takashi Yoshida<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>School of Pharmacy, MNUMS*

*<sup>2</sup>Kitami Institute of Technology, Japan*

*E-mail: [tungalag.b@mnums.edu.mn](mailto:tungalag.b@mnums.edu.mn)*

**Background**

Sulfated polysaccharides have specific antiviral activities, which biological mechanism is assumed to the electrostatic interaction between (+)-charged virus surface glycoproteins and (-)-charged sulfate groups.

**Objective**

For the elucidation of the mechanism, several oligopeptides referenced by the sequence of Human Immunodeficiency Virus glycoprotein 120 (HIV gp120) and hemagglutinin (HA) of influenza A and B were synthesized by a peptide synthesizer and the interaction with structurally distinct sulfated polysaccharides such as curdlan sulfate and dextran sulfate was analyzed by SPR.

**Method**

In this study, six oligopeptides were synthesized from the sequence of the V3 loop, C-terminus, and CD4 binding domain in the HIV gp120. Oligopeptide A from the V3 loop comprises 20 amino acids with seven positively charged lysine and arginine in the sequence. The basic amino acids were relatively dispersed along the sequence compared with that of oligopeptide B. Likewise, oligopeptide B from the C-terminus comprises seven lysine and arginine, also oligopeptide of Influenza A/Yamagata HA and Influenza A/Brisbane HA comprises 23 amino acids with eight positively charged lysine and arginine in the sequence. Oligopeptide C from the CD4 binding domain and Influenza B/Hong Kong from the HA comprises one lysine and next to the biotin. The biotinylated peptides were synthesized by a microwave assisted solid phase peptide synthesizer using Fmoc protected amino acids. The peptides were purified by RP-HPLC and identified the structure by using MALDI TOF MS.

**Result**

Peptides A and B from HIV gp120 were found to have interacted strongly with dextran and curdlan sulfates, however, the peptide C without positively charged amino acids showed no interaction. These results suggest that the interaction was due to the electrostatic interaction between negatively charged sulfate groups and positively charged amino groups of the peptides. The results of influenza HAs, influenza A (Yamagata and Brisbane) and B (Hong Kong) viruses, are also presented.

**Conclusion:**

Curdlan and dextran sulfates were found to increase the interaction with increasing the molecular weights and degree of sulfation (DS), which were found to be important factors for the antiviral activity of sulfated polysaccharides. Based on the above, suggesting the antiviral mechanism of sulfated polysaccharides to be the electrostatic interaction of negatively charged sulfated polysaccharides and virus surface glycoprotein at the positively charged amino acid regions.

*Keywords:* human immunodeficiency virus, influenza virus, oligopeptide, interaction

