



УДК 577.152.3

СЕЛЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПЛАЗМЕПСИНА II *Plasmodium falciparum* НА ОСНОВЕ ПЕПСТАТИНА

© 2008 г. Л. Д. Румш*, А. Г. Михайлова, И. В. Михура, И. А. Прудченко, Л. Д. Чикин,
И. И. Михалева, Е. Н. Калиберда, Н. И. Дергоусова, Э. Э. Мельников, А. А. Формановский

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 15.10.2007 г. Принята к печати 20.10.2007 г.

Синтезирован ряд новых ингибиторов плазмепсина II (PlmII) *Plasmodium falciparum*, одного из ключевых факторов выживаемости малярийного паразита. Ингибиторы представляют собой аналоги пепстатина с различными вариантами замены остатка аланина. Проведено исследование действия ингибиторов на PlmII и катепсин D человека. Обнаружен эффект ингибирования PlmII субстратом, что потребовало модификации метода Хендерсона для определения констант ингибирования. Показано, что два синтезированных ингибитора обладают выраженной избирательностью к PlmII ($K_i = 5.5$ и 5 нМ) по сравнению с катепсином D ($K_i = 230$ и 3000 нМ соответственно).

Ключевые слова: малярия, протеиназы, ингибиторы, плазмепсин II, *Plasmodium falciparum*.

ВВЕДЕНИЕ

Малярия относится к числу заболеваний, разработка методов лечения которых – приоритетное направление в мировой практике. Актуальность проблематики определена социально значимыми факторами и отсутствием эффективных методов терапии.

Заболеваемость малярией, вызываемой *Plasmodium*, по данным ВОЗ, составляет 500 млн человек в год, со смертельным исходом около 2 млн, преимущественно – детей [1]. Быстрая изменчивость паразита и устойчивость к имеющимся лекарственным средствам требует поиска новых антималярийных препаратов с новым механизмом действия. Известны четыре патогенных для человека вида *Plasmodium* – *vivax*, *ovale*, *malariae* и *falciparum*, последний из которых наиболее опасен.

Ключевой фактор выживаемости этиологического агента малярии – присутствие в его клетках аспартильных протеиназ, называемых плазмепсинами (PlmI–PlmIV), участвующих на стадии внутриэритроцитарного развития плазмодия в катаболизме пищевого ресурса паразита – гемоглобина. Эти ферменты (прежде всего – PlmII, КФ 3.4.23.39) рассматриваются в качестве наиболее перспективных мишеней в терапии малярии, поскольку их специфическая инактивация ингибиторами приводит к полному нарушению метаболизма паразитарных клеток и их быстрой гибели [2].

Пищеварительная вакуоль, протеолитический компартмент *P. falciparum* с pH 5.0–5.4, является тем местом, где происходит деградация гемоглобина [3, 4]. Плазмепсины (PlmI и PlmII) распознают гемоглобин, гидролизуя первоначально единственную пептидную связь между Phe33 и Leu34 [5], которая находится в области петли α -цепи гемоглобина. Аминокислотная последовательность этой петли высоко консервативна во всех гемоглобинах позвоночных: -EALERMF³³-L³⁴SFFPTTK-. Предполагается, что упорядоченный распад гемоглобина инициируется аспаратными протеиназами (PlmI и PlmII), последующий гидролиз протекает под действием других ферментов пищеварительной вакуоли *P. falciparum*, например, цистеиновой протеиназы фальципайна [5–7].

Аналогично другим аспаратным протеиназам, PlmI и PlmII синтезируются в виде неактивных предшественников. Однако прообласти протеиназ плазмодия намного длиннее, чем у других зимогенов: 123 и 124 а.о. соответственно [8]. Отщепление пропептида *in vitro* происходит в результате аутопроцессинга предшественников при подкислении до pH 4.5–5.0 с образованием зрелых форм активных ферментов с мол. массой 37 кДа, идентичных по размеру протеиназам, выделенным непосредственно из *P. falciparum* [9]. Показано, что активность рекомбинантной и природной форм PlmII одинакова [4].

Специфичность рекомбинантного PlmII изучали с помощью ряда синтетических хромогенных и флуорогенных субстратов [10–14]. Эти субстраты были выбраны на основании вышеприведенной аминокислотной последовательности, окружающей первичный сайт гидролиза α -цепи гемоглоби-

Сокращения: Plm – плазмепсин; CatD – катепсин D человека; Pst – пепстатин А.

* Автор для связи (тел.: (495) 336-28-11; эл. почта: rumsh@enzyme.siocb.ras.ru).

Таблица 1. Константы гидролиза субстрата (CS) плазмепсином II и катепсином D человека в 0.1 М Na-формиатном буфере при 37°C

Фермент	pH	[S], мкМ	K_m , мкМ	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ мин ⁻¹	K'_S , мкМ
PlmII	4.4	3–10	9.53	466	48.90	–
		20–90	–	466	–	5.05
CatD	3.5	10–100	91.00	450	4.94	–

на. Хромогенные субстраты были получены путем замены остатка Leu в P1'-положении на остаток *l*-нитрофенилаланина (Phe(NO₂)). Легко окисляемый остаток Met в P2-положении заменяли на Thr [10], Ile, Val или Nle [13]. В этой работе мы использовали хромогенный субстрат H-Leu-Glu-Arg-Ile-Phe-Phe(NO₂)-Ser-Phe-OH (CS) [11].

