

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИМАЛЯРИЙНЫХ АГЕНТОВ

Я. В. ФАЛЕТРОВ¹⁾, М. С. ХОРЕЦКИЙ¹⁾, О. А. ЗАВАДСКАЯ¹⁾, Б. РАТИ²⁾,
Н. С. ФРОЛОВА¹⁾, Е. В. РУДАЯ¹⁾, В. М. ШКУМАТОВ¹⁾

¹⁾Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»,
ул. Ленинградская, 14, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²⁾Колледж им. Ханса Райя, Делийский университет, Махатма Ханс Радж Мардж, 110007, г. Дели, Индия

Синтезированы 7-нитро-2,1,3-бензоксодиазол-4-ильные производные аминокислот пролина, глицина, глутаминовой кислоты. Соединения охарактеризованы при помощи масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии и спектрофлуориметрии. Теоретически рассчитаны энергии образования и максимумы поглощения в видимой области, а также энергии связывания в активных центрах трех ферментов возбудителей малярии. Показано, что выбранные методы квантово-химических расчетов адекватно предсказывают экспериментальные максимумы поглощения таких производных, однако требуют учета влияния растворителя. Результаты докинга указывают на перспективу экспериментального тестирования производных пролина и глутаминовой кислоты как ингибиторов ферментов метаболизма жирных кислот плазмодия – FabZ и N-миристоилтрансферазы соответственно.

Ключевые слова: синтез; 7-нитро-2,1,3-бензоксодиазол-4-ильные аминокислоты; квантово-химические расчеты; докинг; малярийный плазмодий.

SYNTHESIS OF FLUORESCENT-LABELED AMINO ACIDS – POTENTIAL ANTIMALARIAL AGENTS

Y. V. FALETROV^a, M. S. HORETSKI^a, O. A. ZAVADSKAYA^a, B. RATHI^b,
N. S. FROLOVA^a, E. V. RUDAYA^a, V. M. SHKUMATOV^a

^aResearch Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University,
Leningradskaya street, 14, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bHans Raj College, University of Delhi, Mahatma Hansraj Marg Malkaganj, 110007, Delhi, India

7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl derivatives of amino acids proline, glycine, glutamic acid were synthesized. The obtained compounds were characterized by mass spectrometry, thin layer chromatography and spectrofluorimetry. The energies of formation, absorption maxima in visible region and the energy of binding in the active sites for the two enzymes of malarial plasmodium were

Образец цитирования:

Фалетров Я. В., Хорецкий М. С., Завадская О. А., Рати Б., Фролова Н. С., Рудая Е. В., Шкуматов В. М. Синтез флуоресцентно-меченных аминокислот – потенциальных антималярийных агентов // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2016. № 2. С. 18–22.

For citation:

Faletrov Y. V., Horetski M. S., Zavadskaya O. A., Rathi B., Frolova N. S., Rudaya E. V., Shkumatov V. M. Synthesis of fluorescent-labeled amino acids – potential antimalarial agents. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2016. No. 2. P. 18–22 (in Russ.).

Авторы:

Ярослав Вячеславович Фалетров – кандидат химических наук; старший научный сотрудник.

Матвей Сергеевич Хорецкий – студент химического факультета.

Ольга Анатольевна Завадская – стажер младшего научного сотрудника.

Брижеш Рати – доцент кафедры химии.

Нина Степановна Фролова – научный сотрудник.

Елена Викентьевна Рудая – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник.

Владимир Макарович Шкуматов – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор; заведующий лабораторией биохимии лекарственных препаратов.

Authors:

Yaroslav Faletrov, PhD (chemistry); senior researcher.

biopharm@bsu.by

Matvey Horetski, student at the faculty of chemistry.

matvey.horetski@gmail.com

Olga Zavadskaya, trainee junior researcher.

helzstaf@gmail.com

Brijesh Rathi, associate professor at the department of chemistry.

brathi@svc.ac.in

Nina Frolova, researcher.

biopharm@bsu.by

Elena Rudaya, PhD (biology); senior researcher.

biopharm@bsu.by

Vladimir Shkumatov, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), full professor; head of the laboratory of biochemistry of drugs.
vlad.shkumatov@tut.by

calculated. It was shown that the chosen methods of absorption maxima calculations are accurate, however for better results the solvation should be taken into account. Docking results point out on the perspective of experimental testing and studying of the proline and glutamic acid derivatives as inhibitors of the fatty acid metabolism enzymes of the plasmodium – FabZ and N-myristoyl-transferase respectively.

