

УДК 577.1+577.2+577.3.

## МАГНИФИКАМИД — НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР $\alpha$ -АМИЛАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

О. В. Синцова<sup>1,\*</sup>, Е. В. Лейченко<sup>1</sup>, И. Н. Гладких<sup>1</sup>,  
А. П. Калиновский<sup>1,2</sup>, М. М. Монастырня<sup>1</sup>, Э. П. Козловская<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН В.А. Стоником 31.01.2019 г.

Поступило 19.07.2019 г.

Получен рекомбинантный аналог пептида морской анемоны *Heteractis magnifica*, и изучены кинетические характеристики его взаимодействия с  $\alpha$ -амилазами млекопитающих. Магнификамид значительно эффективнее ингибирует  $\alpha$ -амилазы, чем лекарственный препарат акарбоза (Precose<sup>TM</sup> или Glucobay<sup>TM</sup>). Предполагается, что магнификамид может найти применение в качестве средства для предупреждения развития метаболического синдрома, коррекции нарушений обмена веществ и лечения сахарного диабета второго типа.

*Ключевые слова:* морская анемона, амилаза, диабет, *Heteractis magnifica*.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524894429-432>

Сахарный диабет второго типа развивается в результате снижения восприимчивости тканей к действию инсулина, которое часто возникает на фоне метаболических расстройств, вызванных переизбытком, несбалансированным рационом и отсутствием физической активности [1, 2]. Данное заболевание широко распространено среди населения планеты (около 8% взрослых). Кроме того, всё чаще фиксируются случаи заболевания среди детей и подростков [3, 4]. При лечении стадии преддиабета и ранних стадий сахарного диабета второго типа применяются пероральные сахароснижающие препараты. Одной из разновидностей таких препаратов являются ингибиторы панкреатической  $\alpha$ -амилазы, позволяющие эффективно контролировать поступление глюкозы в кровь из тонкого кишечника. Ингибирование слюнной  $\alpha$ -амилазы также оказывает положительный эффект, так как позволяет затормозить переваривание крахмала на первых этапах его поступления в организм [5–7]. Однако используемое в настоящее время в качестве фармакологического препарата низкомолекулярное соединение акарбоза (Precose<sup>TM</sup> или Glucobay<sup>TM</sup>) является слабым и малоселективным ингибитором панкреатической  $\alpha$ -амилазы, и его применение сопровождается побочными эффектами [7]. Лекарственные препараты

на основе белков и пептидов мало представлены на фармацевтическом рынке, однако интерес специалистов к таким соединениям возрастает вследствие их высокой селективности и эффективности в сочетании с относительной безопасностью и хорошей переносимостью [8]. Таким образом, поиск пептидных ингибиторов панкреатической  $\alpha$ -амилазы и изучение их свойств являются актуальной научной задачей, решение которой позволит создать новые пероральные сахароснижающие средства, обладающие большей эффективностью и меньшими побочными эффектами.

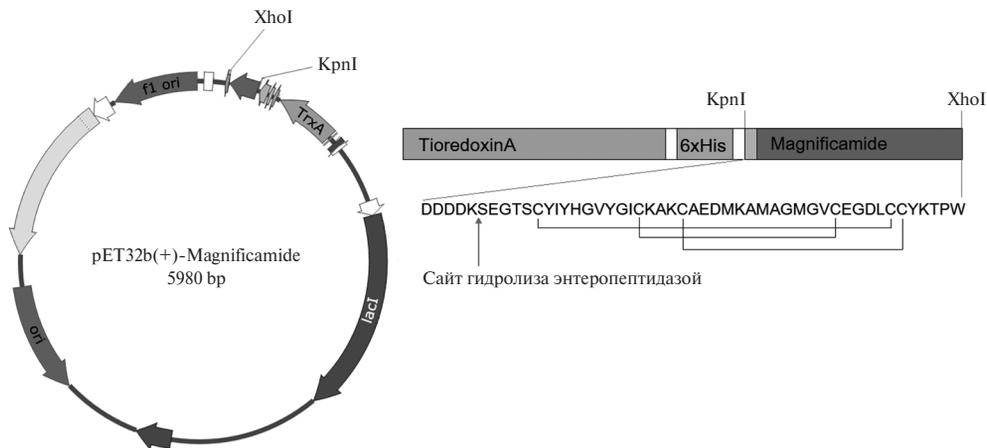
Недавно нами было установлено, что в яде морской анемоны *Heteractis magnifica* наряду с нейротоксинами,  $\alpha$ -пороформирующими токсинами и ингибиторами сериновых протеиназ Кунитц-типа широко представлены пептидные ингибиторы  $\alpha$ -амилаз. Один из них, магнификамид с молекулярной массой 4770 Да, был выделен и охарактеризован [9]. Аминокислотная последовательность пептида состоит из 44 а.о., а структура стабилизирована тремя дисульфидными связями (рис. 1) [9]. В настоящей работе с целью последующей оценки фармакологического потенциала магнификамида получен и охарактеризован его рекомбинантный аналог.