Препарат про-PlmII высокой степени чистоты получен препаративно путем экспрессии в *E. coli* рекомбинантного гена, кодирующего последние 48 а.о. пропептида и весь зрелый фермент [10]. Определена трехмерная структура PlmII, имеющая типичную топологию аспартатных протеиназ эукариот [12].

При использовании ингибиторов плазмепсинов очень важно найти соединения избирательного действия для предотвращения возможного подавления активности эндогенных аспартатных протеиназ, особенно ренина и катепсина D (КФ 3.4.23.5). В настоящей работе получены высокоселективные ингибиторы PlmII, являющиеся производными пепстатина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры гидролиза субстрата CS плазмепсином II и катепсином D человека (CatD) приведены в табл. 1. Определенные нами значения кинетических констант гидролиза субстрата CS в

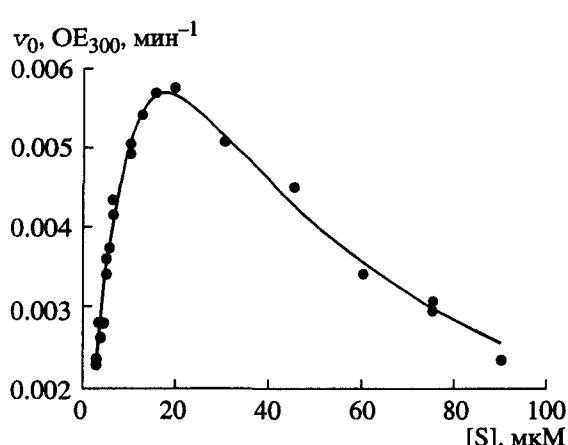
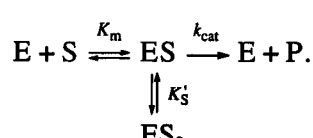


Рис. 1. Ингибирование плазмепсина II (17.6 нМ) субстратом CS; [S] 3–90 мкМ, 0.1 М Na-формиатный буфер pH 4.4; 37°C.

случае PlmII (табл. 1) достаточно близки к литературным данным (k_{cat} 780 мин⁻¹; K_m 10 мкМ, k_{cat}/K_m 78 мкМ⁻¹ мин⁻¹ [11]). Однако мы обнаружили, что в случае высоких концентраций субстрата кинетика его гидролиза отклоняется от классической зависимости Михаэлиса-Ментен (рис. 1). Такой вид кинетической зависимости соответствует ингибированию субстратом:



При этом уравнение начальной скорости гидролиза принимает вид:

$$v_0 = k_{cat}[E][S]/(K_m + [S] + [S]^2/K'_S). \quad (1)$$

Найденная нами величина константы ингибирования субстратом K'_S (табл. 1) оказалась даже меньше величины константы Михаэлиса, что свидетельствует о необычайно сильном ингибировании PlmII октапептидом CS при $[S] > K_m$. В случае катепсина D ингибирование субстратом не было зафиксировано во всем исследованном интервале концентраций (10–100 мкМ) (табл. 1).

За основу структуры синтезированных нами ингибиторов был взят известный ингибитор аспартатных протеиназ пепстатин – Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta, где Iva – остаток изовалериановой кислоты, Sta – остаток статина –NH-CH(CH₂CH(CH₃)₂)CH(OH)CH₂COOH [8]. Мы синтезировали пять модифицированных пептидных ингибиторов (I-1)–(I-5) общего строения Y-Val-Val-Sta-X-Sta-OH:

(I-1): X – –NH-CH(CH₂-O-(CH₂)₂-CH₂-OH)-CO-; Y – Iva;

(I-2): X – –NH-CH((CH₂)₃-CH₂-OH)-CO-; Y – Iva;

(I-3): X – –NH-CH(CH₂-O-(CH₂)₂-CH₂-OH)-CO-; Y – (CH₃)₂CH-CH(CH₂-CH₂OH)-CO-;

(I-4): X –Ala; Y – (CH₃)₂CH-CH(OH)-CO-;

(I-5): X – –NH-CH(CH₂-O-(CH₂)₂-CH₂-OH)-CO-; Y – (CH₃)₂CH-CH(OH)-CO-.

Фрагменты X и Y для соединений (I-1)–(I-5) получали с необходимым для последующего пептидного синтеза набором защитных групп. (S)-2-трет-

Бутилоксикарбонил-6-бензилоксигексановую кислоту (для фрагмента X в соединении (I-2)) получали дезаминированием N^α-Z-L-лизина нитропруссидом натрия, последовательными реакциями замены Z-защитной группы на Вос-группу и постановки бензильной группы на свободную ω-ОН-группу, общий выход целевого соединения составил 52%. Для получения 2-трет-бутилоксикарбониламино-7-бензилокси-4-гептановой кислоты (для фрагмента X в соединениях (I-1), (I-3), (I-5)) N-Вос-L-серин превращали в метиловый эфир обработкой диазометаном, алкилировали полученный эфир 3-бензилоксипропилбромидом и щелочным гидролизом выделяли свободную кислоту, общий выход составил 41%. 4-Бензилокси-2-изопропилбутановую кислоту (для фрагмента Y в соединении (I-3)) синтезировали алкилированием диэтилового эфира малоновой кислоты изопропилбромидом в DMF с последующим алкилированием 2-бензилоксиэтилбромидом, омылением и декарбоксилированием диэтилового эфира 2-бензилокси-2-изопропилмалоновой кислоты, что позволило получить искомым кислоту с общим выходом 47%.