Key words: synthesis; 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl amino acids; quantum chemical calculations; docking; plasmodium.

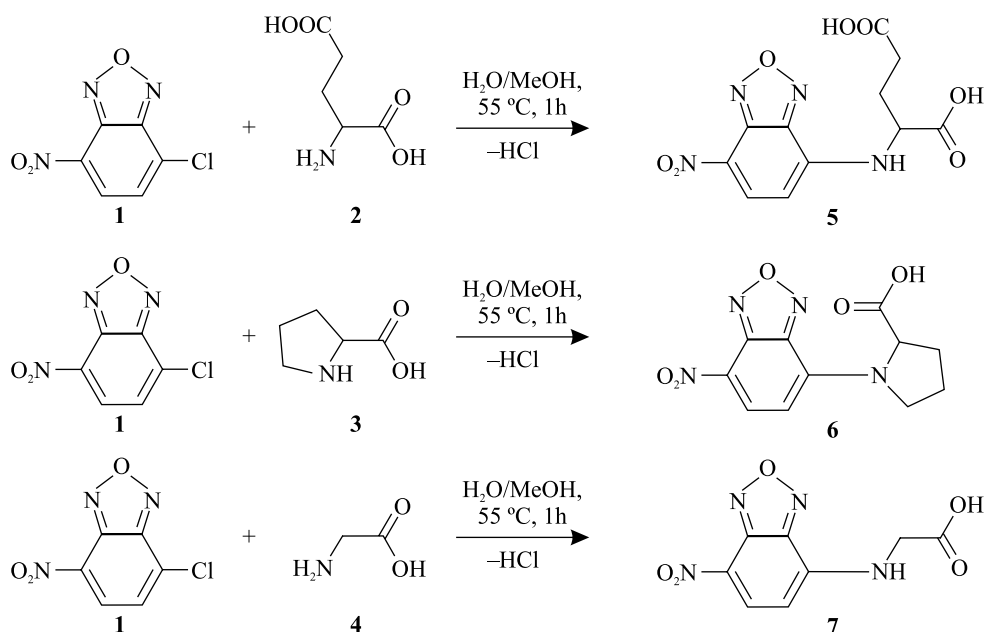
В настоящее время достигнуты большие успехи в изучении молекулярных механизмов развития и лечения малярии (Нобелевская премия в области физиологии и медицины в 2015 г.). Однако поиск новых эффективных средств диагностики и лечения этого опасного инфекционного заболевания, уносящего около 600 тыс. жизней ежегодно во всем мире, остается актуальной задачей в связи с риском развития резистентности к используемым в настоящее время препаратам [1, 2]. Известно, что 7-нитро-2,1,3-бензоксодаiazол-4-ильный (NBD) фрагмент обеспечивает флуоресценцию соединений при наличии электронодонорных заместителей в паразоложении по отношению к нитрогруппе, а с другой стороны, опубликованы данные о противораковых свойствах NBD-производных [3]. Таким образом, есть предположение, что NBD-производные аминокислот – важного класса биоактивных соединений – могут влиять на различные биохимические процессы с участием данных и схожих по структуре молекул (метаболизм липидов, редокс-сигнализация, матричный синтез биополимеров). В настоящей работе синтезированы, теоретически рассчитаны и экспериментально определены оптические свойства NBD-производных глутаминовой кислоты, пролина и глицина, а также оценен их потенциал как фармакологических агентов – ингибиторов ферментов метаболизма жирных кислот малярийного плазмодия [1, 2].

Материалы и методы исследования

В исследовании использовались 4-хлоро-7-нитробензофуразан (NBD-Cl, соединение 1) (*Sigma-Aldrich*, США), глицин, пролин и глутаминовая кислота (Gly, Pro, Glu соответственно) (*Ferak*, Германия). В работе также применялись натрия бикарбонат, метанол (*Sigma-Aldrich*, США), этанол, уксусная кислота (ООО «АО «Реахим»», Россия), ацетонитрил марки LiChrosolv и силикагель (*Merck*, Германия).