Для получения рекомбинантного магнификамида на основе его аминокислотной последовательности была выведена последовательность синтетического гена, оптимизированная с учётом частоты встречаемости кодонов для экспрессии в бактериальной

<sup>1</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской Академии наук, Владивосток

<sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

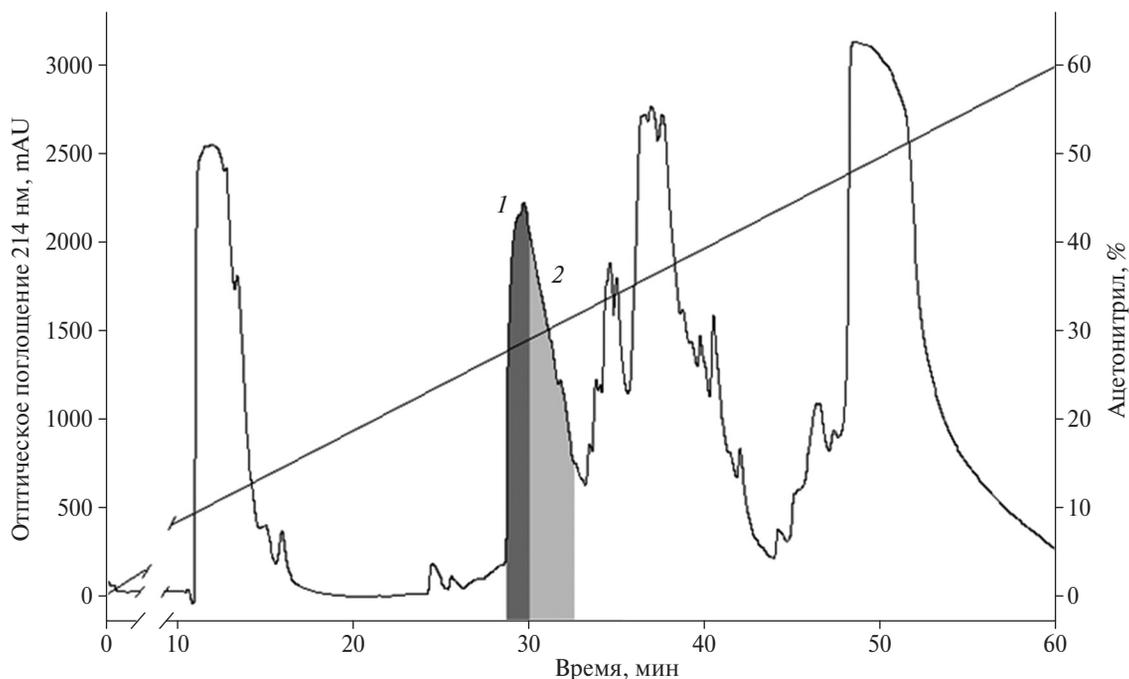
\*E-mail: [sintsova0@gmail.com](mailto:sintsova0@gmail.com)



