



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเตรียม immobilized เอนไซม์ pfDHFR เพื่อตรวจหา
สารยับยั้งเอนไซม์จากห้องสมุดเชิงรวม

โดย ดร. ชะวะนี ทองพันธ์ และคณะ

พฤษภาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเตรียม immobilized เอนไซม์ pfDHFR เพื่อตรวจหาสารยับยั้งเอนไซม์
จากห้องสมุดเชิงรวม

ผู้วิจัย

ดร. ชะวะณี ทองพันธ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) นางสาวสุพรรณิ ทวีชัย ดร. สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล
ศ. ดร. ยงยุทธ ยุทธวงศ์ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมโปรตีนลิแกนด์และชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์พันธุ
วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4880001

ชื่อโครงการ : การเตรียม immobilized เอนไซม์ pfDHFR เพื่อตรวจหาสารยับยั้งเอนไซม์
จากห้องสมุดเชิงรวม

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.ชวะณี ทองพันธุ์
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

E-mail address : chawanee@biotec.or.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

งานวิจัยนี้เป็นพัฒนาวิธีการ Immobilized เอนไซม์ pfDHFR บน solid support เพื่อใช้ในการคัดเลือกลำดับที่คุณสมบัติที่ดีในการจับเอนไซม์ pfDHFR จาก Combinatorial library โดยได้ทำการเตรียมเอนไซม์ pfDHFR ที่มีกรดอะมิโน cysteine ที่ปลาย C-terminal เพื่อนำไปตรึงบนเจล thiopropyl-Sepharose โดยเชื่อมด้วยพันธะ S-S ปริมาณของเอนไซม์ที่ติดบนเจลวัดได้ประมาณ 4-5 มิลลิกรัมต่อเจลแห้ง 1 กรัม โดย activity ของเอนไซม์ที่ติดบนเจล (immobilized enzyme) มีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระหลังจากที่ตัดออกจากเจลแล้ว นำ immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้นี้ไปใช้ในการคัดเลือกลำดับที่ยับยั้งที่ดีออกจากห้องสมุดเชิงรวม โดยอาศัยความสามารถที่ต่างกันในการจับตัวของเอนไซม์กับตัวยับยั้งแต่ละตัว เมื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของตัวยับยั้งที่ไม่ถูกเอนไซม์จับด้วยเครื่อง HPLC-MS ก็ทราบว่าตัวยับยั้งตัวใดที่มีความสามารถจับกับเอนไซม์ได้ดี โดยสามารถยืนยันได้จากผลการวิเคราะห์ตัวยับยั้งที่ถูกเอนไซม์จับไว้ ซึ่งจะถูกทำให้หลุดออกจากเอนไซม์โดยกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ (guanidine hydrochloride)

คำหลัก : Immobilized เอนไซม์, พลาสมิเดียม ฟัลซิพาร์ม ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส, ห้องสมุดเชิงรวม, ตัวยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส

Abstract

Project Code : TRG4880001

Project Title : Immobilization of pfDHFR for the Selection of Tight-Binding Inhibitors from Combinatorial Library

Investigator : Chawanee Thongpanchang, Ph.D.
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

E-mail Address : chawanee@biotec.or.th

Project Period : 2 Years

In this study, the method for immobilization of pfDHFRs onto the solid support has been developed for the selection of tight-binding inhibitors from combinatorial library. pfDHFRs with cysteine residue at the C-terminal have been prepared in order to immobilize to a thiopropyl-Sepharose gel via S-S linkage. The amount of immobilized DHFRs was estimated to be 4-5 mg/g of dried gel, and the activities of the bound DHFRs were comparable to that of the free enzymes. The prepared immobilized enzyme has been used for the selection of tight-binding inhibitors from the combinatorial library, based on the affinities of each inhibitor with the enzyme. Free inhibitors were then identified and analyzed quantitatively by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and the components with high binding affinity of the library could thus be realized. Results could be confirmed by quantitative analysis of the bound inhibitors released from the enzyme by guanidine hydrochloride treatment.

Keywords : Immobilized enzyme, *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase, Combinatorial library, DHFR inhibitors

Executive Summary

ได้ทำการเตรียมเอนไซม์ double mutant pfDHFR (C59RS108N) 2 ชนิด ชนิดแรก C-terminal ต่อกับกรดอะมิโนอีก 8 ตัวของ junction region เพื่อให้มีปลายที่เป็น cysteine (NCR1) และอีกชนิดหนึ่งจะเปลี่ยนกรดอะมิโน 3 ตัว ก่อนที่จะถึงปลาย cysteine เป็น glycine (NGCR3) โดยได้ต่อเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้เข้ากับเจล Thiopropyl Sepharose 6B ด้วยพันธะ S-S พบว่าปริมาณของเอนไซม์ NCR1 ที่เกาะบน solid support คือ 5 mg ต่อ 1 g ของ solid support และมี specific activity คือ 27 ส่วนปริมาณของเอนไซม์ NGCR3 ที่เกาะบน solid support คือ 4 mg ต่อ 1 g ของ solid support และมี specific activity คือ 21 ซึ่งใกล้เคียงกับ free เอนไซม์ ที่ได้จากการตัดเอนไซม์ออกจาก solid support คือ 40.7 และ 38.3 สำหรับเอนไซม์ NCR1 และ NGCR3 ตามลำดับ แสดงว่า side chain ของกรดอะมิโนที่ติดกับพันธะ s-s ที่ต่อกับ solid support ไม่มีผลกับการยึดติดและ activity ของเอนไซม์ ดังนั้นจึงเลือกเอนไซม์ NCR1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีการปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนใดๆไปใช้ในการคัดเลือกตัวยับยั้งเอนไซม์จากห้องสมุดเชิงรวม

เพื่อทดสอบว่า immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้สามารถคัดเลือกสารจากของผสมระหว่างตัวยับยั้งได้ตามทฤษฎี จึงได้นำเอนไซม์ที่เตรียมได้ (NCR1) มาไทเทรตกับสารละลายผสมของ ฟิริเมทามีน ไตรเมทโทพริม และ โซโคลกัวนิล ที่มีจำนวนโมลที่เท่าๆกัน โดยมีอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้งต่างๆกัน คือ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 3.75 แล้วหาปริมาณตัวยับยั้งที่ไม่ได้ถูกจับกับเอนไซม์โดยใช้ HPLC ซึ่งก็พบว่าเอนไซม์สามารถเลือกจับตัวยับยั้งได้ตามทฤษฎี คือ ถ้าเอนไซม์มีปริมาณน้อยกว่าตัวยับยั้งก็จะเลือกจับ โซโคลกัวนิล ซึ่งมีค่า K_i ต่ำที่สุดก่อน (42.6 nM) และเมื่อเอนไซม์มีปริมาณมากขึ้น ก็จะเลือกจับ ฟิริเมทามีน และ ไตรเมทโทพริม ซึ่งมีค่า K_i สูงขึ้นตามลำดับ (53.9 และ 242.1 nM) นอกจากนี้เมื่อใช้ฟิริเมทามีนเป็น reference ยังสามารถคำนวณหา ค่า K_i ของ โซโคลกัวนิล และ ไตรเมทโทพริม ได้ใกล้เคียงกับค่าที่วัดโดยวิธีปกติคือ 33.3 และ 270.9 nM

นำ immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้นี้ไปใช้คัดเลือกตัวยับยั้งจากห้องสมุดเชิงรวมที่เตรียมขึ้นทั้ง 2 กลุ่ม จาก library แรกที่เตรียมโดยการนำสารที่สังเคราะห์และวัดค่า K_i ที่ละตัวมาผสมกันพบว่า %binding ของสารกับเอนไซม์จะแปรผันตามค่า K_i ของสาร และค่า K_i ที่คำนวณได้ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการวัดโดยวิธีตามปกติ และจากทั้ง 2 library นี้จะเห็นว่าตัวยับยั้งในกลุ่มที่มีความยืดหยุ่นนี้มีค่า K_i ที่ต่ำกว่าสารที่ไม่มีความยืดหยุ่นเช่น ฟิริเมทามีนและโซโคลกัวนิล ดังนั้นสารในกลุ่มนี้จึงมีความน่าสนใจและมีศักยภาพที่น่าจะศึกษาเพื่อเป็นยาต้านมาลาเรียสำหรับเชื้อที่ดื้อยาต่อไป

เนื้อหาบทวิจัย

มาลาเรียเป็นโรคที่มีความสำคัญมากโรคหนึ่งของประเทศในแถบเขตร้อนรวมทั้งในประเทศไทยด้วย เชื้อมาลาเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนนั้นมี 4 สายพันธุ์ คือ *falciparum*, *vivax*, *ovale* และ *malrae* ชนิด *falciparum*, *vivax* นั้นพบได้มากที่สุด แต่ชนิด *falciparum* จะรุนแรงที่สุดและทำให้ถึงตายได้ ส่วน 2 ชนิด หลังนี้พบได้ค่อนข้างน้อยและไม่รุนแรงมากนัก ปัญหาของโรคมาลาเรียก็คือ เชื้อมาลาเรียเกิดมีการกลายพันธุ์ขึ้นหลายชนิดทำให้เชื้อดื้อยาที่ใช้ในการรักษา และการดื้อยาของเชื้อก็ได้ขยายวงกว้างขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องรีบพัฒนาหายาต้านมาลาเรียตัวใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้กับเชื้อที่ดื้อยาเหล่านี้ ยาต้านมาลาเรียแต่ละชนิดจะมีเป้าหมายในการทำลายเชื้อมาลาเรียที่แตกต่างกัน แต่เป้าหมายหนึ่งที่มีผู้ศึกษาค้นคว้ากันมานานก็คือ เอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส (DHFR) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงอยู่ของเชื้อมาลาเรีย เนื่องจากมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ของ Thymidylate ที่มีความจำเป็นในการสร้าง DNA ดังนั้นหากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ก็จะทำให้เชื้อมาลาเรียตายด้วยเช่นกัน เอนไซม์ DHFR นี้จึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการพัฒนายาต้านมาลาเรีย โดยสารในกลุ่มนี้จะเรียกว่า แอนติโฟเลต (antifolate)