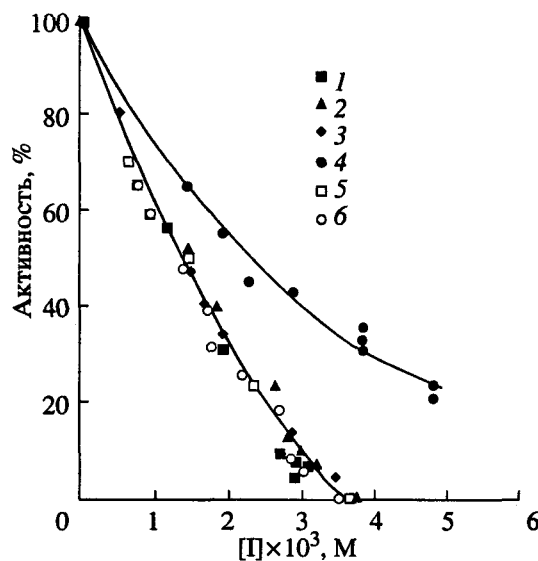


Рис. 2. Ингибирование плазмепсина II (30 нМ) при гидролизе субстрата CS (60 мкМ). Ингибиторы: 1 – Pst; 2 – (I-1); 3 – (I-2); 4 – (I-3); 5 – (I-4); 6 – (I-5); 0.1 M Na-форматный буфер pH 4.4; 37°C.

С помощью субстрата CS исследовано дозозависимое ингибирование PlmII и CatD соединениями (I-1)–(I-5), а также пепстатином А (Pst). Полученные кривые титрования во всех случаях соответствуют типу ингибитора с высоким сродством (рис. 2), что характерно для ингибирования аспартатных протеиназ пепстатином [8]. Для определения величины K_i обычно используется уравнение Хендерсона [15]:

$$[I]/(1 - v_i/v_0) = [E] + (K_i \times A)v_0/v_i, \quad (2)$$

где v₀ – начальная скорость гидролиза субстрата ферментом с начальной концентрацией [E] в отсутствие ингибитора, а v_i – та же скорость в присутствии ингибитора с начальной концентрацией [I]. Коэффициент A зависит от типа ингибирования: A = 1 в случае неконкурентного ингибирования; для конкурентных ингибиторов, к которым относится Pst, A = ([S] + K_m)/K_m [15].

С помощью уравнения Хендерсона (2) для прочно связывающихся ингибиторов (линейная зависимость величины [I]/(1 - v_i/v₀) от v_i/v₀) определяют начальную концентрацию фермента (по пересече-

нию с осью ординат); величину K_i вычисляют по тангенсу угла наклона прямой. Так как тангенсы угла наклона для всех исследованных ингибиторов и ферментов возрастают при увеличении концентрации субстрата (как показано в табл. 2 на примере ингибитора (I-3)), эти ингибиторы, так же как пепстатин, относятся к конкурентным. Согласно уравнению Хендерсона [15], величина поправки A = ([S] + K_m)/K_m; для повышения точности определения мы использовали высокие концентрации субстрата CS. В случае катепсина D (K_m = 91 мкМ) величина этого повышающего фактора пересчета, значение которого устанавливается экспериментально, составляет 2.65 при [CS] = 150 мкМ или 1.33 при [CS] = 30 мкМ; в случае плазмепсина II ([CS] = 60 мкМ, K_m = 9.53 мкМ) A = 7.29. В табл. 3 приведены полученные экспериментально значения K_i × A (2 и 5 столбцы для PlmII и CatD соответственно), а также значения рассчитанных согласно уравнению Хендерсона [15] констант ингибирования (3 и 6 столбцы). Определенная нами величина констан-

Таблица 2. Ингибирование плазмепсина II (12 нМ) соединением (I-3) при разных концентрациях субстрата CS (0.1 M Na-форматный буфер pH 4.4; 37°C)

[CS], мкМ	K _i × A, нМ (тангенс угла наклона)	A = ([S] + K _m)/K _m [15]		A = (K _m + [S] + [S] ² /K _s)/K _m	
		A	K _i , нМ	A	K _i , нМ
1	2	3	4	5	6
60	12.9	7.29	1.77	82.1	0.157
30	6.70	4.35	1.54	22.85	0.293
15	1.20	2.57	0.468	7.23	0.166

Таблица 3. Ингибирование плазмепсина II (pH 4.4) и катепсина D человека (pH 3.5) при гидролизе субстрата CS; [S] 60 мкМ, 0.1 М Na-форматный буфер, 37°C

Ингибитор	PlmII			CatD	
	$K_i \times A$, нМ (тангенс угла наклона)	K_i , пМ		$K_i \times A$, пМ (тангенс угла наклона)	K_i , пМ*
		$A = 7.29^*$	$A = 82.1^{**}$		
1	2	3	4	5	6
Pst	0.226	31.10	2.75	5.01***	3.77***
(I-1)	0.178	24.4	2.15	5.32***	4.00***
(I-2)	0.291	39.9	3.54	5.75***	4.32***
(I-3)	12.9	1770	157	3990***	3000***
(I-4)	0.451	61.9	5.49	623****	235****
(I-5)	0.413	56.6	5.03	8000****	3020****

* По методу Хендерсона [15].