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) осуществляли на пластинках *Merck UV-254* (Германия) в системе «бензол – этанол – ацетон» (6 : 3 : 1 по объему). Анализ методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ЭСИ-МС) проводили с использованием хромато-масс-спектрометрической системы *LCMS-2020 (Shimadzu)*, Япония), как описано в [4, 5], с незначительными изменениями. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) выполнялась на приборе *Shimadzu LC-10AT VP* с использованием колонки *LiChroCART C18 (Merck)*, Германия) (250 × 4 мм, 5 мкм) и элюирования смесью «ацетонитрил – вода» (1 : 9 по объему) со скоростью 0,8 мл/мин.

Получение аминокислот, меченных NBD. На рисунке представлены схемы синтеза целевых производных аминокислот.



Схемы синтеза NBD-производных аминокислот: 1 – 4-хлоро-7-нитробензофуразан (NBD-Cl); 2; 3 и 4 – глутаминовая кислота, пролин и глицин соответственно; 5 – 2-[(NBD)амино]пентандиовая кислота; 6 – 1-(NBD)пирролидин-2-карбоновая кислота; 7 – [(NBD)амино]уксусная кислота

Схемы синтеза были взяты из [6, 7] с некоторыми модификациями, в частности для получения производного NBD-Glu (**5**). В круглодонную колбу добавили 0,6 мл дистиллированной воды и нагрели ее до 55 °С. При перемешивании в подогретую воду порциями добавили смесь из 23,7 мг Glu (**2**, 0,16 ммоль) и 81,2 мг NaHCO₃ (0,97 ммоль). Продолжили перемешивание образовавшегося раствора до полного растворения веществ и прекращения выделения углекислого газа. В отдельной пробирке приготовили раствор 29,0 мг **1** (0,15 ммоль) в 2,5 мл метанола. Далее добавляли раствор **1** к раствору Glu и продолжали перемешивание при 55 °С до полного превращения **1** по результатам ТСХ. После смесь упаривали на роторном испарителе. Полученный грубый продукт промывали н-гексаном (3 раза по 5 мл) с последующим растворением в смеси «этанол – уксусная кислота» (1,0 : 0,2 по объему) и разделили методом колоночной хроматографии (сорбент SiO₂, элюент «этанол – уксусная кислота» 1,0 : 0,05 по объему). Фракцию целевого продукта детектировали по зеленой флуоресценции в свете ультрафиолетовой лампы с максимумом излучения 365 нм. Степень очистки нового соединения проверяли с помощью ТСХ. Заключительный этап очистки проводили с использованием ВЭЖХ. Получение производных на основе Pro и Gly (**3** и **4** соответственно) – NBD-Pro (**6**) и NBD-Gly (**7**) – осуществлялось аналогично. Количество компонентов, использованных для получения **6** и **7**, приведено в табл. 1.

Таблица 1

Количества исходных веществ для получения NBD-Pro (**6**) и NBD-Gly (**7**)

Целевое производное	Исходные вещества				
	Аминокислота (кол-во, мг)	NBD-Cl, мг	NaHCO ₃ , мг	H ₂ O, мл	MeOH, мл
6	3 (20,7)	32,3	45,3	0,6	2,8
7	4 (15,8)	37,7	52,9	0,8	3,3

Компьютерное моделирование структуры соединений и молекулярный докинг. Структуры соединений построены с использованием пакета программ ChemOffice (*CambridgeSoft*, США). С помощью программного пакета Avogadro отбирались конформеры с наименьшей энергией. Затем полученные структуры были дополнительно оптимизированы с помощью программного пакета Gaussian09 (*Gaussian, Inc.*, США) в рамках теории функционала плотности DFT в приближении B3LYP и базисного набора 6-311 + g(d, p) [8]. Расчет спектров поглощения синтезированных NBD-производных осуществлялся с использованием Gaussian09 в рамках методов ZINDO/S и TD-DFT для одиночной молекулы в газовой фазе. Докинг взаимодействия соединений с ферментами малярийного плазмодия был осуществлен с помощью программ AutoDock 4.2 и AutoDock Tools (*Graphics Laboratory, Scripps Research Institute*, США), как представлено в [4–6].

Результаты исследования и их обсуждение

Выход целевых соединений составил 50–60 %, они были охарактеризованы с помощью нескольких методов анализа: ЭСИ-МС, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии. Результаты ЭСИ-МС-анализа соединений подтверждают получение целевых продуктов с ожидаемой молекулярной массой (табл. 2).