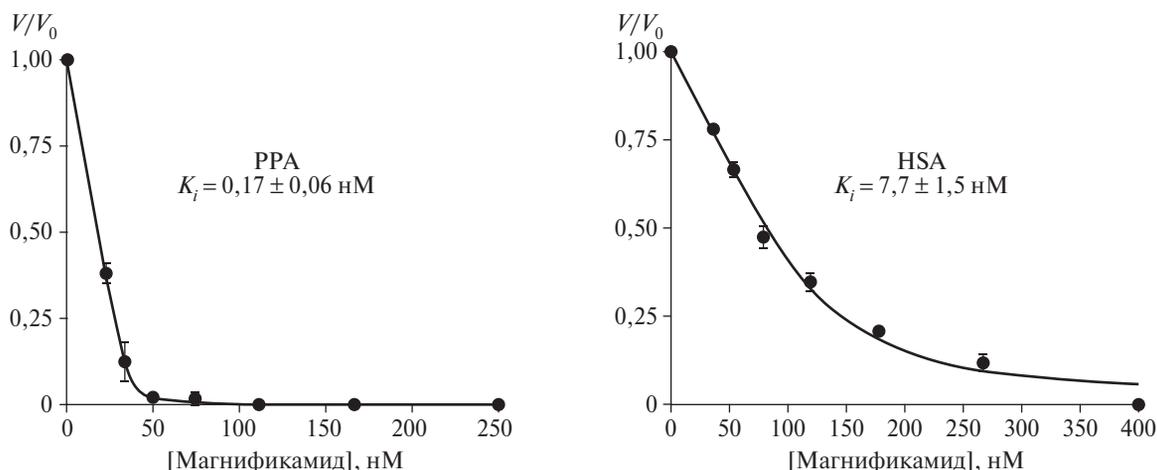
**Рис. 1.** а — экспрессионная конструкция рЕТ32b(+)-Magnificamide. Синтетический ген, кодирующий магнификамид и сайт гидролиза энтерокиназой, был клонирован в вектор рЕТ32b(+) по сайтам рестрикции KpnI и XhoI; б — схема гибридного белка Trx-Magnificamide и аминокислотная последовательность магнификамида (UniProtKB-S0NH71). Под последовательностью указана топология расположения дисульфидных связей.

системе (*Escherichia coli*). Синтетический ген был клонирован в вектор рЕТ32b(+) (“Novagen”, Германия) при помощи эндонуклеаз рестрикции KpnI и XhoI (“Thermo Fisher Scientific”, США) таким образом, чтобы целевой пептид экспрессировался в составе гибридного белка с тиоредоксином и полигистидиновой последовательностью (рис. 1). Полученной экспрессионной конструкцией трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (“Novagen”, Германия) и проводили гетерологичную экспрессию в оптимизированных условиях [10, 11].

Гибридный белок выделяли из клеточного лизата методом металл-аффинной хроматографии на носителе Ni-NTA-агароза (“Qiagen”, Нидерланды), затем обессоливали и обрабатывали энтеропептидазой (“NEB”, Великобритания). Полученную реакционную смесь разделяли методом ОФ ВЭЖХ (рис. 2). Пептиды, содержащиеся во фракциях 1 и 2, ингибировали свиную панкреатическую α-амилазу. Согласно масс-спектрометрическому анализу на приборе Ultraflex III TOF/TOF (“Bruker Daltonic”, Германия) рекомбинантный пептид с корректной



**Рис. 2.** Профиль элюции компонентов реакционной смеси, содержащей целевой пептид, методом ОФ ВЭЖХ на колонке Jupiter C4 (“Phenomenex Inc.”, США) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 0 до 60%) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты при скорости элюции 2 мл/мин. Серым цветом выделены фракции, ингибирующие свиную панкреатическую α-амилазу. Фракция 1 содержит зрелый рекомбинантный пептид (4770 Да).



**Рис. 3.** Кривые ингибирования  $\alpha$ -амилаз магнификамидом. Ферменты PPA (20 нМ) и HSA (100 нМ) инкубировали с магнификамидом 10 мин при 37 °С. Субстрат 2-хлор-4-нитрофенил- $\alpha$ -D-мальтоотриозид в концентрации 1 мМ для PPA и 3,3 мМ для HSA добавляли в реакционную смесь и выдерживали 10 мин при 37 °С, рН буферного раствора 7,1. Продукт реакции детектировали при 405 нм. Представленные данные являются результатом трёх независимых экспериментов.

укладкой пептидной цепи содержался во фракции 1, его масса была идентична массе нативного магнификамида и составила 4770 Да. Выход целевого пептида составил 4 мг/л клеточной культуры.