** По нашему методу.

*** [CS] = 30 мкМ; $A = 1.33$.

**** [CS] = 150 мкМ; $A = 2.65$.

ты ингибирования CatD пепстатином (табл. 3) практически совпадает с литературными данными (3.8 пМ [16]). Однако вычисленная величина K_i для пепстатина и плазмепсина (31 пМ; табл. 3) на порядок превышает известную из литературы величину той же константы (3–5 пМ) [8]. Обнаруженный нами эффект сильного субстратного ингибирования PlmII субстратом CS (табл. 1, рис. 1) позволил предположить, что уравнение Хендерсона в случае PlmII следует модифицировать для расчета величин K_i в экспериментах с высокой концентрацией субстрата (60 мкМ). Действительно, субстратное ингибирование отсутствует в случае катепсина D; вычисленная по уравнению Хендерсона величина константы ингибирования пепстатином не отличается от литературных данных.

Еще одним аргументом в пользу неприменимости классического метода Хендерсона для плазмепсина является зависимость определяемых таким образом констант ингибирования от концентрации субстрата (табл. 2, столбец 4).

Мы рассмотрели модификацию уравнения Хендерсона для специального случая сильного субстратного ингибирования. Уравнение для вычисления начальной скорости гидролиза в присутствии конкурентного ингибитора выглядит как

$$v_i = k_{cat}[E][S]/\{(K_m + [S]) + K_m[I]/K_i\}. \quad (3)$$

Уравнение (3) приводит к обычному уравнению Хендерсона (2), где $A = ([S] + K_m)/K_m$; таким образом, в обычном случае прочно связывающего конкурентного ингибитора тангенс угла наклона графика Хендерсона (2) в наших экспериментальных условиях составляет 1.33–2.65 $\times K_i$ в случае катепсина D и 7.29 $\times K_i$ в случае плазмепсина II.

Однако с учетом ингибирования субстратом (уравнение (1)), выражение для начальной скорости реакции гидролиза в присутствии ингибитора становится более комплексным:

$$v_i = k_{cat}[E][S]/\{(K_m + [S] + [S]^2/K'_S) + K_m[I]/K_i\}. \quad (4)$$

Общий вид уравнения Хендерсона (2) остается тем же, однако повышающий фактор A теперь выглядит так

$$A = (K_m + [S] + [S]^2/K'_S)/K_m. \quad (5)$$

Очевидно, что этот фактор резко возрастает при увеличении концентрации субстрата. Действительно, тангенс угла наклона графика Хендерсона (2) в случае плазмепсина II (рассчитан с использованием кинетических параметров табл. 1, концентрация субстрата 60 мкМ) составляет 82.1 $\times K_i$ вместо 7.29 $\times K_i$ при обычном вычислении:

$$A = (9.53 + 60 + 3600/5.05) \text{ мкМ} / 9.53 \text{ мкМ} = 82.1.$$

Очевидно, что в этом случае при использовании высоких концентраций субстрата и ингибитора достоверность определения величин K_i значительно повышается. Истинные значения констант ингибирования PlmII для соединений (I-1)–(I-5), а также пепстатина с использованием нашей модификации уравнения Хендерсона приведены в табл. 2 (столбец б) и табл. 3 (столбец 4). Величина константы ингибирования PlmII пепстатином при этом совпадает с литературными данными [8].

Соединение (I-3) – наименее сильный ингибитор плазмепсина из всех исследованных соединений: величина K_i для него на два порядка выше, чем для пепстатина и синтезированных нами соединений (I-1), (I-2), (I-4) и (I-5) (табл. 3). Для этих ингибиторов величины K_i того же порядка, как для пепстати-

на (\approx пМ). Особенно следует заметить, что ингибирование катепсина D человека соединением (I-4) на два порядка, а (I-5) – на три порядка ниже по сравнению с плазмепсином II. Селективность ингибиторов ферментов-мишеней, помимо их высокой ингибирующей способности, оказывается одним из важнейших факторов, которые следует учитывать при создании лекарственных препаратов. Очевидно, что исследованные нами ингибиторы плазмепсина II (I-4) и, особенно (I-5), могут представлять значительный интерес для фармакологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез ингибиторов и субстрата. ТСХ-анализ проводили на пластинках Silufol (Chemapol, Чехия); хроматографическую очистку – на колонках, заполненных SiO_2 (Merck G-60, Германия), элюент – CHCl_3 –MeOH, 7 : 1. Спектры ЯМР ^1H (δ , м. д., J, Гц) регистрировали на спектрометре Unity Inova (400 МГц) в CDCl_3 , внутренний стандарт – остаточные протоны растворителя. Температуры плавления определяли на микростолике Voetius.

Фрагмент Y в (I-4) и (I-5), 2-гидрокси-3-метилбутановая кислота, фирмы "Aldrich", США.

