

*Памяти Льва Павловича Овчинникова,  
хорошего друга и выдающегося ученого.*

**БЕЛКИ МАЛЯРИЙНОГО ПЛАЗМОДИЯ  
*PLASMODIUM FALCIPARUM*  
НА ПОВЕРХНОСТИ ИНФИЦИРОВАННЫХ  
ЭРИТРОЦИТОВ КАК МИШЕНИ  
ДЛЯ ОТКРЫТИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВ**

©2022 г.

**А. В. ОЛЕЙНИКОВ**

*Charles E. Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University,  
Boca Raton, FL 33428, USA*

I. Введение. II. Преимущества антиадгезионных препаратов при тяжелой форме малярии. III. Цитоадгезия инфицированных эритроцитов опосредуется семейством белков PfEMP1. IV. Тяжелые синдромы малярии и цитоадгезия. V. Воспаление сосудов является частой реакцией на цитоадгезию инфицированных эритроцитов и ключевым событием при тяжелой форме малярии. VI. Изменчивость белков семейства PfEMP1 в полевых условиях как проблемный фактор. VII. Стратегия определения антиадгезионных соединений. VIII. Разработка подхода к скринингу и идентификации новых антиадгезионных соединений для лечения синдромов SM, вызванных *P. falciparum*, с использованием различных библиотек малых молекул. IX. Проблемы тестирования противомалярийных антиадгезионных препаратов в доклинических исследованиях. X. Заключение. Применение антиадгезионных препаратов для других целей.

**I. ВВЕДЕНИЕ**

Малярия, вызываемая паразитом *Plasmodium falciparum*, является одним из самых опасных заболеваний в мире. Ежегодно регистрируется около полумиллиарда случаев, а умирает 0,5–1 миллиона человек, в основном детей младшего возраста. По данным Всемирной организации здравоохранения [1], большинство смертей происходит

---

*Принятые сокращения:* IE – эритроциты инфицированных паразитами *Plasmodium falciparum*; HTS – высокопроизводительный скрининг; SM – тяжелая форма малярии; CM – церебральная малярия; PM – плацентарная малярия; ДМСО – Диметил сульфоксид

*Адрес для корреспонденции:* aoleinikov@health.fau.edu

в результате тяжелых осложнений малярии (SM), основные из которых – это церебральная малярия (СМ), плацентарная малярия (РМ), респираторный дистресс и тяжелая анемия. Эффективность наиболее широко используемых противомаларийных препаратов в настоящее время заметно снижается. Важно отметить, что несмотря на быструю гибель паразитов при использовании противомаларийных препаратов, при SM всё же сохраняется значительная смертность (10–15%), особенно в первые 24 часа после поступления в больницу. Скорее всего, это происходит из-за продолжающейся еще долгое время цитоадгезии инфицированных эритроцитов (IE) уже после того, как паразиты (внутри красных кровяных телец) были убиты [2]. К сожалению, и с новыми препаратами для уничтожения паразитов будет та же проблема, если они не смогут влиять на цитоадгезию IE. Иными словами, есть насущная необходимость в дополнительных методах лечения, которые бы предотвращали и/или обращали вспять патофизиологические последствия цитоадгезии в случаях SM. Наша основная цель – открыть, охарактеризовать и оптимизировать новые ингибиторы цитоадгезии эритроцитов, инфицированных паразитом *P. falciparum*, в сосудистой сети для лечения тяжелых форм малярии, включая плацентарную и церебральную малярию (Рис.). Ниже мы рассмотрим наши работы в этой области.

## II. ПРЕИМУЩЕСТВА АНТИАДГЕЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЕ МАЛЯРИИ

Большинство противомаларийных препаратов нацелены на внутриклеточные процессы паразитов, необходимые для выживания и размножения. Такие препараты должны проникать внутрь паразита, пересекая несколько мембран, включая плазматическую мембрану эритроцитов, вакуолярную мембрану паразита и плазматическую мембрану паразита. У этих препаратов также есть потенциальные побочные эффекты, поскольку они могут аналогичным образом действовать на клетки хозяина.