Pp. 3-7, Tables 2, Figure 1, References 15

## Удиртгал

Үржүү, Еошида нарын судлаачид анх сульфатжсан нийлэг полисахаридын ХДХВ-ийн эсрэг үйлдлийн идэвхтэйг мэдээлснээс хойш [1], энэ төрлийн судалгаа улам өргөжиж байгалийн болон нийлэгжүүлсэн полисахаридын ХДХВ-ийн эсрэг идэвхтэйг тодорхойлсон [2, 3]. Үржүү болон Еошида нарын судлаачид вирусийн эсрэг үйлдлийн механизмыг вирусийн гадаргуугийн гликопротеины нэмэх цэнэгтэй амин хүчлүүд болон сульфатжсан полисахаридын сульфитийн бүлгийн хасах цэнэгийн хоорондын харилцан үйлчлэлийн механизмаар тайлбарладаг. Судлаачид хоорондын харилцан үйлчлэлийг цөмийн соронзон резонансын багажийг ашиглан тодорхойлон үзсэн [4]. Мөн сульфатжсан байгалийн полисахарид нь бүлэн хайлуулах идэвхтэй, энэ нь антитромбин III-тай ионы харилцан үйлчлэлд орж байгаатай холбоотой гэж үздэг [5]. ХДХВ-ийн хүний эс рүү орох эхний алхам нь ХДХВ-ийн гадаргуугийн гликопротеин хүний эсийн гадаргуугийн мембраны рецепторт холбогдох юм [6]. ТВ мөн адил гадаргуугийн гликопротеиноороо хүний эсийн гадаргуугийн сиалын хүчилтэй холбогдож хүний эсийн дотор ордог [7]. Козбор нарын судлаач нар кардлан сульфат болон ХДХВ-ийн гадаргуугийн гликопротеины харилцан үйлчлэлийг үзсэн. Тэрээр ХДХВ-ийн гадаргуугийн гликопротеины В3 домэйны нэмэх цэнэгтэй амин хүчлүүд R304, K305, R306, R308, R311, R315 нь кардлан сульфаттай харилцан үйлчлэлтэйг илрүүлсэн[8]. Гадаргуугийн плазмын резонанс багаж нь биомолекулуудын хоорондын харилцан үйлчлэлийг хэмждэг сүүлийн үеийн шилдэг аргуудын нэг юм [9]. Энэ аргаар сульфатжуулсан байгалийн болон нийлэг галактоманнан нь ХДХВ-ийн эсрэг үйлдэлтэйг тодорхойлсон [10,11]. Мөн уг аргаар лактоферрин, антитромбин III, авидин, тромбин зэрэг гепарин-уургийн холболтын холбоог тодорхойлсон байна [12]. Гадаргуугийн

плазмын резонанс багажийг хромогенийн шинжилгээтэй харьцуулж үзэхэд хийх үйлдэл нь хялбар, цаг хугацаа бага зарцуулдаг, зардал бага зэрэг давуу талтай байна [13]. Мөн бидний судалгаа нь сульфатжсан полисахарид болон ХДХВ, ТВ-ийн гадаргуугийн гликопротеины загвар олигопептидийн хоорондын харилцан үйлчлэлийг гадаргуугийн плазмын резонанс багажийг ашиглаж судалсан.

## Хэрэглэгдэхүүн, арга зүй

Олигопептидийг хажуугийн хамгаалагч бүлэг бүхий Fmoc агуулсан амин хүчлийг хэрэглэж, бичил долгионы тусламжтай хатуу фазад пептид нийлэгжүүлэх аргаар пептид нийлэгжүүлэгч багажаар нийлэгжүүлэн авсан. Нийлэгжүүлсэн пептидийг өндөр идэвхт шингэний хроматографи (RP-HPLC) ашиглан цэвэрлэж, молекул массыг масс спектрофотометрээр (MALDI TOF MS) тодорхойлж баталгаажуулсан.

Сульфатжсан полисахаридын молекул массыг усан фазад гель нэвчүүлэх хроматографийн (GPC) багажаар стандарт бодис пуллуланттай харьцуулан молекул массыг баталгаажуулсан.

Нийлэгжүүлсэн олигопептидийг мэдрэгч чип дээр бэхлэн, стандарт олигопептидээр полилизиньг ашиглан харилцан үйлчлэлийг хэмжих гадаргуугийн плазмын резонанс /SPR/ багажинд оруулан хэмжилтийг хийсэн.

## Үр дүн

*Вирусийн гадаргуугийн гликопротеины загвар олигопептидийг нийлэгжүүлэх*

Уг судалгаанд ХДХВ-ийн гурван хэсгийн олигопептид А, В, С болон ТВ-ийн гурван омгийн гадаргуугийн гликопротеины олигопептидийг загвар болгон нийлэгжүүлэн авсан. Хүснэгт 1-т нийлэгжүүлэн гарган авсан загвар олигопептидүүдийн амин хүчлийн дараалал болон молекул массыг харуулсан.