(2S)-6-Бензилокси-2-трет-бутилоксикарбонил-аминогексановая кислота (для фрагмента X в (I-2)). К раствору 5.3 г (18.86 ммоль) (2S)-2-бензилоксикарбонил-амино-6-гидроксигексановой кислоты (получена с выходом 80% дезаминированием N^α -Z-L-лизина нитропруссидом натрия [17]) в 100 мл MeOH прибавляли 10 мл воды, 0.5 г 10% Pd/C и гидрировали в токе водорода до исчезновения исходного соединения. Катализатор отделяли, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали досуха, добавляли 10 мл воды и 110 мл EtOH. Выпавшие кристаллы отделяли, промывали абс. EtOH и сушили в вакууме над щелочью. Получили 2.63 г (95%) (2S)-2-амино-6-гидроксигексановой кислоты. Т. пл. 251°C; $[\alpha]_D^{20} + 23^\circ$ [18]. Спектр ^1H -ЯМР (D_2O): 1.45 (2 Н, м, H4), 1.62 (2 Н, м, H5), 1.91 (2 Н, м, H3), 3.64 (2 Н, т, J 7.5, H6), 3.78 (Н, т, J 6.8, H2).

К раствору 2.50 г (17 ммоль) полученной (2S)-2-амино-6-гидроксигексановой кислоты в 30 мл смеси THF– H_2O (1 : 1) прибавляли 2.5 мл (18 ммоль) Et_3N и 4.44 г (20.5 ммоль) ди(трет-бутил)пирокарбоната. Реакционную смесь перемешивали 6 ч, разбавляли 50 мл воды и упаривали THF в вакууме. Водный раствор экстрагировали гексаном (2 \times 10 мл), водный слой подкисляли до pH 3 и экстрагировали EtOAc (5 \times 20 мл). Объединенные экстракты сушили над Na_2SO_4 , растворитель упаривали, остаток очищали хроматографически (элюент – EtOAc). Получили 3.70 г (88%) (2S)-2-трет-бутилоксикарбонил-амино-6-гидроксигексановой кислоты. Т. пл. 112°C, $[\alpha]_D^{20} - 6.36^\circ$ [19]. Спектр ^1H -ЯМР: 1.43 (2 Н,

м, H4), 1.50 (9 Н, с, CH_3), 1.68 (2 Н, м, H5), 1.95 (2 Н, м, H3), 3.66 (2 Н, т, J 7.5, H6), 3.80 (Н, ш.с, OH), 4.48 (Н, т, J 6.9, H2), 5.20 (Н, ш.с, NH), 11.80 (Н, ш.с, COOH).

Раствор 2.47 г (10 ммоль) (2S)-2-трет-бутилоксикарбонил-амино-6-гидроксигексановой кислоты в 30 мл сухого Et_2O обрабатывали 20 мл раствора CH_3N_2 в Et_2O . По окончании реакции Et_2O упаривали в вакууме, остаток растворяли в 20 мл сухого DMF, охлаждали до 0°C и прибавляли 0.5 г 55%-ной суспензии NaH в масле (11.4 ммоль NaH). После прекращения выделения H_2 прибавляли 1.71 г (10 ммоль) бензилоксида. Через сутки реакционную смесь выливали в 100 мл воды, доводили pH до 7 и выпавшее масло экстрагировали EtOAc (5 \times 25 мл). Экстракты промывали, растворитель упаривали, к остатку в 60 мл MeOH добавляли NaOH. Свободную кислоту получали обработкой соли ионообменной смолой Дауэкс 50 \times 8 в H^+ -форме, очищали хроматографически. Получили 2.60 г (77%) целевой (2S)-6-бензилокси-2-трет-бутилоксикарбонил-аминогексановой кислоты в виде бесцветного масла. Спектр ^1H -ЯМР: 1.41 (2 Н, м, H4), 1.49 (9 Н, с, CH_3), 1.66 (2 Н, м, H5), 1.95 (2 Н, м, H3), 3.30 (2 Н, т, J 7.5, H6), 4.50 (Н, т, J 7.0, H2), 4.58 (2 Н, с, CH_2Ph), 5.18 (Н, ш.с, NH), 7.10–7.40 (5 Н, м, Ph), 11.40 (Н, с, COOH). Найдено, %: С 63.91; Н 8.00; N 4.06. $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_5$. Вычислено, %: С 64.07; Н 8.07; N 4.15.

2-трет-Бутилоксикарбонил-амино-7-бензилокси-4-оксагептановая кислота (для фрагмента X в соединениях (I-1), (I-3), (I-5)). Раствор 4.1 г (20 ммоль) N-Вос-L-серина в 20 мл MeOH обрабатывали CH_3N_2 в Et_2O . По окончании реакции добавляли 0.5 мл CH_3COOH , растворители упаривали, остаток очищали флеш-хроматографией (SiO_2 , Merck G-60, элюент – CHCl_3 – EtOAc , 1 : 1). Получили 3.94 г (90%) метилового эфира N-Вос-L-серина в виде бесцветного масла. Его растворяли в 30 мл сухого DMF, охлаждали до 0°C и прибавляли 0.87 г 55%-ной суспензии NaH в масле (20 ммоль NaH), перемешивали 1 ч и по каплям прибавляли 4.85 г $\text{PhCH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{Br}$. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0°C и оставили на ночь при комн. температуре. Затем выделяли свободную кислоту как указано выше. После хроматографической очистки получали 3.18 г (45%) 2-трет-бутилоксикарбонил-амино-7-бензилокси-4-оксагептановой кислоты в виде бесцветного масла. Спектр ^1H -ЯМР: 1.49 (9 Н, с, CH_3), 1.83 (2 Н, м, H6), 3.45 (2 Н, м, H3), 3.65 (4 Н, м, H5, H7), 4.38 (Н, м, H2), 4.50 (2 Н, с, CH_2Ph), 5.80 (Н, ш.с, NH), 7.18–7.23 (5 Н, м, Ph), 11.20 (Н, с, COOH). Найдено, %: С 61.00; Н 7.74; N 4.01. $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_6$. Вычислено, %: С 61.17; Н 7.70; N 3.96.