Цитоадгезия играет важную роль в жизненном цикле и вирулентности *P. falciparum* [3] (Рис.), самого смертоносного малярийного паразита человека, и является причиной плацентарной малярии (РМ) [4] и церебральной малярии (СМ) [5–7]. Было бы логично предположить, что снижение цитоадгезии IE к сосудистой сети будет положительно влиять на защитные функции хозяина против инфекции. В пользу этой гипотезы говорит то, что у многоплодных женщин появляются антиадгезионные антитела, предотвращающие

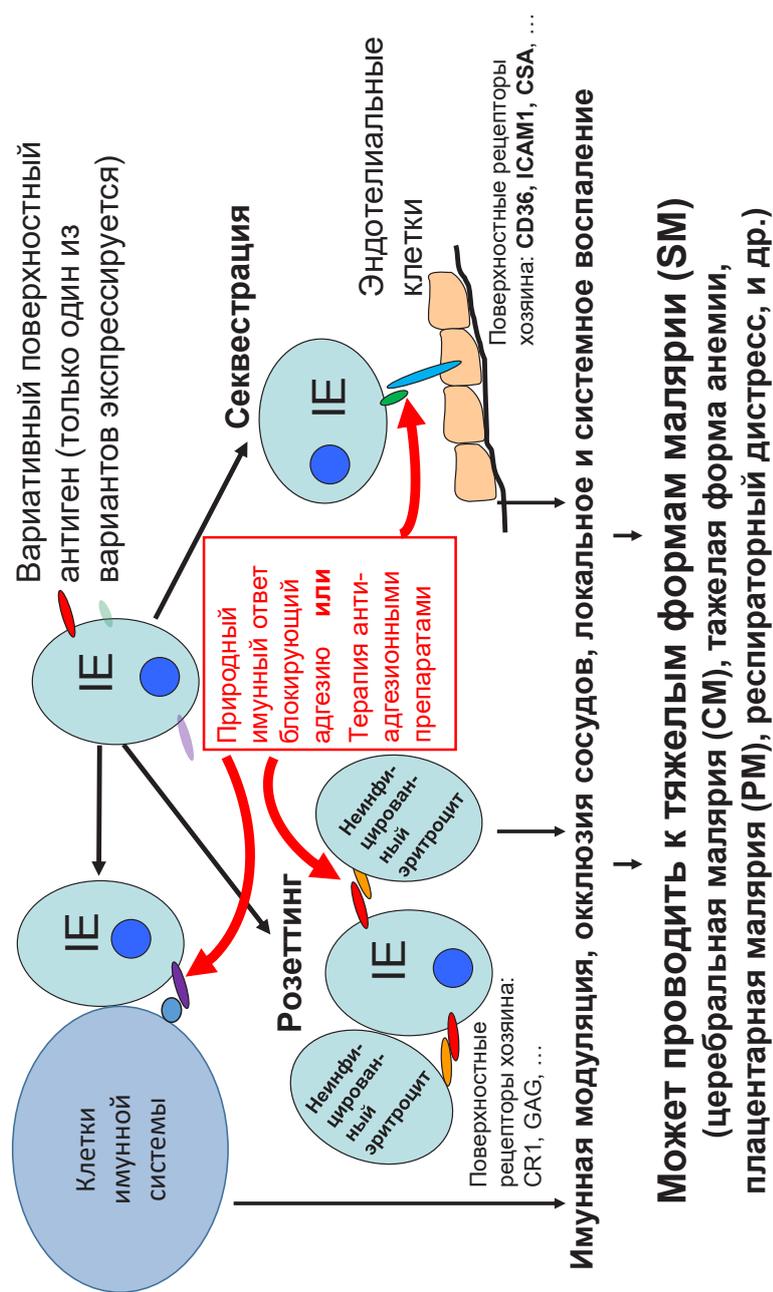


Рис. Роль цитoadгезии обусловленной взаимодействием переменных белков PfEMP1 с рецепторами хозяина в патологии малярии вызываемой паразитом *P. falciparum* и применение антиадгезионной терапии.