**Table 1. Biotinylated oligopeptides from HIV gp 120 and influenza virus HA**

Name	Position	Sequence <sup>a</sup>	AA <sup>b</sup>	Molecular weight <sup>c</sup>		Remark
				Calcd	Obsd	
Oligopeptide A	V3 loop	[Biotin]- <u>297</u> TRPNNTRKRIRIQRGPGRA <sup>316</sup>	20	2587.35	2586.75	Lys/Arg rich
Oligopeptide B	C-terminus	[Biotin]- <u>493</u> PLGVAPTAKRRVQREKR <sup>511</sup>	19	2415.34	2414.95	Lys/Arg rich
Oligopeptide C	CD4 binding domain	[Biotin]- <u>362</u> KQSSGGDPEIVTHSFNCGG <sup>380</sup>	19	2145.85	2145.25	Lys/Arg poor
Influenza A/Yamagata	HA	[Biotin]- <u>221</u> SHYSRRFTPEIAKRPKVRGQEGR <sup>243</sup>	23	2981.74	2981.73	Lys/Arg rich
Influenza A/Brisbane	HA	[Biotin]- <u>221</u> SHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGR <sup>243</sup>	23	3012.03	3011.28	Lys/Arg rich
Influenza B/Hong Kong	HA	[Biotin]- <u>221</u> SNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGG <sup>243</sup>	23	2606.37	2606.03	Lys/Arg poor

a) Positively charged amino acid was marked by underline.

b) Number of amino acid.

c) The structure of oligopeptides was confirmed by using MALDI TOF MS.

ХДХВ-ийн гадаргуугийн гликопротеин олигопептид А, В болон ТВ-ийн А омгийн вирусийн олигопептидийн амин хүчлийн дараалалд нэмэх цэнэгтэй амин хүчил болох аргинин болон лизин олон агуулагдаж байна. Үлдсэн хоёр загвар олигопептидийн амин хүчлийн дараалалд аргинин болон лизин цөөхөн агуулагдаж байна. Сульфатжсан полисахаридын харилцан үйлчлэлийг хэмжих

эсрэг үйлдлийн механизмыг гадаргуугийн плазмын резонанс багажийг ашиглаж, декстран болон кардлан сульфатыг хэрэглэж загвар олигопептидүүдтэй харилцан үйлчлэлийг хэмжсэн. Хүснэгт 2-т сульфатжсан полисахаридын харилцан үйлчлэлийн үр дүнг харуулав.

Сульфатжсан полисахаридын вирусийн

**Table 2. Interaction between sulfated polysaccharides and synthesized oligopeptides <sup>a, b</sup>**

No						Apperent kinetic constant <sup>c</sup>			
	$\overline{M}_n^d$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n [\alpha]_D^{25}$ $\times 10^{-4}$	S	DS <sup>e</sup> %		$k_a$ 1/Ms	$k_d$ 1/s	$K_D$ nM	
<b>Dextran sulfate</b>									
1	1.31	1.15	+87.0	18.6	0.59	Pep A	$5.48 \times 10^4$	$6.24 \times 10^{-3}$	$1.14 \times 10^{-7}$
2						Pep B	$1.43 \times 10^5$	$6.90 \times 10^{-4}$	$4.84 \times 10^{-9}$
3						Pep C	–	–	–
4						Inf A/Yama/	$1.29 \times 10^5$	$4.56 \times 10^{-4}$	$3.53 \times 10^{-9}$
5						Inf A/Bris/	$1.02 \times 10^5$	$3.44 \times 10^{-4}$	$3.36 \times 10^{-9}$
6						Inf B/HK/	–	–	–
7	1.65	1.31	+79.9	20.8	0.69	Pep A	$2.92 \times 10^5$	$1.27 \times 10^{-3}$	$4.35 \times 10^{-9}$
8						Pep B	$3.73 \times 10^5$	$3.84 \times 10^{-4}$	$1.03 \times 10^{-9}$
9						Pep C	–	–	–
10						Inf A/Yama/	$2.43 \times 10^5$	$3.38 \times 10^{-4}$	$1.39 \times 10^{-9}$
11						Inf A/Bris/	$2.39 \times 10^5$	$2.75 \times 10^{-4}$	$1.15 \times 10^{-9}$
12						Inf B/HK/	–	–	–
13	2.30	1.20	+86.3	20.6	0.69	Pep A	$2.39 \times 10^5$	$2.52 \times 10^{-4}$	$1.06 \times 10^{-9}$
14						Pep B	$8.69 \times 10^5$	$2.72 \times 10^{-4}$	$3.13 \times 10^{-10}$
15						Pep C	–	–	–
16						Inf A/Yama/	$5.39 \times 10^5$	$2.41 \times 10^{-4}$	$4.47 \times 10^{-10}$
17						Inf A/Bris/	$5.36 \times 10^5$	$2.06 \times 10^{-4}$	$3.85 \times 10^{-10}$
18						Inf B/HK/	–	–	–
<b>Curdlan sulfate</b>									
19	6.84	1.41	-0.5	30.5	1.29	Pep A	$5.69 \times 10^5$	$2.25 \times 10^{-4}$	$3.95 \times 10^{-10}$
20						Pep B	$2.96 \times 10^6$	$1.74 \times 10^{-4}$	$5.90 \times 10^{-11}$
21						Pep C	–	–	–
22						Inf A/Yama/	$1.81 \times 10^6$	$2.06 \times 10^{-4}$	$1.14 \times 10^{-10}$
23						Inf A/Bris/	$1.59 \times 10^6$	$1.53 \times 10^{-4}$	$9.62 \times 10^{-11}$
24						Inf B/HK/	–	–	–