4-Бензилокси-2-изопропилбутановая кислота (для фрагмента Y в соединении (I-3)). К перемешиваемой суспензии 1.1 г 55% NaH в 30 мл сухого DMF при комнатной температуре прибавляли 5.05 г (25 ммоль) изопропилмалонового эфира [20] и пе-

ремешивали 1 ч, после чего прибавляли 5.38 г (25 ммоль) 2-бензилоксиэтилбромида [21] и перемешивали реакционную смесь 6 ч при 75°C, а затем 12 ч при 50°C. Охлажденную реакционную смесь выливали в 150 мл воды, доводили pH до 7 и экстрагировали EtOAc (4 × 40 мл), объединенные экстракты промывали и сушили над Na₂SO₄. После упаривания растворителя получили 6.30 г (75%) *диэтилового эфира 2-бензилоксиэтил(изопропил)малоновой кислоты*. Спектр ¹H-ЯМР: 0.95 (6 H, д, J 6.8, CH₃CH₂), 1.18 (6 H, т, J 6.5, CH₂CH₃), 2.19 (2 H, т, J 6.5, OCH₂CH₂), 2.30 (H, м, CH), 3.50 (2 H, т, J 6.0, OCH₂CH₂), 4.10 (4 H, кв, J 6.5, CH₂CH₃), 4.41 (2 H, с, CH₂Ph), 7.18–7.25 (5 H, м, Ph).

К раствору 5.38 г (16 ммоль) диэтилового эфира 2-бензилоксиэтил(изопропил)малоновой кислоты в 100 мл EtOH прибавляли 20 мл 2 M NaOH и кипятили 8 ч. По охлаждении смесь подкисляли до pH 3 и упаривали растворитель досуха. *2-Бензилоксиэтил(изопропил)малоновую кислоту* извлекали из остатка эфиром, эфир упаривали, после чего ее декарбоксилировали нагреванием 1 ч при 180°C, продукт перегоняли в вакууме. Получили 2.64 г (70%) целевой *4-бензилокси-2-изопропилбутановой кислоты* в виде бесцветного масла, т. кип. 116–120°C/0.1 мм рт. ст. Спектр ¹H-ЯМР: 0.92 (6 H, д, J 6.8, CH₃), 1.90 (2 H, м, CH₂CH₂), 2.16 (H, м, CHCOOH), 2.32 (H, м, CH(CH₃)₂), 3.43 (2 H, м, OCH₂CH₂), 4.44 (2 H, с, CH₂Ph), 7.18–7.25 (5 H, м, Ph), 10.0 (H, с, COOH). Найдено, %: C 71.00; H 8.50. C₁₄H₂₀O₃. Вычислено, %: C 71.16; H 8.53.

Синтез пептидных ингибиторов (I-1)–(I-5) и субстрата H-Leu-Glu-Arg-Ile-Phe-Phe(NO₂)-Ser-Phe-OH (CS) осуществлен твердофазным методом с использованием Вос-стратегии на модернизированном синтезаторе Beckman 990 (США). В работе использовали реактивы и производные аминокислот фирм “Reanal” (Венгрия), “PRF” (Япония), “Advanced Chemtech” и “Aldrich” (США) и “Fluka” (Швейцария). Исходный полимерный носитель для синтеза пептидов получали путем присоединения Вос-Sta-OH (Neosystem, Франция) к хлорметилированному полимеру (Advanced Chem. Tech., США) по стандартной методике через цезиевую соль [22]. Нагрузка аминокислоты на полимере составляла 0.25 ммоль/г. Для проведения реакции конденсации использовали DCC в присутствии НОВу (1 : 1) с 10-минутной преактивацией при 0°C. Реагенты брали в 3.5-кратном избытке. Временную Вос-группу удаляли обработкой 30% раствором TFA в хлороформе. Деблокирование и отщепление пептидов со смолы осуществляли жидким HF в присутствии *n*-крезола (10/1) при 0°C в течение 1 ч. После окончания реакции HF удаляли в вакууме. Пептид осаждали из реакционной смеси добавлением 15 мл диэтилового эфира. Смолу и деблокированный пептид отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром (5 × 10 мл), сушили на фильтре. Пептиды экстрагировали, в зависимости от их гидро-

фобности, 50–95%-ным раствором CH₃COOH, экстракты замораживали и лиофилизовали.

Гель-фильтрацию осуществляли на колонке размером 800 × 25 мм, заполненной сефадексом LH-20 (Pharmacia, Швеция) в метаноле. Скорость потока 0.8 мл/мин; детекция при 226 нм (Multiscan 2158, LKB, Швеция). Препаративную обращенно-фазовую хроматографию высокого давления (ВЭЖХ) проводили на приборе System Gold (Beckman, Швеция), колонка Ultrasphere ODS (7 мкм, 25 × 2.0 см), градиент 10–90% MeCN в 0.23 M (NH₄)₂NaPO₄, pH 6.1. Скорость потока 6 мл/мин; детекция при 220 нм. Фракцию, содержащую целевой продукт, упаривали и проводили повторную гель-фильтрацию на колонке с сефадексом LH-20 в 80% метаноле.