цитоадгезию ИЕ к синцитиотрофобластам плаценты – что, в свою очередь, связано с защитой от патологии РМ [8, 9] (Рис.). Антиадгезионная активность рассматривается как важный фактор для разработки успешной вакцины против РМ [10]. Кроме того, мы обнаружили, что более 75% взрослых с иммунитетом имеют высокие уровни антител, ингибирующих адгезию к ICAM-1 [11] – рецептору, участвующему в SM и CM (см. ниже). Эта антиадгезионная активность может способствовать (наряду со способностью опсонизировать ИЕ) быстрому излечению тяжелобольных детей после инъекции иммунных взрослых IgG [12]. Время фармакологического действия лекарства чрезвычайно важно для выживания при SM. Агенты, которые препятствуют адгезии и которым не нужно проникать в ИЕ, вероятно, будут иметь более высокую скорость действия. В этом отношении молекулы с ограниченной способностью проникать через плазматические мембраны и потому не вмешивающиеся в функции клетки могут быть особенно безопасными, несмотря на внутривенное введение, что бывает вполне оправдано в случае опасных для жизни эпизодов SM. Это чрезвычайно важно при лечении малярии во время беременности, когда от лекарств требуется наибольшая безопасность как для матери, так и для плода [13]. Более того, поскольку ИЕ связывается с функционально значимыми частями рецепторов хозяина и может ингибировать их нормальные физиологические функции [14], антиадгезионные препараты будут иметь дополнительный положительный эффект. Не только мы, но и другие исследователи полагают, что препараты против адгезии могут быть очень эффективными и безопасными в противомалярийной терапии [15, 16], будучи использованы как дополнение к паразитарным препаратам (Рис.). Если же случайно у антиадгезионного препарата обнаруживается еще и паразитарное действие [16], это только добавляет ему ценности.

### III. ЦИТОАДГЕЗИЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ОПОСРЕДУЕТСЯ СЕМЕЙСТВОМ БЕЛКОВ PfEMP1

*P. falciparum* – единственный вид малярийного возбудителя, который, как было ясно показано, эффективно секвестрирует ИЕ в различных органах, используя рецепторы на поверхности клетки-хозяина для адгезии к эндотелиальным клеткам, неинфицированным эритроцитам и клеткам иммунной системы [17–21]. Цитоадгезия позволяет ИЕ избежать клиренса в селезенке, основного врожденного противомалярийного механизма. Однако цитоадгезия также приводит к

окклюзии сосудов, что сильно коррелирует с тяжестью заболевания [22] и воспалением эндотелиальных клеток, а также различных органов [23–28]. Основным паразитическим лигандом для адгезии IE является семейство (~ 60 членов) белков PfEMP1 [29–31], которые экспрессируются на поверхности IE в специализированных структурах, называемых «выступами» [32]. К настоящему времени не было обнаружено никаких рецепторных молекул паразитов, важных для адгезии IE. Белки PfEMP1 кодируются генами var. У каждого зрелого паразита на поверхности экспрессируется продукт только одного гена var [33]. Паразиты могут переключаться на другой вариант, изменяя свой антигенный и адгезивный фенотип [34, 30] (Рис.). Каждый белок PfEMP1 состоит из одиночных внутриклеточных и трансмембранных доменов и нескольких внеклеточных доменов (от 2 до 7 доменов на белок, ~ 30–45 кДа на домен), сильно сшитых дисульфидными связями [31, 35]. Эти домены были классифицированы (с использованием греческих букв для классов и чисел для подклассов) на домены сходные с доменами Даффи-связывающих белков (DBL)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ , X, и домены цистеиновых междоменных областей (CIDR)  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [31, 35, 36]. У всех доменов DBL сходный каркас [37–40], а С-концевая часть каркаса CIDR подобна С-концевой части домена DBL [41]. Эти домены ответственны за адгезию к различным рецепторам хозяина ([42]). Каждый домен представляет собой функциональную связывающую (с большей или меньшей эффективностью) единицу. Специфичность и комбинация этих доменов в экспрессируемом PfEMP1 может определять конечную специфичность адгезии IE, силу связывания и, возможно, различную патологию [43]. В ходе нашей работы мы клонировали и экспрессировали библиотеку конструкций PfEMP1 ( $n > 180$ ), которые содержат все домены ( $n = 272$ ) или тандемы доменов (например, за многими доменами DBL всегда следуют домены CIDR) из всех белков PfEMP1 ( $n = 59$ ) одной линии паразитов, NF54, в их функциональной (рецептор-связывающей) форме, как было продемонстрировано в ряде наших публикаций [44, 11, 45–49]. Эта общепротеомная коллекция конструкций PfEMP1 является важным инструментом для идентификации новых пар рецептор-домен, а также для скрининга антиадгезионных соединений в отношении различных специфичностей связывания IE. Хотя члены семейства PfEMP1 принадлежат к белкам переменного класса (последовательности варьируются от паразита к паразиту в полевых условиях), их изменчивость не представляется непреодолимой проблемой, как будет показано ниже.