a) Oligopeptides were synthesized by sequences of HIV gp 120 and Influenza virus HA, respectively.

Oligopeptide A: [Biotin]-297TRPNNNTRKRIRIQRGPGRA316,

Oligopeptide B: [Biotin]-493PLGVAPTAKRRVVQREKR511,

Oligopeptide C: [Biotin]-362KQSSGGDPEIVTHSFNCGG380.

InfluenzaA/Yamagata:[Biotin] - 221SHYSRRFTPEIAKRPKVRGQEGR243,

InfluenzaA /Brisbane/: [Biotin] - 221SHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGR243,

InfluenzaB/HongKong/:[Biotin] - 221SNPQKFTSSANGVTTHYVVSQIGG243

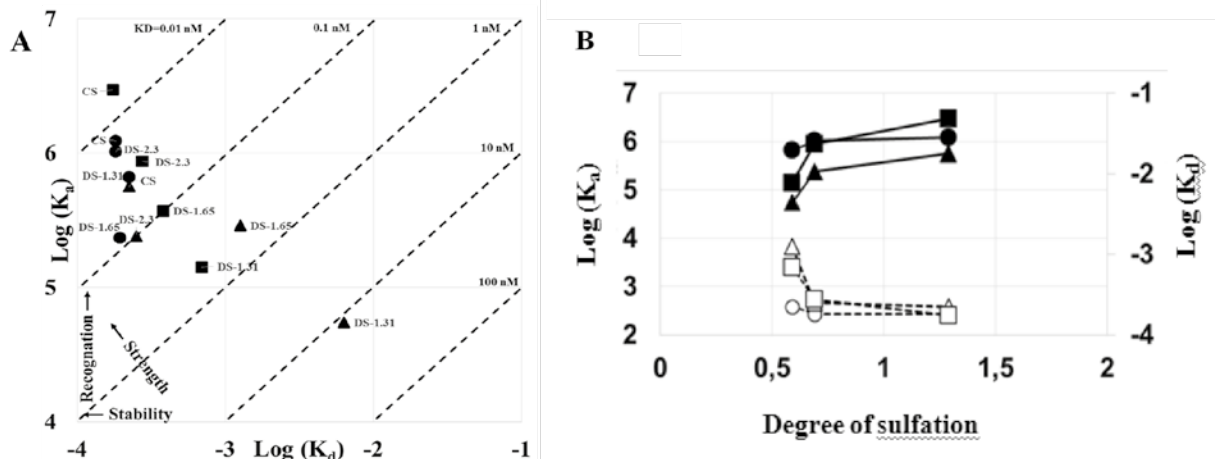
The underline shows basic amino acid.

b) Dextran and curdlan sulfates were synthesized by sulfation of dextran and curdlan, respectively, with piperidine-N-sulfuric acid.