Аналитическую ВЭЖХ осуществляли в том же градиентном режиме на приборе System Gold (Beckman, США) в условиях: колонка Ultrasphere ODS (5 мкм, 250 × 2.0 мм). Скорость потока 0.25 мл/мин; детекция при 220 нм.

Чистота полученных пептидов составляла 95%, по данным аналитической ВЭЖХ. Пептиды охарактеризованы корректными данными масс-спектрологии на приборе TOF-MALDI Vision 2000 (США). Определенные значения молекулярных масс (Да) составляли 760 (I-1), 744 (I-2), 804 (I-3), 702 (I-4), 776 (I-5) для ингибиторов и 1103 для субстрата.

Экспрессия и выделение PlmII. Ген целевого белка, кодирующий укороченную форму про-PlmII (фрагмент 76–453, по нумерации полноразмерной формы зимогена), был клонирован ранее в векторе pET-23a(+) (Invitrogen, США). Клетки штамма BL21(DE3) трансформировали, выращивали при 37°C в течение ночи в присутствии 100 мг/мл ампициллина и далее пересевали в предварительно азрированную среду, достигая 100-кратного разбавления ночной культуры. Культуру индуцировали при плотности суспензии 0.5 OЕ₆₀₀ внесением 1 mM изопропил-β-D-тиогалактопиранозида и инкубировали в режиме интенсивного перемешивания в течение 3 ч без изменения температурных условий. Биомассу клеток (10 г из 5 л культуры) отделяли центрифугированием и использовали для выделения белка.

Клеточную пасту (5 г) ресуспендировали в 20 мл буфера А (50 mM Трис-НСl, pH 8.0; 0.1 M NaCl; 2 mM EDTA), обрабатывали ультразвуком, разбавляли в 6 раз охлажденным буфером А и центрифугировали 1 ч при 100000 g. Нерастворимую фракцию лизата, содержащую целевой белок, ресуспендировали в 60 мл буфера Б (50 mM Трис-НСl, pH 8.0; 1% Тритон Х-100), суспензию перемешивали 30 мин и центрифугировали (100000 g, 20 мин). Супернатант удаляли и проводили двукратную промывку осадка буфером Б (120 мл), не содержащим детергент, с использованием центрифугирования.

Тельца включения растворяли в 20 мл денатурирующего буфера (6 M мочевины; 0.5 M Трис-НСl, pH

8.0; 1 mM EDTA; 50 mM β -меркаптоэтанол), перемешивали в течение ночи, суспензию центрифугировали (100000 g, 30 мин). Далее супернатант разбавляли в 50 раз буфером С (50 mM Трис-НСl, pH 8.5) путем выкапывания через перистальтический насос при скорости 0.5 мл/мин. Рефолдинг белка проводили в течение 16 ч (25°C) при медленном перемешивании раствора. Раствор фермента после рефолдинга (1 л) фильтровали через мембрану с размером пор 0.45 мкм, концентрировали в 20 раз на целлюлозной мембране с удерживанием белков, превышающих по мол. массе 10 кДа, и использовали для проведения анионообменной хроматографии.

Раствор белка наносили со скоростью 1 мл/мин на 10 мл Q-сефарозы, уравновешенной буфером С (pH 8.0). Колонку промывали 10 объемами того же буфера и элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0–1 M) в буфере С (pH 8.0) (10 объемов колонки) без изменения скорости потока. Собирали фракции по 2 мл и анализировали с помощью электрофореза. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали до 2 мл с использованием центрифужных концентраторов Amicon Ultra-15.

Гель-фильтрацию проводили на колонке Superdex 200 16/60 (Amersham Biosciences) в 20 mM Трис-НСl-буфере (pH 8.0), содержащем 0.2 M NaCl, при скорости потока 0.5 мл/мин. Фракции целевого белка объединяли и использовали в дальнейшем исследовании. Средний выход фермента составил 20 мг на 10 г клеточной биомассы. Чистота конечного препарата была не менее 95%.

Кинетические измерения. Скорость гидролиза хромогенного субстрата CS под воздействием PlmII регистрировали с помощью спектрофотометра Gilford 2400–2 (США) при 37°C по уменьшению оптического поглощения при 300 нм в 0.1 M Na-формиатном буфере pH 4.4, содержащем 3% DMSO. $\Delta\epsilon_{300}$ 1700 M⁻¹ см⁻¹. Активный PlmII получали инкубированием 5-кратно разбавленного 0.1 M Na-формиатным буфером pH 4.4 запасного раствора про-PlmII в течение 30 мин при 37°C.

Концентрацию фермента определяли с помощью титрования активного центра пепстатином А (Sigma, США).

Для определения активности катепсина D человека (Sigma, США) использовали тот же субстрат при pH 3.5.

Ингибирование PlmII и CatD соединениями (I-1)–(I-5) изучали при 37°C в 0.1 M Na-формиатном буфере при pH 4.4 для первого и 3.5 для второго фермента. Пепстатин был использован в качестве ингибитора в тех же условиях для сравнения.