แต่เดิมการพัฒนาหาตัวใหม่ๆ จะใช้วิธีการสังเคราะห์และทดสอบสารทีละตัวๆ ซึ่งเป็นวิธีการที่สิ้นเปลืองแรงงานและเวลาเป็นอย่างมาก แต่ไม่นานมานี้ได้มีการนำเทคนิคใหม่ที่เรียกว่า “Combinatorial Synthesis” มาใช้ วิธีการนี้เป็นการสังเคราะห์ที่ทำให้ได้สารที่มีโครงสร้างหลากหลายในคราวเดียวกันและได้กลุ่มของสารที่เรียกว่า “Library” อย่างไรก็ตามปัญหาของวิธีการนี้คือการคัดเลือก (screen) เอาสารที่มีฤทธิ์ที่ดีออกจากกลุ่มของสารที่เตรียมได้ (library)

ในงานวิจัยที่ผ่านมาของกลุ่มของผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาหาสารต้านมาลาเรียในกลุ่มของสารพวก แอนติโฟเลตของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (pfDHFR) โดยอาศัยความเข้าใจเกี่ยวกับการจับตัวกันของ ตัวยับยั้งกับเอนไซม์ในบริเวณ active site เพื่อปรับปรุงโครงสร้างของตัวยับยั้งให้สามารถจับกับเอนไซม์ที่กลายพันธุ์ได้ดีขึ้น และได้นำเทคนิค Combinatorial Synthesis มาใช้ในการสังเคราะห์ด้วย ซึ่งกลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.ยงยุทธ ได้พัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกลำดับที่มีคุณสมบัติที่ดีในการจับและยับยั้งเอนไซม์ pfDHFR ออกจากกลุ่มของสารที่เตรียมได้ (Library) โดยนำเอนไซม์ DHFR ในรูปของเอนไซม์อิสระมาทำการคัดเลือก สารที่มีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ได้ดีก็就会被เอนไซม์จับไว้ ส่วนสารที่ไม่ถูกเอนไซม์จับก็จะถูกแยกออกไปโดยวิธี ultrafiltration และทำการตรวจวัดปริมาณสารที่เหลือจาก filtrate และสารที่ถูกเอนไซม์จับไว้โดยใช้เทคนิค HPLC-MS แต่เนื่องจากวิธีนี้ไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการ immobilized เอนไซม์ pfDHFR บน solid support เพื่อนำมาใช้เป็นตัวคัดเลือกลำดับจาก combinatorial library โดยวิธีการนี้จะทำในรูปของ solid phase และจะทำให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ในการคัดเลือกครั้งต่อไปได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำ immobilized เอนไซม์นี้ไปใช้ในการทดสอบความจำเพาะของความสามารถในการจับของตัวยับยั้งกับเอนไซม์ DHFR ระหว่างของเชื้อมาลาเรียและของคนอีกด้วย

1. การเตรียมเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์เข้ากับ solid support นั้นต้องคำนึงถึงความยืดหยุ่นของเอนไซม์ในช่วงก่อนที่จะถึง solid support เพื่อมิให้สูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเอนไซม์ไป ดังนั้นในการเตรียมเอนไซม์จึงต้องเพิ่มตัวเชื่อมคือกรดอะมิโนบางตัวเข้าไปที่ปลายเพื่อให้เกิดความยืดหยุ่นเพียงพอ และให้มีปลาย C-terminal เป็น cysteine เพื่อให้มีกลุ่ม -SH เพื่อใช้ในการต่อเข้ากับ solid support และเนื่องจาก pfDHFR เป็น bifunctional enzyme ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ ไทมิโดเลส ซินเทส ด้วยส่วนที่เรียกว่า junction region ดังนั้นเพื่อคงธรรมชาติเดิมของเอนไซม์ไว้จึงเริ่มต้นด้วยการออกแบบเอนไซม์ที่ต่อด้วยกรดอะมิโนในส่วน of junction region โดยเตรียมเอนไซม์ double mutant pfDHFR ขึ้นมา 2 ชนิดคือ ชนิดแรก (NCR1) ปลายของยีนจะต่อด้วยกรดอะมิโนในส่วน of junction region 8 ตัว ซึ่งตัวที่ 8 จะเป็น cysteine พอดี ส่วนอีกชนิดหนึ่ง (NGCR3) จะเปลี่ยนกรดอะมิโน 3 ตัวก่อนถึง cysteine ให้เป็น glycine เพื่อลดความเกะกะของ side chain การโคลนยีนของเอนไซม์ pfDHFR จะใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) แล้วนำชิ้นยีนที่ได้โคลนเข้า pET-17b plasmid และนำเข้าสู่ E.coli (BL21)DE3pLysS เพื่อทำการผลิตเอนไซม์ให้ได้จำนวนมากๆ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี methotrexate-affinity โครมาโตกราฟี [Sirawaraporn W, Prapunwattana P, Sirawaraporn R, Yuthavong Y, Santi DV. *The dihydrofolate reductase domain of Plasmodium falciparum thymidylate synthase-dihydrofolate reductase: gene synthesis, expression, and anti-folate resistant mutants. J Biol Chem* 1993; 268: 21637-21644.] เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์จะมีการเติมตัวรีดิวซ์ คือ dithiothreitol (DTT) จึงต้องทำการแยกเอาตัวรีดิวซ์ออกก่อนที่จะนำไปต่อกับ solid support โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G25 อีกครั้งหนึ่ง เพื่อไม่ให้ DTT ไปรีดิวซ์พันธะ s-s ระหว่างเอนไซม์กับ solid support

2. ทดสอบ activity ของเอนไซม์ที่เตรียมได้

โดยทดสอบกับ substrate ซึ่งก็คือไดไฮโดรโฟเลต โดยมี NADPH เป็น co-factor แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงทาง kinetic ของ NADPH ด้วย UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 nM โดยในปฏิกิริยา จะประกอบด้วย 100 mM H₂folate, 100 mM NADPH, 50 mM TES, pH 7.0, 75 mM β-mercaptoethanol, 1 mg/ml bovine serum albumin and ~0.005-0.01 Unit of purified enzyme

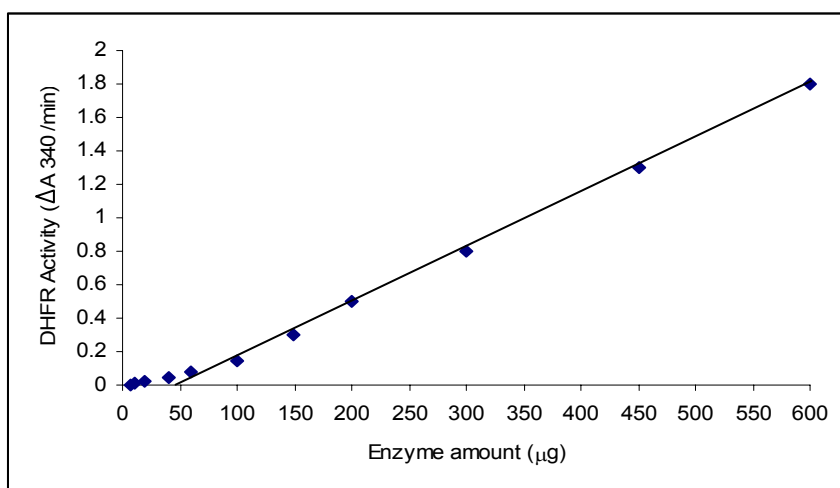
- Specific activity ของเอนไซม์ NCR1 คือ 71.8
- Specific activity ของเอนไซม์ NGCR3 คือ 80.3

เอนไซม์ที่เตรียมได้ทั้ง 2 ชนิดนี้ มี Specific activity ใกล้เคียงกับเอนไซม์ double mutant ที่ไม่ได้ผ่านการตัดแปลงใดๆ (90.1) แสดงว่ากรดอะมิโนที่ต่อเข้าไปที่ปลายยีนและ DTT ที่กำจัดออกไปไม่ทำให้คุณสมบัติการเป็นเอนไซม์เปลี่ยนแปลงมากนัก ดังนั้นจึงนำเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ไปใช้ในการตรึงกับ solid support