Для сравнения активности рекомбинантного магнификамида с активностью акарбозы, используемой в качестве фармацевтического препарата, были определены значения констант ингибирования  $K_i$  свиной панкреатической и человеческой слюнной  $\alpha$ -амилаз (PPA и HSA соответственно). Установлено, что магнификамид является прочно связывающимся ингибитором, а значения  $K_i$ , определённые по уравнению Моррисона [12] с использованием программного обеспечения GraphPad Prism Version 7.00, составили 0,17 нМ для PPA и 7,7 нМ для HSA (рис. 3). Таким образом, магнификамид является эффективным ингибитором  $\alpha$ -амилаз млекопитающих и обладает большим сродством к панкреатической  $\alpha$ -амилазе, чем к слюнной. Стоит отметить, что ингибиторная активность магнификамида значительно превосходит активность акарбозы, действующего вещества лекарственных препаратов Пресо-се<sup>TM</sup> и Глусобав<sup>TM</sup>, константы ингибирования  $K_i$  которой составляют 0,797 и 1,265 мкМ для PPA и HSA соответственно [13].

Разработан способ получения рекомбинантного магнификамида и установлено, что он является более эффективным ингибитором  $\alpha$ -амилаз млекопитающих, чем используемый в лечебной практике ингибитор акарбоза.

**Благодарности.** Молекулярные массы пептидов определены с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных молекулярных

исследований (ЯМР- и масс-спектрометрии) (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН).

**Источник финансирования.** Работа поддержана грантом РФФИ № 18–38–00389 (получение рекомбинантного пептида, определение  $K_i$ ).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alam U., Asghar O., Azmi S. // Handbook. Clin. Neurol. 2014. V. 126. P. 211–222.
2. Pandey A., Chawla S., Guchhait P. // IUBMB Life. 2015. V. 67. P. 506–513.
3. Aye T., Levitsky L.L. // Curr. Opin. Pediatr. 2003. V. 15. P. 411–415.
4. Temneanun O.R., Trandafir L.M., Purcarea M.R. // J. Med. Life. 2016. V. 9. P. 235–239.
5. Scheen A.J. // Drugs. 2003. V. 63. P. 933–951.
6. Chiasson J.-L., Josse R.G., Gomis R., et al. // Lancet. 2002. V. 359. P. 2072–2077.
7. Wu H., Liu J., Lou Q., et al. // Medicine (Baltimore). 2017. V. 96. P. 7533.
8. Fosgerau K., Hoffmann T. // Drug Discov. Today. 2015. V. 20. P. 122–128.
9. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., et al. // J. Proteomics. 2018. V. 173. P. 12–21.
10. Sintsova O.V., Monastyrnaya M.M., Pislyagin E.A., et al. // Russ. J. Bioorganic Chem. 2015. V. 41. P. 590–596.
11. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., et al. // Mar. Drugs. 2016. V. 14. P. 229.
12. Morrison J.F. // Biochim. Biophys. Acta-Enzymol. 1969. V. 185. P. 269–286.
13. Yoon S.H., Robyt J.F. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 1969–1980.

**MAGNIFICAMIDE IS A NEW EFFECTIVE  
MAMMALIAN  $\alpha$ -AMYLASE INHIBITOR**

**O. V. Sintsova<sup>1</sup>, E. V. Leychenko<sup>1</sup>, I. N. Gladkikh<sup>1</sup>,  
A. P. Kalinovskii<sup>1,2</sup>, M. M. Monastyrnaya<sup>1</sup>, E. P. Kozlovskaya<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch,  
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation*

<sup>2</sup>*School of Natural Sciences, Far Eastern Federal University,  
Vladivostok, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS V.A. Stonik January 31, 2019

Received July 19, 2019

Recombinant analog of sea anemone *Heteractis magnifica* peptide was obtained and kinetic parameters of its interaction with mammalian  $\alpha$ -amylases were determined. Magnificamide inhibits  $\alpha$ -amylases significantly stronger than a medical drug acarbose (Precose<sup>TM</sup> or Glucobay<sup>TM</sup>). Magnificamide is assumed to find application as a drug for prevention and treatment of metabolic disorders and type 2 diabetes mellitus.

*Keywords:* sea anemone, amylase, diabetes mellitus, *Heteractis magnifica*.