- c) Apparent association-rate ( $k_a$ ), dissociation-rate ( $k_d$ ), and dissociation ( $KD$ ) constants were measured by Biacore X100 SPR apparatus and used 1:1 binding fitting model for the calculation.
- d) Number average molecular weight  $M_n$  was determined by GPC.
- e) Degree of sulfation ( $DS$ ) was calculated from the elementary analysis.

Үр дүнгээс харахад ХДХВ-ийн олигопептид А, В болон ТВ А нь сульфатжсан полисахаридтай харилцан үйлчлэл өндөр үзүүлсэн боловч,

олигопептид С болон ТВ В нь харилцан үйлчлэл үзүүлээгүй байна.



(A) Relationship of association- ( $k_a$ ) and dissociation rate ( $k_d$ ) constants of curdlan sulfate and dextran sulfates with oligopeptides.

(B) Relationship of the DS of sulfated polysaccharides and  $k_a$  and  $k_d$  were kinetic constants,

The oligopeptides is as follows;  $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ : Oligopeptide A,  $\square$ ,  $\blacksquare$ : Oligopeptide B and  $\circ$ ,  $\bullet$ : Poly-L-lysine, respectively.

**Figure 1. Interaction between curdlan sulfate and dextran sulfates with oligopeptides of HIV gp120**

Зураг 1-т сульфатжсан полисахаридын молекул жин болон сульфатжилтын зэргийн хоорондын хамаарлыг харуулсан байна.

Хоорондын хамаарлын үр дүнгээс харахад декстран сульфат болон кардлан сульфатын молекул жин болон сульфатжилтын зэрэг нь нэмэгдэх тусам вирусийн гадаргуугийн гликопротеины загвар олигопептидтэй харилцан үйлчлэл нь нэмэгдэж байна.

#### Хэлцэмж

Бидний нийлэгжүүлсэн олигопептид Үрюү нарын судлаачдын ХДХВ-ийн гликопротеины амин хүчлийн дарааллын С төгсгөл болон Козбор нарын судлаачдын ХДХВ-ийн гликопротеины В3 домэйны олигопептидийн амин хүчилтэй адил бүтэцтэй болж чадсан байна [4, 8].

Дээрх үр дүнгүүд нь бусад судлаачдын декстран сульфат болон кардлан сульфатын ХДХВ-ийн эсрэг үйлдлийн идэвхтэй гэсэн судалгааны үр дүнтэй тохирч байна [4, 14].

Мөн Юүтин нарын судлаачид байгалийн лакны полисахаридыг ялган авч, сульфатжуулан

полилизинтэй харилцан үйлчлэлийг үзэхэд харилцан үйлчлэл нь өндөр байсан байна [15].

Дээрх үр дүнгүүдээс харахад сульфатжсан полисахаридын вирусийн эсрэг үйлдлийн механизм нь сульфатжсан полисахаридын хасах цэнэгтэй сульфитын бүлэг болон вирусийн гадаргуугийн гликопротеины нэмэх цэнэгтэй амин хүчлүүдийн хоорондын цэнэгийн харилцан үйлчлэлтэй холбоотой байна. Иймээс цаашид сульфатжсан полисахаридын Ковид-19 вирусийн эсрэг үйлдэл байгаа эсэхийг судлах боломжтой гэж үзэж байна.

#### Дүгнэлт:

ХДХВ болон ТВ-ийн гадаргуугийн гликопротеины загвар олигопептидийг хатуу фазад пептид нийлэгжүүлэх аргаар нийлэгжүүлж авч чадлаа. Нийлэгжүүлсэн ХДХВ-ийн олигопептид А, В нь сульфатжсан полисахаридтай хүчтэй харилцан үйлчлэл үзүүлж байсан бол олигопептид С нь харилцан үйлчлэл үзүүлэхгүй байв. Эдгээр үр дүн сульфатжсан полисахаридын хасах цэнэгтэй сульфитын бүлэг болон нэмэх цэнэгтэй амин хүчил агуулсан олигопептидийн хооронд

цэнэгийн харилцан үйлчлэл байгааг баталж байна. Энэ үр дүн ТВ А болон В-д адилхан байсан.