#### IV. ТЯЖЕЛЫЕ СИНДРОМЫ МАЛЯРИИ И ЦИТОАДГЕЗИЯ

Как мы упоминали выше, цитоадгезия IE выступает причиной или предпосылкой SM, включая церебральную малярию [5–7, 27] и плацентарную малярию [4, 50]. Наиболее изученным синдромом является плацентарная малярия (PM). Только один член семейства PfEMP1, VAR2CSA, участвует в PM [51–53]. Он имеет характерную последовательность из трех доменов класса DBL-X, за которыми следуют три домена DBL $\epsilon$ . Такая архитектура VAR2CSA консервативна у всех изученных штаммов *P. falciparum*. Антиадгезионные антитела, появляющиеся после одной или двух последовательных беременностей в эндемичных по малярии регионах, уменьшают PM, ингибируя связывание IE с рецептором, хондроитинсульфатом А (CSA) в плаценте [54] (Рис.). Обычные лекарства не особенно эффективны в профилактике PM и даже могут быть вредными [13]. Поэтому лекарство, которое не проникало бы через клеточные мембраны и, следовательно, не проникало бы в ткани матери и плода, но при этом препятствовало бы адгезии паразитов (ключевое событие при PM), было бы особенно безопасно для беременных.

Как показали другие авторы и мы, у женщин, которые приобрели устойчивость к малярии во время беременности, появляются антитела к VAR2CSA во время последующих беременностей [50, 44]. Идентификация моноклональных антител, которые ингибируют связывание нескольких штаммов паразитов PM с лигандом хозяина CSA, указывает на то, что консервативных свойств этих переменчивых белков достаточно, чтобы обеспечить широкую эффективность против разных штаммов [55]. Эти консервативные части доменов VAR2CSA могут быть мишенями для антиадгезионных соединений благодаря конкурентному или аллостерическому способу действия.

Основным кандидатом на роль рецептора адгезии хозяина при церебральной малярии (CM) является молекула ICAM-1 [7, 6, 27, 56]. Однако недавно было также высказано предположение, что те белки PfEMP1, которые содержат тандем доменов, связывающихся с рецептором ICAM-1 и рецептором эндотелиального протеина С (EPCR), преимущественно участвуют в патогенезе CM [57, 58], потенциально связываясь через один или оба рецептора. [59, 60]. Только шесть доменов DBL $\beta$  из ~60 белков PfEMP1, содержащих более 250 доменов в штамме *P. falciparum* IT4, были идентифицированы как связывающиеся с ICAM-1 [61], и то же самое было показано только для двух доменов DBL $\beta$  в штамме 3D7 [11, 62]. Точно так же ограниченный набор доменов в любом отдельно взятом геноме связывается с EPCR [63, 64]. Тот факт, что только небольшое количество доменов

PfEMP1 прочно связывается с любым из этих рецепторов, хорошо согласуется с эпидемиологией СМ, который является редким, но чрезвычайно смертельно тяжелым синдромом малярии. Обширные эпидемиологические данные [65, 66] подтверждают гипотезу, что только ограниченное количество линий паразитов, возможно, экспрессирующих определенные варианты PfEMP1 (содержащие определенные домены), могут быть источником тяжелого заболевания, подобно тому, как это происходит при РМ.

#### **V. ВОСПАЛЕНИЕ СОСУДОВ ЯВЛЯЕТСЯ ЧАСТОЙ РЕАКЦИЕЙ НА ЦИТОАДГЕЗИЮ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ И КЛЮЧЕВЫМ СОБЫТИЕМ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЕ МАЛЯРИИ**

Несколько исследований ясно продемонстрировали, что цитоадгезия PE напрямую влияет на воспаление сосудов и эндотелиальную дисфункцию [67, 68]. Воспаление сосудов усиливает тяжесть заболевания [69], играет ключевую роль в СМ и РМ и характеризуется индукцией молекул адгезии (таких как ICAM-1) и провоспалительных цитокинов, а также проницаемостью сосудов, вызванной нарушением целостности барьера эндотелиальных клеток [70–72]. Некоторые из этих воспалительных процессов инициируются и стимулируются прямым взаимодействием между доменами PfEMP1 и рецепторами хозяина посредством сложного набора внутриклеточных сигналов [25, 26]. Следовательно, лекарственные средства против адгезии, которые предотвращают или обращают вспять эти взаимодействия, могут уменьшить воспаление и, таким образом, способствовать лучшему исходу синдромов СМ. Наши недавние неопубликованные результаты показывают, что антиадгезионное лечение может уменьшить воспаление сосудистых клеток. Для подтверждения этих данных требуются дополнительные исследования.