3. Immobilized เอนไซม์ pfDHFR บน solid support

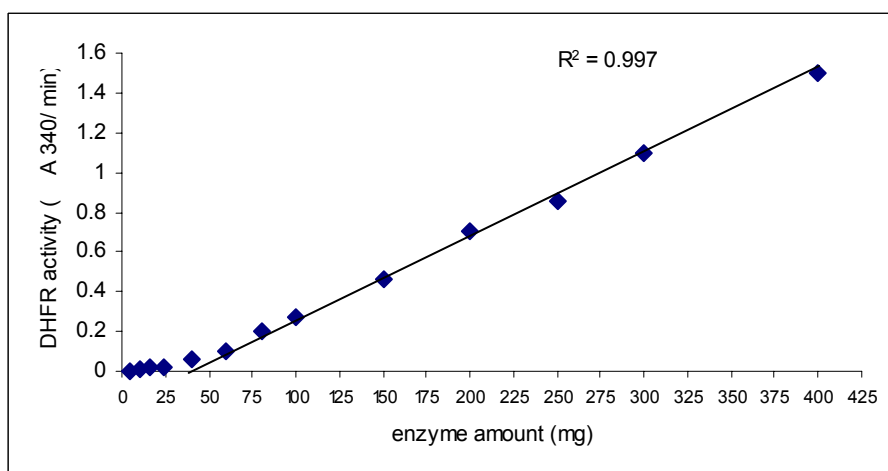
Immobilized เอนไซม์ pfDHFR ที่โคลนได้โดยใช้ Thiopropyl Sepharose 6B เป็น solid support ซึ่งจะต่อเชื่อมกันด้วยพันธะ S-S โดยการ incubate เอนไซม์กับ Thiopropyl sepharose 6B ใน 20 mM phosphate buffer pH7 ที่ประกอบด้วย 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 20% glycerol โดยบัฟเฟอร์นี้จะต้องกำจัด O_2 ออกด้วยการ bubble N_2 ลงไปก่อนการใช้งานทุกครั้ง จากนั้นจึงวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ที่เกาะบน solid support ด้วยวิธี titration-based โดย incubated solid support (10 mg) กับเอนไซม์ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน แล้ว plot กราฟระหว่าง activity ของเอนไซม์ใน solution phase (เอนไซม์ที่ไม่จับกับ solid phase) กับปริมาณของเอนไซม์ที่ใส่ลงไป ซึ่งเมื่อเอนไซม์ถึงจุดอิ่มตัวกราฟระหว่าง activity และปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรง เมื่อลากเส้นตรงผ่านแกนปริมาณเอนไซม์ก็จะได้ปริมาณของเอนไซม์ที่เกาะบน solid support

- วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ NCR1 ที่เกาะบน solid phase ได้ดังกราฟ



พบว่าปริมาณของเอนไซม์ NCR1 ที่ยึดติดบน solid support คือ 5 mg ต่อ 1 g ของ solid support

- วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ NGCR3 ที่เกาะบน solid phase ได้ดังกราฟ



พบว่าปริมาณของเอนไซม์ NCR1 ที่ยึดติดบน solid support คือ 4 mg ต่อ 1 g ของ solid support

4. ทดสอบ activity ของ immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้

โดยวัดการเปลี่ยนแปลงทาง kinetic ของ NADPH ด้วย UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 nm พบว่า

- Specific activity ของ immobilized เอนไซม์ NCR1 คือ 27
- Specific activity ของ immobilized เอนไซม์ NGCR3 คือ 21

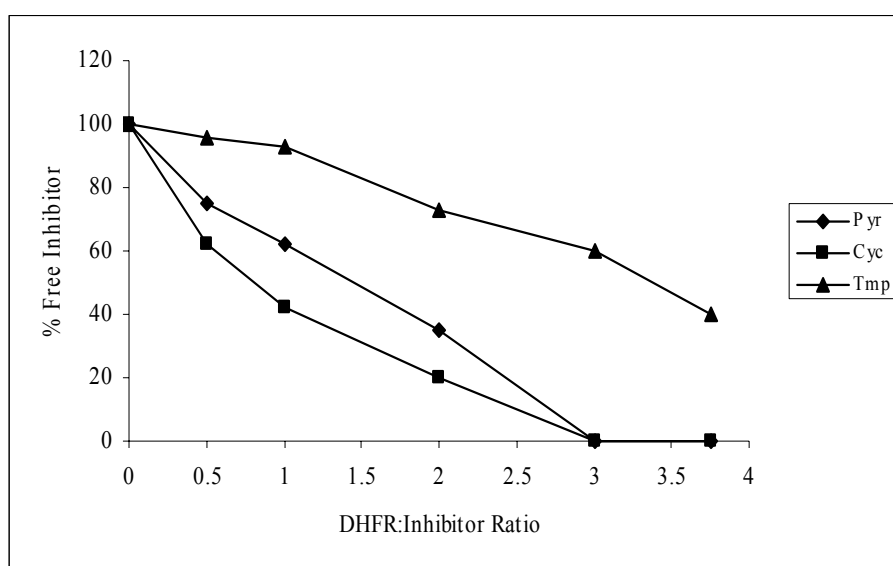
นอกจากนี้ยังได้ทำการตัดเอนไซม์จาก solid support โดยใช้ β -mercaptoethanol และวัด activity ของ free เอนไซม์ พบว่า

- Specific activity ของ free เอนไซม์ NCR1 คือ 40.7
- Specific activity ของ free เอนไซม์ NGCR3 คือ 38.3

ซึ่งค่า activity ของ free เอนไซม์ใกล้เคียงกับ activity ของ immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้ นอกจากนี้ปริมาณของเอนไซม์ที่ยึดติดบน solid support และ activity ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่า side chain ของกรดอะมิโนที่ติดกับพันธะ s-s ที่ต่อกับ solid support ไม่มีผลกับการยึดติดและ activity ของเอนไซม์ ดังนั้นจึงเลือกเอนไซม์ NCR1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีการปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนใดๆไปใช้ในการคัดเลือกตัวยับยั้งเอนไซม์จากห้องสมุดเชิงรวม

5. ทดสอบเทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกรายการจากห้องสมุดเชิงรวมของ immobilized เอนไซม์

เพื่อทดสอบว่า immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้สามารถคัดเลือกรายการจากของผสมระหว่างตัวยับยั้งได้ตามทฤษฎี จึงได้นำเอนไซม์ที่เตรียมได้ (NCR1) มาไทเทรตกับสารละลายผสมของ ไพริเมตามีน (Pyr) ไตรเมโทพริม (Tmp) และ ไซโคลกัวนิล (Cyc) ที่มีจำนวนโมลที่เท่าๆกัน โดยมีอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้งต่างๆกัน คือ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 3.75 แล้วหาปริมาณตัวยับยั้งที่ไม่ได้ถูกจับกับเอนไซม์โดยใช้ HPLC ซึ่งได้ผลดังรูปด้านล่าง



จะเห็นว่าเอนไซม์สามารถเลือกจับตัวยับยั้งได้ตามทฤษฎี คือ ถ้าเอนไซม์มีปริมาณน้อยกว่าตัวยับยั้งก็จะเลือกจับ โซโคโลกัวนิล (Cyc) ซึ่งมีค่า K_i ต่ำที่สุดก่อน (42.6 nM) และเมื่อเอนไซม์มีปริมาณมากขึ้น ก็จะเลือกจับ ฟิริเมทามีน (Pyr) และ ไตรเมโทพริม (Tmp) ซึ่งมีค่า K_i สูงขึ้นตามลำดับ (53.9 และ 242.1 nM) นอกจากนี้ จากสมการที่ (1) และข้อมูลที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้งเป็น 2 โดยใช้ ฟิริเมทามีนเป็น reference จะสามารถคำนวณหาค่า K_i ของ โซโคโลกัวนิล และ ไตรเมโทพริม ได้ใกล้เคียงกับค่าที่วัดโดยวิธีปกติคือ 33.3 และ 270.9 nM

$$\text{ค่า } K_i \text{ ของตัวยับยั้ง } i, K_{i_i} = \frac{[I_i] \cdot [EI_{ref}] \cdot K_{i_{ref}}}{[EI_i] [I_{ref}]} \quad (1)$$

$[I_i]$, $[EI_i]$, $[I_{ref}]$ และ $[EI_{ref}]$ คือความเข้มข้นของตัวยับยั้ง i , เอนไซม์-ตัวยับยั้ง complex, reference และ เอนไซม์-reference complex

โดยที่

$$[I_i] = \frac{\text{Peak area of } I_i \text{ in the test} \cdot I_{ti}}{\text{Peak area of } I_i \text{ in control}}$$

$$[EI_i] = I_{ti} - [I_i]$$

I_{ti} = the total concentration of inhibitor i

$$[I_{ref}] = \frac{\text{Peak area of } I_{ref} \text{ in the test} \cdot I_{tref}}{\text{Peak area of } I_{ref} \text{ in control}}$$

$$[EI_{ref}] = I_{tref} - [I_{ref}]$$

I_{tref} = the total concentration of reference

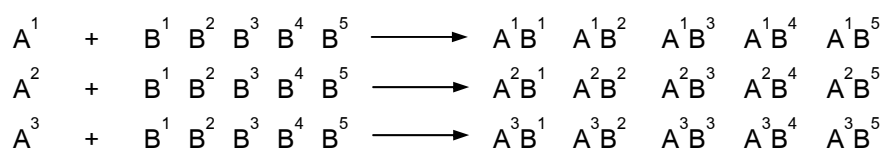
5. เตรียม library ของสารต้านมาลาเรียในกลุ่มแอนติโฟเลต