Таблица 2

Данные ЭСИ-МС-анализа полученных соединений и их интерпретация

Соединение	Рассчитанная молярная масса, г/моль	Основной сигнал от положительных ионов (его интерпретация), отн. ед.	Основной сигнал от отрицательных ионов (его интерпретация), отн. ед.
5	310,2	105 ([5 + 3H] ⁺)	309 ([5 – H] [–])
6	278,2	279 ([6 + H] ⁺)	391 ([6 + TFA** – H] [–])
7	238,2	280 ([7 + AcN* + H] ⁺)	237 ([7 – H] [–])

*AcN – ацетонитрил. **TFA – трифторуксусная кислота.

С помощью ТСХ показано, что все три соединения давали основные хроматографические зоны (величины относительной подвижности R_f для **5**, **6** и **7** составили 0,70; 0,77 и 0,65 соответственно), флуоресцирующие при ультрафиолетовом облучении светом с максимумом при 365 нм. Определенные

экспериментально максимумы спектров поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}$), представленные в табл. 3, согласуются с данными литературы об оптических свойствах NBD-аминопроизводных [4–7].

Таблица 3

Оптические свойства полученных соединений

Соединение	Поглощение ($\lambda_{\text{макс}}$), нм	Возбуждение ($\lambda_{\text{макс}}$), нм	Испускание ($\lambda_{\text{макс}}$), нм
5	472	468	548
6	480	480	560
7	466	468	566

Для разработки метода расчетно-теоретического предсказания свойств NBD-производных α -аминокарбокислот были проведены квантово-химические расчеты, результаты которых суммированы в табл. 4.

Таблица 4

Данные квантово-химических расчетов для полученных соединений

Соединение	E_h^* образования	E_h нулевых колебаний	E_h при 0 К	$\lambda_{\text{макс}}$, нм, TD-DFT B3LYP	$\lambda_{\text{макс}}$, нм, ZINDO/S
6	-1170,94	$2,927 \cdot 10^{-5}$	-1170,93997	558	457
7	-1020,42	$7,026 \cdot 10^{-5}$	-1020,41993	527	459
8	-903,67	$7,659 \cdot 10^{-5}$	-903,66999	498	452

* E_h – энергия Хартри (Hartree).

Сравнение расчетных и экспериментальных величин $\lambda_{\text{макс}}$ поглощения показывает, что расчет полуэмпирическим методом ZINDO/S демонстрирует отклонение от экспериментальных величин на 10–15 нм в коротковолновую область. При использовании метода *ab initio* TD-DFT B3LYP отклонение составляет 30–70 нм в длинноволновую область. Это может быть обусловлено тем, что все вычисления проводились без учета сольватации.

Для оценки перспектив биологических исследований данных соединений в качестве противопаразитарных средств был проведен докинг структур **6–8** в активные центры трех ферментов, осуществляющих метаболизм жирных кислот возбудителей малярии *P. vivax* или *P. falciparum*. Данный класс ферментов был выбран, поскольку полученные NBD-производные являются карбокислотами (см. рисунок) и, следовательно, могут обладать сродством с ферментами метаболизма этого класса биомолекул. Результаты докинга приведены в табл. 5.

Таблица 5

Энергии связывания ($E_{\text{св}}$, ккал · моль⁻¹) соединений **6–8** в активных центрах ферментов метаболизма жирных кислот плазмодия*

Соединение	4C68	3AZA	4IGE
6	-10,0	-9,3	-3,8
7	-8,0	-11,2	-8,1
8	-7,0	-8,0	-4,5

*Коды базы PDB используемых структур: 4C68 – N-миристоилтрансфераза из *P. vivax*; 3AZA – β -гидроксиацил-ацилпереносящий белок дегидратаза FabZ из *P. falciparum*; 4IGE – еноил-ацилпереносящий белок редуктаза FabI из *P. falciparum*.

Результаты расчетов свидетельствуют о том, что производное глутаминовой кислоты **6** является наиболее аффинным лигандом для N-миристоилтрансферазы среди трех тестируемых структур, тогда как для фермента FabI оно продемонстрировало наименьшее сродство с активным центром. Производное пролина **7** обладает в среднем хорошим сродством со всеми рассматриваемыми структурами, особенно в отношении фермента FabZ.