#### **VI. ИЗМЕНЧИВОСТЬ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PfEMP1 В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ КАК ПРОБЛЕМНЫЙ ФАКТОР**

Члены семейства PfEMP1 имеют существенные вариации в своих последовательностях в полевых условиях. Тем не менее, варибельность не препятствует конкретным группам доменов связываться с соответствующими консервативными рецепторами, что подтверждается недавним структурным исследованием, которое выявило консервативные карманы связывания в вариантных доменах PfEMP1,

связывающихся с консервативными рецепторами [14]. В этом отношении все домены DBL и CIDR имеют сходный каркас [37–41]. Молекулы, которые имитируют связывающие мотивы рецепторов хозяина, теоретически могут быть эффективны против нескольких вариантов соответствующих белков PfEMP1, как это демонстрирует небольшая молекула, которая имитирует петлю ICAM-1 и ингибирует связывание двух вариантов паразита с рецептором ICAM-1 [73]. Однако при использовании таких молекул антиадгезии могут возникнуть проблемы, поскольку они могут конкурировать с естественными лигандами этих рецепторов и вызывать вредные побочные эффекты. Следовательно, предпочтительны молекулы, которые напрямую связываются с переменными доменами PfEMP1 и ингибируют их связывание со своим специфическим рецептором. Вышеупомянутое структурное исследование [14] решительно поддерживает идею ингибировать взаимодействие вариантных доменов с соответствующим рецептором путем связывания одной молекулы с их консервативными карманами для связывания рецептора.

Важно отметить, что имеющиеся данные говорят в пользу того, что разнообразие вариантов, участвующих в случаях SM, также значительно ограничено. В эндемичных по малярии районах SM составляет <2% от общего числа случаев малярии у детей раннего возраста и возникает только один или два раза в жизни [65]. Это указывает на то, что широкий иммунитет против SM быстро развивается в раннем детстве [66], несмотря на вариации поверхностных белков IE. То, что есть моноклональное антитело, которое ингибирует связывание нескольких штаммов паразитов малярии беременных с лигандом хондроитинсульфатом А [55] хозяина, дополнительно свидетельствует в пользу того, что консервативные свойства вариантов белка PfEMP1 могут быть достаточными, чтобы обеспечить перекрёстную эффективность молекул антиадгезии против разных штаммов. Таким образом, одна молекула, ингибирующая адгезию, может работать как перекрёстная защита от разных штаммов / PfEMP1 в отношении конкретного рецептора хозяина.

## **VII. СТРАТЕГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИАДГЕЗИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

Прямой скрининг живых лабораторных или полевых изолятов паразитов на реагенты, которые ингибируют их адгезию к различным рецепторам хозяина, был и остаётся чрезвычайно медленным и утомительным процессом – повысить пропускную способность (НТ)

здесь не удаётся из-за технических и биологических ограничений. Наш двухэтапный подход к идентификации молекул антиадгезии преодолевает эти ограничения [47]. Более того, он специально разработан для скрининга библиотек смесей и позволяет провести быструю деконволюцию до отдельных активных соединений за несколько шагов, поскольку первая стадия НТ выполняется *in vitro*. Тестировать эти наборы соединений на ингибирование связывания с живыми паразитами невозможно из-за их собственных токсических эффектов или из-за растворителя ДМСО (долю которого в нашей системе *in vitro* можно поднять до 20%), а также из-за низкой пропускной способности методов анализа с живыми паразитами.

Первоначально, библиотеки смесей малых молекул подвергаются скринингу и деконволюционируют в отдельные соединения методом НТ, тестируя ингибирование взаимодействий между известными рецепторами хозяина, которые участвуют в адгезии IE, и различными доменами PfEMP1, иммобилизованными на шариках BioPlex (BioRad). Затем молекулы, идентифицированные на первом этапе, проверяются на ингибирование адгезии с использованием живых гетерологичных IE. Использование гетерологичных IE, предпочтительно из отдаленных географических регионов, важно для демонстрации того, что идентифицированные антиадгезионные препараты ингибируют связывание IE с различным генетическим фоном паразитов и не являются специфичными для одной линии. Поскольку количество кандидатов для тестирования с IE оказывается невелико, двухэтапная процедура обеспечивает НТ-идентификацию молекул антиадгезии.