- library 1 เนื่องจากการดื้อยาฟิริเมทามีนของเชื้อมาลาเรียเกิดจากการที่ C1 อะตอมมีความเกะกะและชนกับ side chain ที่ยาวขึ้นของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 108 ของเชื้อที่ดื้อยา (เปลี่ยนจาก Ser เป็น Asn) เพื่อหลีกเลี่ยงการชนกันนี้จึงได้สังเคราะห์สารในกลุ่ม pyrimidine และ triazine ที่มีความยืดหยุ่นจำนวน 9 ตัว โดยวัดค่า K_i ของสารแต่ละตัว แล้วนำมาผสมรวมกับฟิริเมทามีนซึ่งจะใช้เป็น reference ได้เป็น Library 1 โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุลและค่า K_i ของสารใน library 1

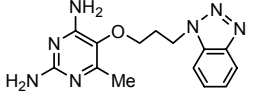
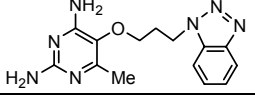
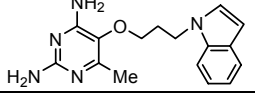
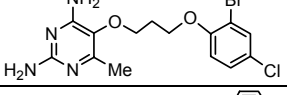
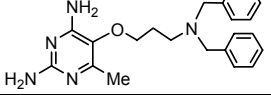
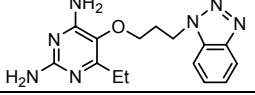
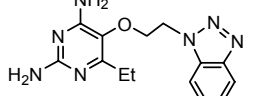
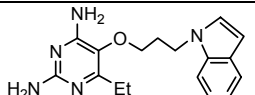
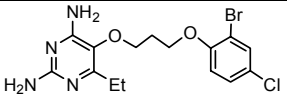
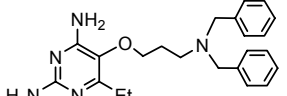
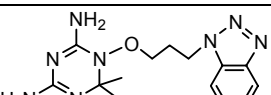
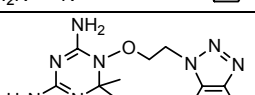
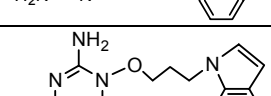
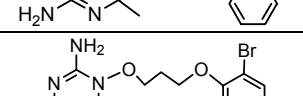
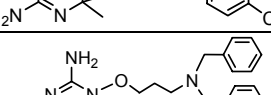
สาร	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล	K_i (nM)
1		248.71	53.9
2		335.83	2.77
3		321.76	38.5
4		311.34	1.45
5		390.28	1.62
6		376.89	1.81
7		495.89	0.78
8		558.39	6.64
9		441.47	4.20
10		552.44	9.2

- library 2 ใช้วิธี การสังเคราะห์โดย combinatorial synthesis แบบ split and mix คือจะแยกทำปฏิกิริยาย่อย 3 ปฏิกิริยา ดังแผนภาพ



และเมื่อนำมารวมกันก็จะได้สารทั้งหมด 15 ตัว ซึ่งจากการทดสอบโดยการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย mass spectrometer พบว่าสามารถสังเคราะห์สารได้ทั้ง 15 ตัวดังตารางที่2

ตารางที่ 2 โครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุลของสารใน library 2

สาร	โครงสร้าง	น้ำหนักโมเลกุล
1		299
2		285
3		297
4		381.4
5		377
6		313
7		299
8		311
9		401.4
10		391
11		316
12		302
13		314
14		404.4
15		394

6. นำเอนไซม์ที่เตรียมได้ไปคัดเลือกสารจาก Combinatorial Library

- นำสารจาก library 1 ไปคัดเลือกโดย immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้ โดยมีอัตราส่วนระหว่างปริมาณสารกับปริมาณเอนไซม์เป็น 1.6 ต่อ 1 หลังจาก incubate สารใน column ที่บรรจุด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 5 นาที จึงนำสารที่ไม่ถูกจับด้วยเอนไซม์ (unbound) ไปวิเคราะห์โดยใช้ HPLC-MS ส่วนสารที่ถูกจับด้วยเอนไซม์ (bound) จะถูกชะออกด้วย guanidine HCl แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS เช่นเดียวกัน โดยสามารถคำนวณหา %binding ของสารที่ได้จากส่วนที่ไม่ถูกจับและจากส่วนที่ถูกจับด้วยเอนไซม์ได้จากสมการที่ 2 และ 3 และ คำนวณหาค่า K_i ของตัวยับยั้งแต่ละตัวได้จากสมการที่ 1 ดังตารางที่ 3

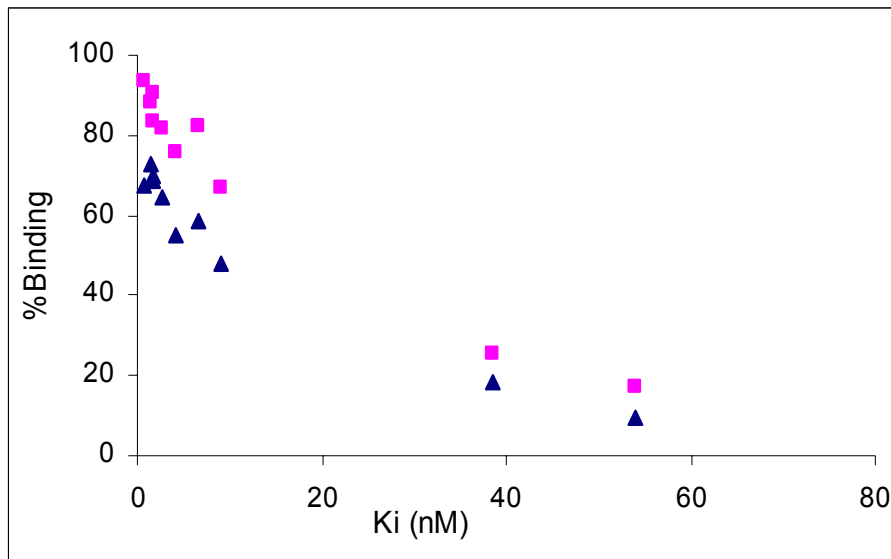
ตารางที่ 3

สาร	Retention time (นาที)	% binding		K_i (nM)	
		from bound inhibitor	from unbound inhibitor	measured	calculated
2	30.5	64.35	81.55	2.77	2.49
6	31.1	70.03	83.35	1.81	2.02
3	32.0	18.21	25.17	38.5	32.7
1	40.4	9.64	16.93	53.9	-
4	51.7	73.04	88.20	1.45	1.37
5	55.5	68.40	90.50	1.62	1.15
7	58.7	67.41	93.41	0.78	0.75
9	61.8	54.95	75.54	4.20	3.56
8	63.5	58.72	82.35	6.64	5.25
10	74.9	47.87	66.69	9.20	8.12

$$\% \text{ Binding (from unbound)} = 100 \left[1 - \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารที่ทดสอบ}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ control}} \right] \quad (2)$$

$$\% \text{ Binding (from bound)} = 100 \left[\frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารที่ทดสอบ}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ control}} \right] \quad (3)$$

เมื่อ plot กราฟระหว่างค่า %binding กับค่า K_i จะได้ผลดังรูป



■ = %binding ของสารที่ได้จากส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยเอนไซม์
▲ = %binding ของสารที่ได้จากส่วนที่ถูกจับด้วยเอนไซม์

จากการทดลองพบว่า %binding ของสารกับเอนไซม์จะแปรผันตามค่า K_i ของสาร และค่า K_i ที่คำนวณได้ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการวัดโดยวิธีตามปกติ แสดงว่าเราสามารถนำ immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้ไปใช้ในการคัดเลือกรหัสด้วยยั้งจาก combinatorial library และสามารถประมาณค่า K_i โดยการคำนวณได้

- นำสารจาก library 2 ไปคัดเลือกรหัสด้วย immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้ โดยมีอัตราส่วนระหว่างปริมาณสารกับปริมาณเอนไซม์เป็น 1.6 ต่อ 1 หลังจาก incubate สารใน column ที่บรรจุด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 5 นาที จึงนำสารที่ไม่ถูกจับด้วยเอนไซม์ (unbound) ไปวิเคราะห์โดยใช้ HPLC-MS ส่วนสารที่ถูกจับด้วยเอนไซม์ (bound) จะถูกชะออกด้วย guanidine HCl แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS เช่นเดียวกัน เมื่อคำนวณหา ค่า K_i จากสมการที่ 1 โดยมีไซโคลกัวนิลเป็น reference และ %binding จากสมการที่ 2 และ 3 จะได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4

สาร	Retention time	% Binding		Calculated K_i double mutant (nM)
		from bound inhibitors	from unbound inhibitors	
Cyc	15.1	13.01	14.75	42.60 ^a
IId	18.6	41.17	39.63	13.84
IIId	28.3	70.92	76.67	1.74
IIc	34.0	74.58	82.68	2.77
Ic	35.9	78.48	83.54	1.55
IIc	45.0	73.10	77.58	1.59
Ie	50.7	67.35	73.07	2.88
IIe	52.7	50.69	59.29	5.05
IId	64.5	81.15	84.56	1.87
Ile	70.7	60.26	65.61	5.01
IIId	74.0	75.10	79.47	1.45
Ib	76.2	78.85	82.30	1.24
Ila	85.8	76.95	78.34	1.50
Ia	87.0	84.12	88.37	0.82
IIa	91.5	34.88	37.21	13.84
Id	95.5	25.96	27.89	18.00