Значения кинетических параметров гидролиза субстрата (k_{cat} и K_m) в случае CatD были получены с помощью нелинейной регрессии непосредственно по уравнению Михаэлиса-Ментен; в случае PlmII значения этих параметров, а также константы инги-

бирования субстратом (K'_S), вычислены по уравнению (1). Константы ингибирования определяли по уравнению Хендерсона (2) с поправкой на конкурентный характер ингибирования в случае CatD и по модифицированному нами уравнению Хендерсона с поправкой на ингибирование субстратом (5). Стандартная ошибка во всех случаях не превышала 20%.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность докторам Р. Уэллеру (Richard Weller), Р. Орнштейну (Richard Ornstein), Д. Моррису (James Morris) и Е. Райниной (Evgenia Rainina) из Национальной Тихоокеанской Северо-Западной лаборатории (Pacific Northwest National Laboratory) за сотрудничество, организацию и активную поддержку проекта, а также профессору Д. Гольдбергу (D. Goldberg), Медицинский институт Говарда Хьюза (Howard Hughes Medical Institute) – за предоставление экспрессионной плазмиды для получения плазмепсина II. Работа поддержана контрактом 312665-A-G2 Департамента энергетики США (U.S. Department of Energy) и Государственным контрактом Роснауки № 02.512.11.2007 от 19 февраля 2007 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Banerjee R., Liu J., Beatty W., Pelosof L., Klemba M., Goldberg D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 990–995.
2. Coombs G.H., Goldberg D.E., Klemba M., Berry C., Kay J., Mottram J.C. // Trends in Parasitology. 2001. V. 17. P. 532–537.
3. Goldberg D.E., Slater A.F., Cerami A., Henderson G.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 2931–2935.
4. Goldberg D.E., Slater A.F., Beavis R., Chait B., Cerami A., Henderson G.B. // J. Exp. Med. 1991. V. 173. P. 961–969.
5. Glusman I.Y., Francis S.E., Oksman A., Smith C.E., Duffin K.L., Goldberg D.E. // J. Clin. Invest. 1994. V. 93. P. 1602–1608.
6. Liu J., Istvan E.S., Goldberg D.E. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 38682–38688.
7. Prade L., Jones A.F., Boss C., Richard-Bildstein S., Meyer S., Binkert C., Bur D. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 23837–23843.
8. Francis S.E., Banerjee R., Goldberg D.E. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 14961–14968.
9. Francis S.E., Glusman I.Y., Oksman A., Knickerbocker A., Mueller R., Bryant M.L., Sherman D.R., Russell D.G., Goldberg D.E. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 306–317.
10. Hill J., Tyas L., Philip L.H., Kay J., Dunn B.M., Berry C. // FEBS Lett. 1994. V. 352. P. 155–158.
11. Tyas L., Gluzman I., Moon R.P., Rupp K., Westling J., Ridley R.G., Kay J., Goldberg D.E., Berry C. // FEBS Lett. 1999. V. 454. P. 210–214.

12. Silva A.M., Lee A.Y., Gulnik S.V., Maier P., Collins J., Bhat T.N., Collins P.J., Cachau R.E., Luker K.E., Glusman I.Y., Francis S.E., Oksman A., Goldberg D.E., Erickson J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 99. P. 990–995.
13. Westling J., Cipullo P., Hung S.H., Saft H., Dame J.B., Dunn B.M. // Protein Sci. 1999. V. 8. P. 2001–2009.
14. Tyas L., Moon R.P., Loetscher H., Dunn B.M., Kay J., Ridley R.G., Berry C. // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. V. 436. P. 407–411.
15. Henderson P.J.F. // Biochem. J. 1972. V. 127. P. 321–333.
16. Baldwin E.T., Bhat T.N., Gulnik S., Hosur M.V., Sowder R.C., Cachau R.E., Collins J., Silva A.M., Erickson J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 6796–6800.
17. Baldwin J.E., Killin S.J., Aldington R.M., Spiegel U. // Tetrahedron. 1988. V. 44. P. 2633.
18. Bodanszky M., Martinez J., Priestley G.P., Gardner J.D., Mutt V. // J. Med. Chem. 1978. V. 21. P. 1030–1035.
19. Mauren P. J., Miller M. J. // J. Org. Chem. 1981. V. 46. P. 2835.
20. Синтезы органических препаратов/Ред. Г. Гильман. Сб.1. М.: ИЛ, 1949. С. 546.
21. Grobelny D., Maslak P., Witek S. // Tetrahedron Lett. 1979. V. 20. P. 2639.
22. Gisin B.F. // Helv. Chem. Acta. 1973. V. 56. P. 1476–1482.

Selective Inhibitors of Plasmepsin II from *Plasmodium falciparum* Based on Pepstatin

L. D. Rumsh[#], A. G. Mikhailova, I. V. Mikhura, I. A. Prudchenko, L. D. Chikin,
I. I. Mikhaleva, E. N. Kaliberda, N. I. Dergousova, E. E. Mel'nikov, and A. A. Formanovskii

[#] Phone: +7 (495) 336-2811; e-mail: rumsh@enzyme.siobc.ras.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

A number of new inhibitors of plasmepsin II (PlmII) from *Plasmodium falciparum*, one of the key factors of malarial parasite survival, were synthesized. The inhibitors are analogues of pepstatin with various variants of Ala residue substitutions. Effects of the inhibitors on human PlmII and cathepsin D were studied. Inhibition of PlmII by the substrate was found, which required the use of the modified Henderson method for the determination of inhibition constants. Two synthesized inhibitors were shown to exhibit a pronounced selectivity to PlmII ($K_i = 5.5$ and 5 nM) in comparison with cathepsin D ($K_i = 230$ and 3000 nM, respectively).

Key words: inhibitors, malaria, plasmepsin II, Plasmodium falciparum, proteases