Декстран сульфат болон кардлан сульфатын молекул жин болон сульфатжилтын зэрэг нь нэмэгдэх тусам харилцан үйлчлэл нь нэмэгдэж байна. Энэ нь сульфатжсан полисахаридын вирусын эсрэг үйлдлийн идэвхийн чухал хүчин зүйл юм.

### Талархал

Энэхүү өгүүлэлийг бичихэд туслалцаа үзүүлсэн судалгааны ажлын удирдагч багш Химийн ухааны доктор, профессор Такаши Ёошида багшдаа талархал илэрхийлье.

### Ашигласан хэвлэл

1. H.Nakashima, O.Yoshida, T. Tochikura et al. Sulfation of polysaccharides generates potent and selective inhibitors in vitro. Jpn. J. Cancer Res. (Gan)1987; 78:1164–1168.
2. T. Uryu. Polysaccharides in Models of biopolymers by ring-opening polymerization. S.Penczek, Ed., CRC Press. 1990;133–233.
3. T. Yoshida. Synthesis of polysaccharides having specific biological activities. Prog. Polym. Sci. 2001(26) :379–441.
4. T.Uryu, N.Ikushima, K.Katsuraya et al. Sulfated alkyl oligosaccharides with potent inhibitory effects on human immunodeficiency virus infection. Biochem. Pharmacol. 1992; 43:2385–2392.
5. D. A.Lane,I.Bjork, U.Lindahl, Ed. Heparin and related polysaccharides. Advances in experimental medicine and biology.1992; 313
6. P. P. Jagodzinski, J. Wustner, D. Kmieclak, T. J. Wasik, A. Fertala, A. L. Sieron, M. Takahashi, T. Tsuji, T. Mimura, M. S. Fung, M. K. Gorny, M. Kloczewiak, Y. Kaneko,D. Kozbor, Role of the V2, V3, and CD4-binding domains of gp120 in curdлан sulfate neutralization sensitivity of HIV–1 during infection of T lymphocytes. Virology 226(1996) 217–227.
7. K.A. Brogden, The sweet spot: defining virus–sialic acid interactions Jennifer, Nat Rev Microbiol. 3 (2005) 238–250.
8. P. P. Jagodzinski, J. Wustner, D. Kmieclak et al. Role of the V2, V3, and CD4-binding domains of gp120 in curdлан sulfate neutralization sensitivity of HIV–1 during infection of T lymphocytes. Virology. 1996; 226: 217–227.
9. R. B. M. Schasfoort, A. J. Tudos, Ed. Handbook of surface plasmon resonance. Cambridge, UK: RSC Publishing. The Royal Society of Chemistry. 2008
10. M. Tegshi,D. Budragchaa, T. Kanamoto et al. Synthesis of sulfated natural galactomannans with specific antiviral activities.Int. J. Biol. Macromol. 2016; 89:415–420.
11. D. Budragchaa,S. Bai,T. Kanamoto et al. Synthetic galactomannans with potent anti-HIV activity. Carbohydr. Polym. 2015; 130: 233–242.
12. R. I. W. Osmond, W. C. Kett, S. E. Kett, D. R. Combe, Protein–heparin interactions measured by Biacore 2000 are affected by the method of heparin immobilization. Anal. Biochem. 310 (2002) 199–207.
13. J. Zhao, X. Liu, A. Malhotra, Q. Li, F. Zhang, R. J. Linhardt, Novel method for measurement of heparin anticoagulant activity using SPR. Anal. Biochem. 526 (2017) 39–42.
14. T.Yoshida, K. Hatanaka, T. Uryu et al. Synthesis and structural analysis of curdлан sulfate with potent anti–AIDS virus activity. Macromolecules. 1990; 23: 3717–3722.
15. Y.Bai,T.Yoshida, Separation of lacquer polysaccharides and interaction with poly-L-lysine, Carbohydr. Polym.98 (2013) 270–275.

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:  
Биологийн шинжлэх ухааны доктор,  
профессор Ж.Оюунбилэг*