^a ค่า K_i ได้จากการวัดโดยวิธีตามปกติ

จะเห็นว่าสารในกลุ่มที่มีความยืดหยุ่นนี้จะมีค่า K_i ที่ต่ำกว่าสารที่ไม่มีความยืดหยุ่นเช่น ฟิริเมทามีนและไซโคลกัวนิล ดังนั้นสารในกลุ่มนี้จึงมีความน่าสนใจและมีศักยภาพที่น่าจะศึกษาเพื่อเป็นยาต้านมาลาเรียสำหรับเชื้อที่ดื้อยาต่อไป

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Thongpanchang, C.; Taweechai, S.; Kamchonwongpaisan, S.; Yuthavong, Y.; Thebtaranonth, Y. Immobilization of Malarial (*Plasmodium falciparum*) Dihydrofolate Reductase for the Selection of Tight-Binding Inhibitors from Combinatorial Library. *Submitted for publication in Analytical Chemistry* (2 Feb 2007)

ภาคผนวก

Immobilization of Malarial (*Plasmodium falciparum*) Dihydrofolate Reductase for the Selection of Tight- Binding Inhibitors from Combinatorial Library

Chawanee Thongpanchang, Supanee Taweekhai, Sumalee Kamchonwongpaisan, Yongyuth
Yuthavong and Yodhathai Thebtaranonth*

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology
Development Agency, 113 Thailand Science Park, Pahonyothin Road, Klong 1, Klongluang,
Pathumtani 12120, Thailand

* To whom correspondence should be addressed. Tel. : 662-5646700 Ext. 3559 Fax. : 662-5646632.

E-mail : chawanee@biotec.or.th

ABSTRACT

A simple procedure for selection of tight-binding inhibitors of mutant dihydrofolate reductases from *Plasmodium falciparum* (PfDHFRs) based on preferential binding to the enzyme immobilized on a Sepharose column has been described. PfDHFRs with cysteine residue at the C-terminal have been prepared in order to immobilize to a thiopropyl-Sepharose gel *via* S-S linkage. The amount of immobilized DHFRs was estimated to be 4-5 mg/g of dried gel, and the activities of bound DHFRs were comparable to that of free enzymes. The prepared immobilized enzyme has been used for the selection of tight-binding inhibitors from combinatorial libraries, based on the affinities of each inhibitor with the enzyme. Free inhibitors were then identified and analyzed quantitatively by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and the components with high binding affinity of the library could thus be realized. Results could be confirmed by quantitative analysis of the bound inhibitors released from the enzyme by guanidine hydrochloride treatment.

INTRODUCTION

Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase- thymidylate synthase (PfDHFR-TS) is a validated target of antifolate antimalarial drugs^{1, 2} such as pyrimethamine (Pry) and cycloguanil (Cyc), which are commonly used clinically for the treatment of malaria infection. Since the emergence of the resistant strain of malaria parasites to these inhibitors became widespread, there has been an urgent need to search for new drugs to combat the resistant malaria. Molecular mechanism for resistance to PfDHFR inhibitors has been shown to be due to point mutation at various sites of the parasite gene sequence, leading to the decrease in binding affinity of inhibitor to the enzyme. Mutation of one or more residues at amino acid positions 16, 51, 59, 108 and 164 of PfDHFR were identified to be involved in antifolate resistance.³⁻⁶ Based on modeling of wild type and mutant PfDHFRs, a number of inhibitors were synthesized and screened against the enzymes individually and found to be effective against both wild type and some mutant PfDHFRs.⁷⁻¹⁰

The advent of combinatorial chemistry techniques offers the means for rapid generation of a large number of structurally related compounds. However, identification of potential leads from the combinatorial libraries required an effective selection system that can single out the tight-binding inhibitors for further characterization and development. Recently, Kamchonwongpaisan *et al.* have developed an ultrafiltration method for the selection, based on the dissociation constant of the enzyme with each inhibitor.¹¹ In the stoichiometric selection, the limitation of this technique is its dependence on the solubility of the target enzyme which effected the compounds concentration in the libraries: i.e. the larger the size of library, the lower the concentration of each inhibitor.¹¹ Since the sensitivity of HPLC instrument is limited only to micromolar level, the quantitative analysis of very low concentration inhibitors might not be accurate.

It has been reported that immobilized enzymes are useful tools in many areas such as for enzyme sensors, enzyme reactors, or enzyme catalysis in organic synthesis.¹²⁻¹⁴ Dihydrofolate reductase enzymes were also immobilized onto the solid support in different manners and purposes.^{15, 16} In this paper, we report the method for immobilization of PfDHFR to the Sepharose gel for using in the

selection of tight-binding inhibitors from combinatorial libraries. By using the immobilized enzyme, the unbound and released bound inhibitors can easily be separated from the reaction mixture for determination and has no limitation on the solubility of the enzyme.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Methods

For the synthesis of trimethoprim analogues, reagents were purchased from Fluka, Merck and Sigma-Aldrich Ltd. and liquids were distilled before use. For enzyme studies, chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Ltd., Merck, and BDH and were used without further purification. Oligonucleotides were made-to-order from Bioservice unit at our research center. Thiopropyl Sepharose 6B was purchased from Amersham Biosciences. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded in DMSO-*d*₆ on a Bruker AV 500D spectrometer; chemical shifts are reported in parts per million (ppm). Mass spectra were recorded on a Micromass LCT using electrospray ionization (ESI) technique.

Enzyme Preparation

Double mutant PfDHFR¹⁷ and PfDHFR-TS¹⁸ (C59R+S108N) were cloned and expressed in *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Two modified PfDHFR enzymes with an eight amino acid spacer and a Cys at the carboxylic terminal were engineered. The spacers of the enzyme were designed based on its natural amino acid sequences (KMLNEQNC, named as K1NCR) and modified sequences (KMLNGGGC, named as KINGCR) at the junction region between DHFR and TS domains. These genes were PCR amplified from the available plasmid carrying natural *pfdhfr-ts* gene¹⁸ using 5' GCC AGC **AAG CTT** ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC GTT 3' as the forward primer and 5' CTC CGC **GGT ACC** TTA ACA ATT TTG TTC ATT TAA CAT TTT A 3', or 5' CTC CGC **GGT ACC** TTA ACA CCC TCC GCC ACC TAA CAT TTT ATT ATT CGT TTT CTT 3' as the reverse primer for K1NCR and KINGCR, respectively. The PCR protocol was initiated with 95°C for 5 min, followed by 30 thermal cycles (1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing period at 50°C and 2 min extension period at 72 °C), and 10 min final extension at 72°C. The PCR products of 732 base pairs were purified, restriction enzyme cut, and ligated back into the same modified pET17b. The DNA sequences of the constructs were verified by DNA sequencing. Protein expression and purification by Methotrexate-Sepharose affinity column were carried out as previously described¹⁷.

Immobilization of Enzyme to Thiopropyl-Sepharose 6B

For large scale preparation, dried thiopropyl-Sepharose 6B gel (1g) was suspended in 20 mL of buffer A (20 mM phosphate buffer, pH 7, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl and 20% glycerol). The mixture was air-aspirated to remove oxygen and bubbled with nitrogen through the solution. Enzyme (20 mg) was added to the gel suspension and mixed gently at 4 °C overnight. The gel-enzyme suspension was transferred to a column and the unbound enzyme was removed by the continuous flow of 100 mL of buffer. The washed enzyme-bound gel was then re-suspended in the same buffer and stored at 4 °C until used.

Determination of the Amount of Enzyme Bound to the Thiopropyl-Sepharose Gel

Ten portions of 10 mg dried thiopropyl-Sepharose 6B gel were suspended in 200 µL of oxygen-removed buffer A. Each gel suspension was combined with 200 µL of the enzyme solution containing different amount of DHFR enzyme (5-600 µg). The mixtures were mixed gently at 4 °C. After 5h of incubation, the suspensions were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm at 4 °C, and the supernatant from each tube was collected for the enzyme assay. The enzyme activity in the supernatant solution was plotted against the amount of enzyme added to the gel suspension.

Enzyme Assay

The activity of PfDHFRs were determined spectrophotometrically at 25 °C according to the method previously described.¹⁷ The reaction (1mL) contained 10X DHFR buffer (50 mM N-[tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid], pH 7.0, 75 mM β-mercaptoethanol, 1 mg/mL bovine serum albumin), 100 µM each of the substrate dihydrofolate and cofactor NADPH, and appropriate amount of enzyme solution. In the case of immobilized enzyme, there is no β-mercaptoethanol in the reaction mixture and the gel-bound enzyme was placed instead of the enzyme solution. Thiopropyl-Sepharose gel was added to the reaction mixture for blank measurement.

Construction of Combinatorial Libraries

Pyrimethamine (Pry), cycloguanil (Cyc), trimethoprim (Tmp) and derivatives of trimethoprim were synthesized individually according to the method described previously^{8, 9, 19} and their K_i values were measured by the conventional kinetic experiment.²⁰ Two libraries were prepared for using in the

stoichiometric selection. The first library was a mixture of an equimolar amount of pyrimethamine, cycloguanil and trimethoprim, which was used for technique validation. The second library was a mixture of an equimolar amount of trimethoprim and its 17 analogues, which was constructed based on the K_i values of each compound against the double mutant enzyme (C59R+S108N). The stock solution of each library was prepared in DMSO.