Таким образом, синтезированы и выделены в чистом виде флуоресцентные NBD-производные аминокислот пролина, глицина, глутаминовой кислоты. Соединения охарактеризованы при помощи масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии и спектрофлуориметрии. Теоретически рассчитаны энергии образования и максимумы поглощения в видимой области, а также энергии связывания в активных центрах трех ферментов возбудителей малярии. Показано, что выбранные методы квантово-химических расчетов адекватно предсказывают экспериментальные максимумы поглощения таких производных. Результаты докинга указывают на перспективу экспериментального тестирования производных пролина и глутаминовой кислоты как ингибиторов ферментов метаболизма жирных кислот малярийного плазмодия – FabZ и N-миристоилтрансферазы.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант X15ИНД003).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Paul P., Chowdhury A., Das Talukdar A., Choudhury M. D. Homology modeling and molecular dynamics simulation of N-myristoyltransferase from *Plasmodium falciparum*: an insight into novel antimalarial drug design // *J. Mol. Model.* 2015. Vol. 21, issue 3. P. 37 [Paul P., Chowdhury A., Das Talukdar A., Choudhury M. D. Homology modeling and molecular dynamics simulation of N-myristoyltransferase from *Plasmodium falciparum*: an insight into novel antimalarial drug design. *J. Mol. Model.* 2015. Vol. 21, issue 3. P. 37 (in Engl.)].
2. Vaughan A. M., O'Neill M. T., Tarun A. S., Camargo N., Phuong T. M., Aly A. S., Cowman A. F., Kappe S. H. Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development // *Cell. Microbiol.* 2009. Vol. 11, issue 3. P. 506–520 [Vaughan A. M., O'Neill M. T., Tarun A. S., Camargo N., Phuong T. M., Aly A. S., Cowman A. F., Kappe S. H. Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. *Cell. Microbiol.* 2009. Vol. 11, issue 3. P. 506–520 (in Engl.)].
3. Federici L., Lo Sterzo C., Pezzola S., Di Matteo A., Scaloni F., Federici G., Caccuri A. M. Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione S-transferases // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69, issue 20. P. 8025–8034 [Federici L., Lo Sterzo C., Pezzola S., Di Matteo A., Scaloni F., Federici G., Caccuri A. M. Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 2009. Vol. 69, issue 20. P. 8025–8034 (in Engl.)].
4. Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013. Vol. 134. P. 59–66 [Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013. Vol. 134. P. 59–66 (in Engl.)].
5. Фалетров Я. В., Белевич Е. И., Стреха И. С., Костин Д. Г., Едимичева И. П., Слобожанина Е. И., Шкуматов В. М. Флуоресцентный стероид 22-NBD-холестерин – новый эффектор цитохрома P450scs // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2010. № 3. P. 39–42 [Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Strekha I. S., Kostsin D. G., Edimecheva I. P., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. Fluorescent steroid 22-NBD-cholesterol – a new effector cytochrome P450scs. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2010. No. 3. P. 39–42 (in Russ.)].
6. Faletrov Y. V., Zavadskaya V. A., Horetski M. S., Rudaya E. V., Frolova N. S., Shkumatov V. M. New NBD-labeled fluorescent steroids as molecular probes for mammalian steroid-converting enzymes: in silico evaluation // *Sviridov readings – 2015 : 7th Int. conf. on chemistry and chemical education (Minsk, 7–11 April 2015)*. Minsk, 2015. P. 130 [Faletrov Y. V., Zavadskaya V. A., Horetski M. S., Rudaya E. V., Frolova N. S., Shkumatov V. M. New NBD-labeled fluorescent steroids as molecular probes for mammalian steroid-converting enzymes: in silico evaluation. *Sviridov readings – 2015 : 7th Int. conf. on chemistry and chemical education (Minsk, 7–11 April 2015)*. Minsk, 2015. P. 130 (in Engl.)].
7. Kuru E., Tekkam S., Hall E., Brun Y. V., Van Nieuwenhze M. S. Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ // *Nat. Protoc.* 2015. Vol. 10, № 1. P. 33–52 [Kuru E., Tekkam S., Hall E., Brun Y. V., Van Nieuwenhze M. S. Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ. *Nat. Protoc.* 2015. Vol. 10, № 1. P. 33–52 (in Engl.)].
8. Матулис Вадим Э., Матулис Виталий Э., Ивашкевич О. А. Прикладная квантовая химия. Минск, 2007.

Статья поступила в редколлегию 08.02.2016.

Received by editorial board 08.02.2016.