### **VIII. РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К СКРИНИНГУ И ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ АНТИАДГЕЗИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМОВ SM, ВЫЗВАННЫХ *P. FALCIPARUM*, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ БИБЛИОТЕК МАЛЫХ МОЛЕКУЛ**

#### **БИБЛИОТЕКА CHEMBRIDGE**

Разработка и подтверждение принципа нашего подхода НТ для скрининга молекул против адгезии были выполнены [47] с использованием подмножества ( $n = 10\ 000$ ) библиотеки малых молекул DIVERSet от ChemBridge Corporation. Эта библиотека была выбрана из-за ее коммерческой доступности, значительного размера, позволяющего идентифицировать достаточное количество активных молекул, возможности приобретать отдельные подмножества по доступной

цене для начальной разработки, а также соответствующих физико-химических и фармакологических характеристик, отраженных в многочисленных публикациях. Эти характеристики включают в себя широкое биологически релевантное пространство разнообразия фармакофоров. Например, 50 000 небольших молекул, похожих на лекарства, из библиотеки DIVERSet покрывают 60% общего трехточечного фармакофорного пространства всей коллекции EXPRESS-Pick™ (внутренней), состоящей из 500 000 соединений.

Прежде чем работать с библиотекой малых молекул, мы продемонстрировали выполнимость нашего двухэтапного подхода с использованием антител, которые ингибируют связывание между тремя рецепторами (CD36, наиболее распространенный рецептор связывания IE; CSA, рецептор, участвующий в PM; ICAM-1, рецептор, участвующий в CM) и эритроцитами, инфицированными линиями паразитов, связывающихся с этими рецепторами. Когда мы использовали домены PfEMP1, связывающиеся с этими рецепторами, и соответствующие линии паразитов, мы обнаружили замечательное соответствие между молекулярными анализами BioPlex *in vitro* и анализами с живыми IE – что, в свою очередь, убедительно подтвердило действенность нашего двухэтапного подхода к скринингу антиадгезионных молекул. Поскольку физические принципы анализа и способы считывания данных одинаковы как для больших (антитела), так и для малых молекул антиадгезии, мы ожидали получить аналогичные согласованные результаты, используя тот же двухэтапный подход и библиотеки малых молекул.

Работая с этой подбиблиотекой из 10 000 соединений, на первом этапе мы подготовили пулы по 80 соединений каждый для первоначального скрининга (125 мкМ каждого соединения в ДМСО; 125 пулов). Таким образом, для первоначального скрининга всех 10000 соединений потребовалось менее двух 96-луночных планшето для скрининга на ингибирование связывания трех эндотелиальных рецепторов с их соответствующими связывающимися доменами PfEMP1.

Мы выбрали произвольный порог для нашего анализа *in vitro* на уровне 75% ингибирования связывания. Для скрининга ингибирования связывания CD36 мы выбрали пять различных доменов связывания CD36. Интересно, что мы не нашли никаких смесей, которые ингибируют связывание CD36 выше выбранного порога, и, следовательно, не проводили дальнейшей деконволюции. Вероятно, для поиска более эффективных соединений для ингибирования связывания CD36 потребуются большая библиотека. С двумя другими рецепторами, CSA и ICAM-1, и соответствующими тремя CSA- связы-

вающими доменами и одним (единственным, идентифицированным нами в линии NF54) доменом связывания ICAM-1 мы успешно идентифицировали ингибирующие смеси и деконволюционировали их до трех и двух активных индивидуальных соединений соответственно. Более того, из трех соединений, которые ингибируют связывание CSA-связывающего домена с CSA, два соединения имеют один и тот же сульфонилсодержащий первичный каркас, что еще больше говорит в пользу нашего подхода.

Используя анализ *in vitro*, мы продемонстрировали, что значения IC50 для обоих рецепторов находятся в низком микромолярном диапазоне: 1,73 мкМ для полноразмерного белка VAR2CSA PfEMP1 с шестью CSA-связывающими доменами [47], и 18 мкМ для ICAM-1-связывающего домена PF11\_0521 DBL2β3. Этот последний домен связывает рецептор ICAM-1 с очень высокой avidностью, около 2 нМ [46, 59]. Таким образом, идентификация низкомолекулярного соединения, которое может конкурировать с взаимодействием домен-рецептор при низкой микромолярной концентрации, является важным шагом на пути к идентификации более мощных соединений.