Selection of Tight Binding Inhibitors

One mL of combinatorial library containing 270 μ M inhibitors and 100 μ M NADPH in buffer A was added into the column of PfDHFR immobilized gel (1 g of dried gel, contained K1NCR 0.18 μ mol) for the test and into the column of Sepharose gel for control. After 5-min incubation at 25 °C, unbound inhibitors were eluted from the column and collected for further analysis using HPLC. The column was briefly washed with buffer and treated with 1 mL of 6M guanidine-HCl containing 12%DMSO to release bound inhibitors from the enzyme. The release compounds were then eluted from the column for further analysis by HPLC. The peak area of each inhibitor was determined.

HPLC and LC-MS Analyses

HPLC analyses were performed on a Waters 600 system equipped with a Waters 996 photodiode array detector, using a reverse phase column (Atlantis C18, 5 μ m, 4.6x250 mm) and acetonitrile and 25 mM ammonium acetate (pH 4.5) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. The separation was started with 15% acetonitrile, followed by stepwise gradient from 15-25% 25-35% and 35-70% at 5-10 25-60 and 70-80 min, respectively. Then the separation continued at 70% actonitrile until the last compound was collected. The chromatograms were detected through absorption at 254 nm for peak area determination. Compound identification was achieved by LC-MS (Micromass) using the same column and solvent system. In case of compounds with similar mass, standard of individual inhibitors were used to locate their peaks under the same separation protocol by HPLC.

RESULTS AND DISCUSSION

Design and Expression of Mutant DHFRs

The SH group of the cysteine (Cys) residue is very useful for immobilization of an enzyme to the solid support^{13, 16} because of its easy bond formation under mild condition. For example, modified *Escherichia coli* DHFR with Cys residue at the C-terminal has been successfully immobilized to a thiopropyl-Sepharose gel.¹⁶ In this study, PfDHFRs were designed to immobilize to thiopropyl-Sepharose via S-S bond. PfDHFRs with Cys residue at the C-terminal were constructed with the extension of some amino acids as a spacer to provide the flexibility for the enzyme. Since the DHFR domain of bifunctional enzyme PfDHFR-TS joined to the TS domain by the junction region (JR) of which amino acid residue at position 8 is Cys, double mutant (C59R+S108N) enzyme extended with 8 amino acids of the JR was constructed and named as K1NCR (**Fig 1a**). Thus, the 8 amino acid residues of the JR acted as a spacer. Alternatively, it is possible that bond formation of the enzyme to the solid support might be restricted due to the steric effect of the large side chains of Glu, Gln and Asn attached to Cys, therefore, three glycine (Gly) residues were introduced in place of these amino acid in the modified spacer and the engineered enzyme was named as K1NGCR (**Fig 1b**).

Following enzyme purification, dithiothreitol (DTT) was removed from the enzyme solution by gel filtration through a small column of Sephadex G-50 prior to immobilization. This is to prevent the cleavage of S-S bond between the enzyme and the solid support in the immobilization process and to keep the S-S bond intact throughout the study. The specific activities of free K1NCR and K1NGCR enzymes after DTT removal were 71.8 and 80.3 units/mg protein, respectively, which were similar to that of the parent C59R+S108N double mutant enzyme, K1 (90.1 units/ mg protein). The result indicated that the extended amino acids and the removal of DTT did not affect the enzyme activity.

Immobilization of DHFRs on Sepharose Gel

The amount of enzyme bound to thiopropyl-Sepharose gel was determined by a titration-based experiment.¹⁶ Following incubation of 10 mg of the gel with various amount of PfDHFR enzymes ranging from 5 to 600 µg, unbound enzyme was separated and the activity of enzyme was determined.

Figure 2 shows the relationship between the total enzyme added to the gel suspension and the activity of unbound enzyme detected in supernatant solution. At low amount of enzyme added, 5-40 μg , the activity of DHFR enzyme was undetectable to very low. With the increasing amount of enzyme, the enzyme activity of unbound fraction became detectable. This indicated that, after saturation of the immobilization of enzyme onto the Sepharose gel, further addition of enzyme merely increased the amount of unbound enzyme and, therefore, the enzyme activity in supernatant solution showed linear relationship with the amount of added enzyme. The total amount of enzyme bound to the gel can then be estimated by extrapolating the linear line back to zero (x-axis intercept). This estimation is based on the assumption that the disappearance of enzyme activity from supernatant solution is immobilized onto the gel support, thus, the maximum estimate could be obtained from this method. The calculated specific activity of the enzyme would decrease as the amount of immobilized enzyme estimated increase. Therefore, it was not unreasonable to assume that this method gave the minimum specific enzyme activity. It was estimated that the amount of bound K1NCR and K1NGCR enzymes on the gels were 5 and 4 mg per 1 g of dried gel as shown in **Figures 2a** and **b**, respectively. The calculated specific activities of the immobilized enzymes were 27.3 and 21.5 units/mg protein for K1NCR and K1NGCR enzymes, respectively (using a maximum estimate value of each enzyme). A more accurate figure was also obtained by determining the amount of enzyme by protein determination²¹ following DTT treatment to release the enzymes from the gel. By this direct determination, the amounts of bound K1NCR and K1NGCR enzymes on the gel were 4.4 and 3.2 mg/ g of dried gel, respectively, which were similar to the values determined by the titration method. Upon releasing from the gel, the specific activities of the free enzymes (40.7 and 38.3 units/mg protein) were comparable to those of the immobilized enzymes.

Technique Validation

The general procedure for the stoichiometric selection of tight-binding inhibitors by an immobilized enzyme is outline in **Scheme 1**. Inhibitors with high affinity should bind tightly to the enzyme and the unbound inhibitors could then be eluted from the column for further quantitative analysis and

identification by HPLC and LC-MS. K_i values of each inhibitor in the library could be calculated using equation 1¹¹ by mixing the reference compound with known K_i value to the library as an internal standard.

$$K_i \text{ value of inhibitor } i, \quad K_{i_i} = \frac{[I_i] [EI_{ref}] \cdot K_{i_{ref}}}{[EI_i] [I_{ref}]} \quad (1)$$

$[I_i]$, $[EI_i]$, $[I_{ref}]$ and $[EI_{ref}]$ are concentrations of free inhibitor i , enzyme-inhibitor complex, reference and enzyme-reference complex, respectively.

$$\begin{aligned} \text{where} \quad [I_i] &= \frac{\text{Peak area of } I_i \text{ in the test}}{\text{Peak area of } I_i \text{ in control}} \cdot I_{ti} \\ [EI_i] &= I_{ti} - [I_i] \\ I_{ti} &= \text{the total concentration of inhibitor } i \\ [I_{ref}] &= \frac{\text{Peak area of } I_{ref} \text{ in the test}}{\text{Peak area of } I_{ref} \text{ in control}} \cdot I_{tref} \\ [EI_{ref}] &= I_{tref} - [I_{ref}] \\ I_{tref} &= \text{the total concentration of reference} \end{aligned}$$

Since the activities of two immobilized enzymes were comparable, non-modified enzyme K1NCR was selected for further study. The theoretical expectation of the binding of immobilized enzyme with the mixture of inhibitors was tested by titration of the enzyme with a mixture of equimolar of each pyrimethamine (Pyr), cycloguanil (Cyc) and trimethoprim (Tmp).¹¹ Then the amount of free inhibitors was determined. **Figure 3** shows that the concentrations of free inhibitors decrease sequentially in the order of Cyc, Pyr and Tmp as expected. Using equation 1 and data in **Figure 3** at the enzyme : inhibitor ratio of 2, where all inhibitors share the binding to the enzyme at less than 100 % binding, Pyr as the reference with K_i value of 53.9 nM, the calculated K_i values of Cyc and Tmp were 33.3 and 270.9 nM, respectively. These values are comparable with the previously reported K_i values of 42.63 ± 6.3 , and 242.1 ± 40.1 nM, respectively. This demonstrated that the principle of stoichiometric selection of inhibitors was applicable to an immobilized PfDHFR and their inhibitors and the accurate K_i value of each compound in the library could be calculated by this method.

Construction and Identification of Trimethoprim Derivatives in the Library

In order to generate the library of the compounds with a variety of binding affinities, a library of 17 trimethoprim derivatives together with trimethoprim itself as reference was constructed based on their K_i values against double mutant enzyme (C59R+S108N) which was measured by conventional kinetic method.²⁰ This 18 compound-library was subjected to HPLC analysis using reversed phase column and stepwise gradient of 15-70% acetonitrile and 25nM ammonium acetate (pH 4.5) and each compound was identified by LC-MS. The amount of each compound was determined from peak area at 254 nM. The structures, K_i values and the analysis results of these inhibitors in the library were summarized in **Table 1**.

Selection of Lead Compounds from the Library by the Immobilized Enzyme

The binding assay was carried out with the excess molar ratio of 1.5:1.0 inhibitors to the enzyme, *i.e.* 270 μ M of total inhibitors (15 μ M each) to 180 μ M enzyme. Then the bound and unbound inhibitors were analyzed by HPLC. Inhibitors with lower K_i values (higher affinities) competed for the enzyme much more readily and bound to the enzyme at higher extent than those with higher K_i values, as shown by a linear correlation between % binding to the enzyme from both unbound and bound inhibitors (calculated from equation 2 and 3, respectively) and K_i values in **Figure 4**. It is worth mentioning that % binding determined from bound inhibitors were slightly lower than those from unbound inhibitors which presumably due to the dissociation of weak binding complexes (high K_{off} rate) in the washing step.¹¹ Using trimethoprim as a reference with K_i value of 242.1 applied to equation 1, the calculated K_i value of each derivative obtained from the data of unbound fraction was comparable to that measured kinetically (**Table1**) as shown by linear relationship between K_i values from both methods in **Figure 5**.

$$\% \text{ Binding (from unbound)} = 100 \left[1 - \frac{\text{Peak area of the test}}{\text{Peak area of control}} \right] \quad (2)$$

$$\% \text{ Binding (from bound)} = 100 \left[\frac{\text{Peak area of the test}}{\text{Peak area of control}} \right] \quad (3)$$

The results indicated that this method could efficiently be used for the selection of tight-binding inhibitors from the library and K_i value of each inhibitor could be predicted reasonably accurately. The

advantages of this method over the free enzyme method¹¹ are that higher amount of enzyme can be used, leading to a possible screening of a larger size of library with higher concentration of inhibitors and thus increasing the sensitivity and accuracy of detection by quantitative HPLC analysis. Thus, this system should be a useful tool for a primary screening or large scale selection of tight-binding inhibitors from combinatorial syntheses or libraries of natural products.

CONCLUSION

We have shown that PfDHFRs could be immobilized onto Separose gel via S-S bond with the estimated amount of 4-5 mg/g of dried gel and could be used for the selection of tight-binding inhibitors from combinatorial libraries. By this method, both bound and unbound inhibitors were easily separated from the reaction mixture for further quantitative analysis and identification by HPLC and LC-MS. Since there was no limitation on the solubility of the immobilized enzyme, the higher concentration of each inhibitor could be used and a more accurate detection can be obtained from quantitative HPLC analysis.

ACKNOWLEDGEMENT

TRF grant for new researcher from the Thailand Research Fund to C.T. and supports from Medicines for Malaria Venture (MMV) and Wellcome Trust to Y.Y. are gratefully acknowledged. S.K is a HHMI international research scholar.

Supporting Information Available : Additional experimental data (^1H NMR) of all compounds not listed in the Experimental Section. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- (1) Olliaro, P. L.; Yuthavong, Y. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *81*, 91-110.
- (2) Yuthavong, Y. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 175-182.
- (3) Peterson, D. S.; Walliker, D.; Wellems, T. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1988**, *85*, 9114-9118.
- (4) Peterson, D. S.; Milhous, W. K.; Wellems, T. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 3018-3022.
- (5) Foote, S. J.; Galatis, D.; Cowman, A. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 3014-3017.
- (6) Sirawaraporn, W.; Sathitkul, T.; Sirawaraporn, R.; Yuthavong, Y.; Santi, D. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**, *94*, 1124-1129.
- (7) Rastelli, G.; Sirawaraporn, W.; Sompornpisut, P.; Vilaivan, T.; Kamchonwongpaisan, S.; Quarrell, R.; Lowe, G.; Thebtaranonth, Y.; Yuthavong, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1117-1128.
- (8) Yuthavong, Y.; Vilaivan, T.; Chareonsethakul, N.; Kamchonwongpaisan, S.; Sirawaraporn, W.; Quarrell, R.; Lowe, G. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2738-2744.
- (9) Tarnchompoo, B.; Sirichaiwat, C.; Phupong, W.; Intaraudom, C.; Sirawaraporn, W.; Kamchonwongpaisan, S.; Vanichtanankul, J.; Thebtaranonth, Y.; Yuthavong, Y. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1244-1252.
- (10) Kamchonwongpaisan, S.; Quarrell, R.; Charoensetakul, N.; Ponsinet, R.; Vilaivan, T.; Vanichtanankul, J.; Tarnchompoo, B.; Sirawaraporn, W.; Lowe, G.; Yuthavong, Y. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 673-680.
- (11) Kamchonwongpaisan, S.; Vanichtanankul, J.; Tarnchompoo, B.; Yuvaniyama, J.; Taweechai, S.; Yuthavong, Y. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1222-1227.

- (12) Mosbach, K. *Methods Enzymol.* **1976**, *44*, 3-7.
- (13) Srere, P. A.; Uyeda, K. *Methods Enzymol.* **1976**, *44*, 11-19.
- (14) Iwakura, M.; Nakamura, D.; Takenawa, T.; Mitsuishi, Y. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 583-589.
- (15) Ahmed, F.; Dunlap, R. B. *Biotechnology and Bioengineering* **1984**, *26*, 1227-1232.
- (16) Iwakura, M.; Kokubu, T. *J. Biochem. (Tokyo)* **1993**, *114*, 339-343.
- (17) Sirawaraporn, W.; Prapunwattana, P.; Sirawaraporn, R.; Yuthavong, Y.; Santi, D. V. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21637-21644.
- (18) Chitnumsub, P.; Yuvaniyama, J.; Vanichtanankul, J.; Kamchonwongpaisan, S.; Walkinshaw, M. D.; Yuthavong, Y. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 780-783.
- (19) Sirichaiwat, C.; Intaraudom, C.; Kamchonwongpaisan, S.; Vanichtanankul, J.; Thebtaranonth, Y.; Yuthavong, Y. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 345-354.
- (20) Segal, I. H., Ed. *Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*; Wiley Interscience: New York, 1975.
- (21) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Schematic representation of extended DHFR which were constructed in this study a) DHFR-KMLNEQNC (K1NCR) and b) DHFR- KMLNGGGC (K1NGCR)

Figure 2. Immobilization of enzyme K1NCR (a) and K1NGCR (b) on thiopropyl-Sepharose 6B gel

Figure 3. Selective binding of a library containing pyrimethamine (◆), cycloguanil (■) and trimethoprim (▲) by an immobilized DHFR

Figure 4. Correlation of percentage of binding and K_i value of inhibitors upon selection by immobilized enzyme using an excess molar ratio of enzyme to total inhibitors of 1.0:1.5; %binding from bound inhibitors (Δ) and %binding from unbound inhibitors (■)

Figure 5. Correlation between K_i values of inhibitors in the library from calculated and measured kinetically

Figure 1

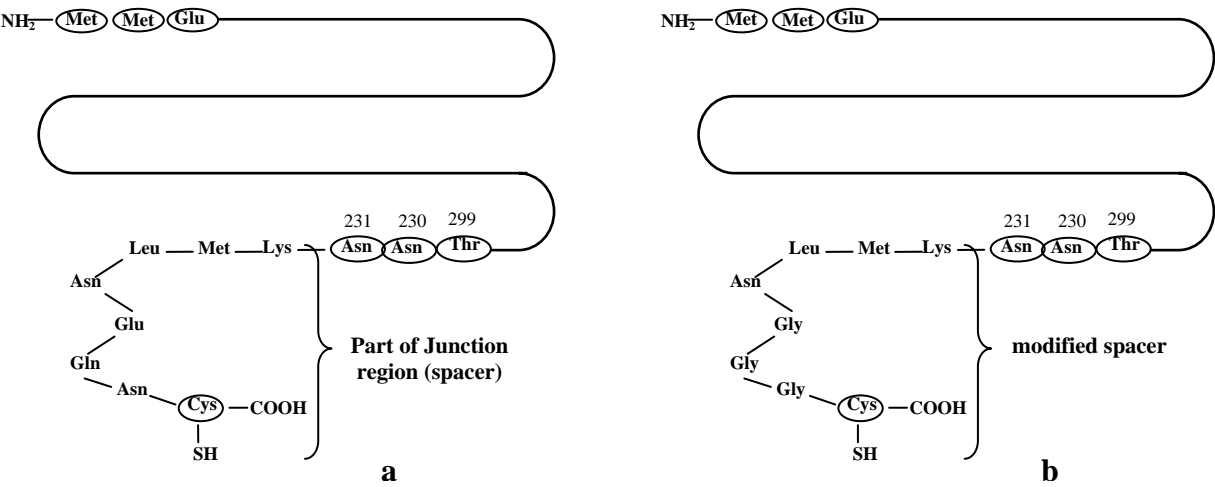


Figure 2

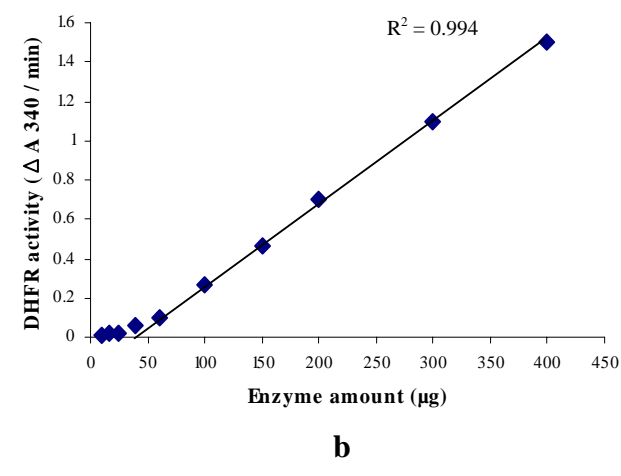
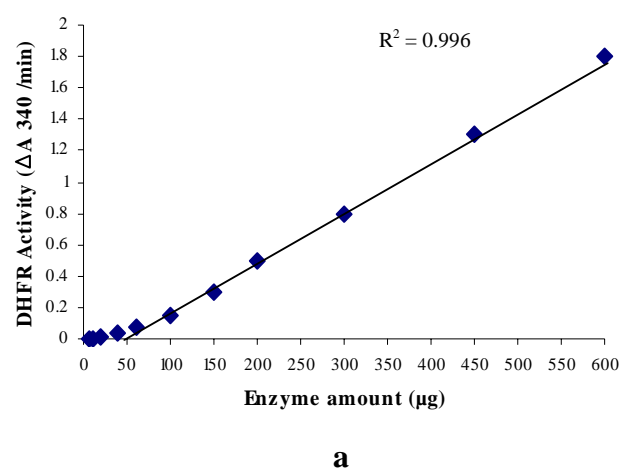


Figure 3

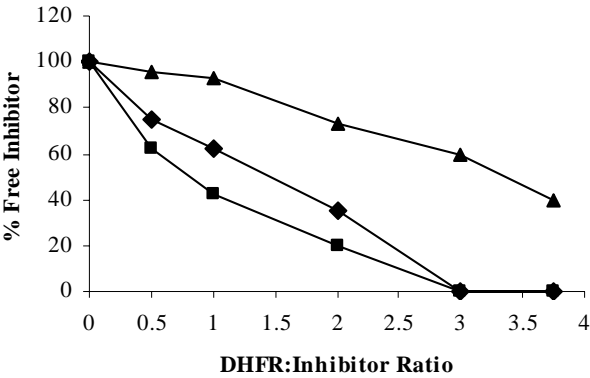


Figure 4

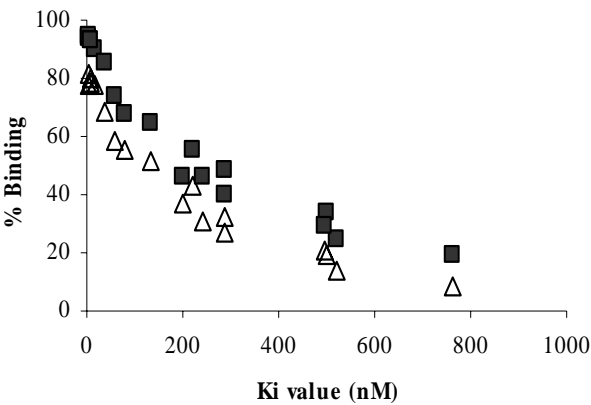
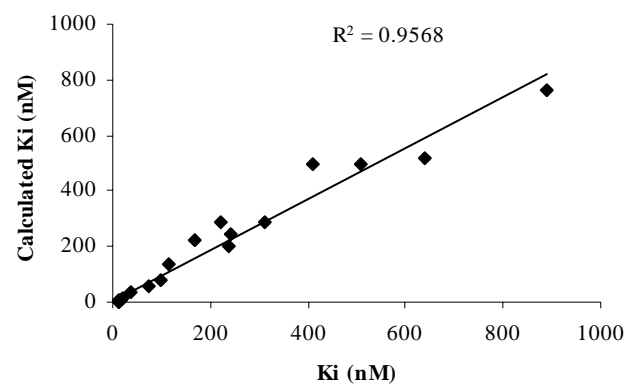


Figure 5



Scheme 1 General protocol for stoichiometric selection

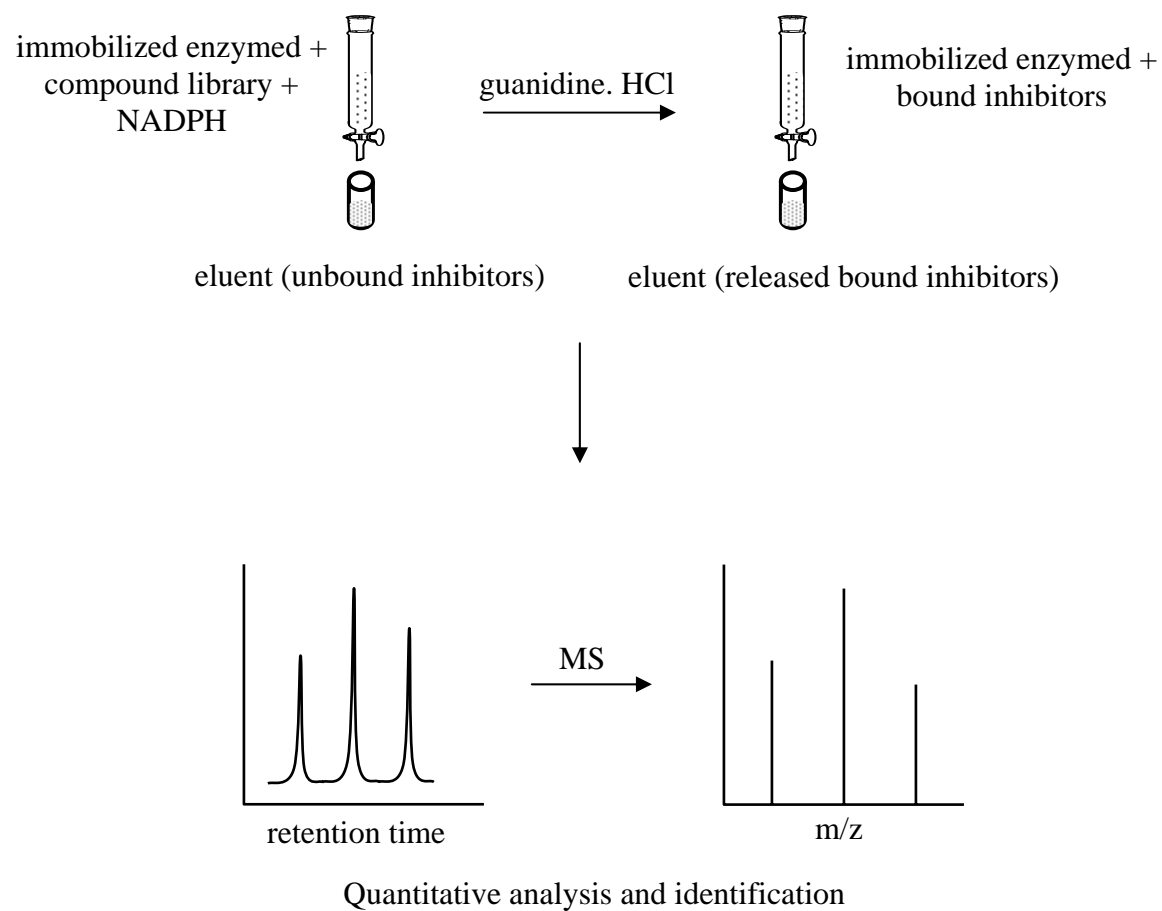
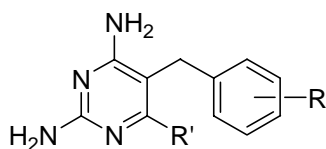


Table 1 Structure, retention time, mass and K_i value against double mutant PfDHFR of each inhibitor in library



Cpd	Peak #	R	R'	Retention time	K_i double mutant (nM)	Molecular mass	
						calculated	M+H ⁺ (m/z)
T1	1	4-N(CH ₃) ₂	H	12.1±0.3	449.8±20.1	243.31	244.15
Tmp	2	3,4,5-(OMe) ₃	H	13.6±0.5	242.1±40.1 ^a	290.32	291.14
T2	3	3,4,5-(OMe) ₃	Me	16.8±0.1	520.3±122.8 ^a	304.35	305.16
T3	4	2,4-(OMe) ₂	H	20.4±0.1	762.2±37.4	260.29	261.14
T4	5	4-OEt	H	21.4±0.1	199.8±20.3	244.30	245.14
T5	6	4-Br	H	24.7±0.1	285.8±47.0	278.01	279.02
T6	7	2,3-(C ₄ H ₄)-	H	28.2±0.1	222.1±80.2	250.30	251.13
T7	8	4-Pr ⁱ	H	42.2±0.4	496.5±54.1	242.32	243.16
T8	9	4-OCH ₂ -[3,4,5-(OMe) ₃]Ph	H	43.3±0.1	5.2±0.3 ^a	396.45	397.19
T9	10	3-OEt-4- OCH ₂ -[3,4,5-(OMe) ₃]Ph	H	46.8±0.1	2.2±0.1 ^a	440.50	441.21
T10	11	3-OBu ⁿ	H	50.9±0.1	288.6±29.2	272.35	273.17
T11	12	4- Bu ^t	H	52.8±0.2	134.5±18.5	256.35	257.17
T12	13	3-OPh	Me	54.8±0.1	15.1±1.8	306.37	307.16
T13	14	3-OEt-4-OCH ₂ Ph	H	59.0±0.1	9.7±1.4 ^a	350.42	351.18
T14	15	3-OMe-4-OCH ₂ Ph	Et	60.3±0.1	60.1±8.1 ^a	364.45	365.20
T15	16	4-OC ₃ H ₆ OCH ₂ Ph	H	68.1±0.1	6.7±0.5	364.45	365.20
T16	17	3- OCH ₂ Ph-4-OCH ₂ Ph	Me	82.9±0.1	80.0±10.3 ^a	426.52	427.21
T17	18	4-OC ₃ H ₆ O-[2,4,5-(Cl) ₃]Ph	H	87.1±0.1	39.1±3.1	452.05	453.07

^a Data from ref.19