В соответствии с нашим двухэтапным подходом мы продемонстрировали, что соединения, идентифицированные на первом этапе *in vitro*, активны в ингибировании связывания живых IE. Более того, в этих экспериментах, которые мы провели при единственной концентрации 100 мкМ для доказательства принципиальной эффективности метода, мы использовали линии паразитов CS2, связывающие CSA, и 3G8, связывающие ICAM-1 [74]. Эти линии были совершенно другого генетического и географического происхождения (линия IT4 из Юго-Восточной Азии [75]), чем линия NF54 (из Африки [76]), которая служила источником наших рекомбинантных рецептор-связывающих доменов для анализов *in vitro*. Эксперименты с живыми IE четко продемонстрировали, что наши активные соединения ингибируют связывание CS2 и 3G8 линий с соответствующими рецепторами связывания. Это очень важное открытие, поскольку оно указывает на то, что низкомолекулярные ингибиторы позволяют решить проблему, связанную с разнообразием доменов, и могут ингибировать рецепторное связывание IE с различным генетическим происхождением паразитов. Более того, для CSA-связывающих паразитов соединения, которые мы идентифицировали, были способны не только блокировать, но также и обращать вспять взаимодействия между IE и рецептором CSA. Это также чрезвычайно важная особенность, так как обращение вспять установленной секвестрации может иметь значительное влияние на патологию SM, удаляя уже

секвестрированных паразитов, которые вносят значительный вклад в воспаление сосудов.

Таким образом, используя подмножество библиотеки DIVERSet всего из 10000 соединений, мы не только успешно разработали двухэтапный подход, но и идентифицировали три соединения, которые ингибируют адгезию IE к рецептору CSA, и два соединения, которые ингибируют адгезию IE к рецептору ICAM-1 – двум основным рецепторам, участвующим в секвестрации IE в PM и CM [47]. Это значит, что скрининг коммерчески доступной в настоящее время полной коллекции низкомолекулярных соединений DIVERSet от ChemBridge ( $n = 150\,000$ ) может выявить до 30–50 отдельных активных соединений (hits), из которых можно выбрать лучшие на основе их активности, токсичности для клеток и животных, а также их фармакокинетики / фармакодинамики (PK/PD), чтобы в дальнейшем превратить их в лекарственные средства против адгезии.

#### БИБЛИОТЕКА НАТУРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ – КОНОПЕПТИДЫ

Другие библиотеки могут предоставить дополнительную возможность для скрининга антиадгезионных молекул. Хорошим источником здесь могут быть коллекции различных натуральных соединений – как это удалось показать нам с библиотекой конотоксинов / конопептидов [77], содержащихся в яде морских моллюсков рода *Conus*. Их насчитывается сотни тысяч, в основном в виде богатых дисульфидными связями и хорошо структурированных пептидов, встречающихся более чем у 850 видов моллюсков-конусов [78–80]. Не все они токсичны или вредны для человека, а те, которые токсичны, можно модифицировать так, чтобы они утратили токсичность, но сохранили другие биологические свойства [81]. Этот класс молекул активно используется для поиска новых лекарств для лечения различных заболеваний [82].

Высокая специфичность и сродство конотоксинов ко многим повсеместно распространенным соматическим рецепторам позволяет предположить, что они могут быть мощными соединениями, способными предотвращать или отменять взаимодействия между доменами адгезинов малярии, белками PfEMP1, и рецепторами хозяина, которые играют роль в SM. В нашей работе [77] яд был извлечен из 460 образцов *Conus* пух и фракционирован с помощью эксклюзионной (SE) высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с последующей обращенно-фазовой (RP) HPLC. Множественные фракции были протестированы на ингибирование связывания трех сосудистых рецепторов, CD36, CSA и ICAM-1, с соответствующими рецептор-связывающими доменами PfEMP1 с использованием разработанного

нами подхода *in vitro*, описанного выше, с использованием доменов, иммобилизованных на шариках BioPlex [47]. Замечательным открытием стало то, что шесть отдельных фракций яда *S. pnx*, которые содержат в основном или один пептид, или очень ограниченный набор пептидов, влияют на связывание нескольких доменов с различной рецепторной специфичностью с соответствующими рецепторами, среди которых есть белки (CD36 и ICAM-1) и полисахарид (CSA). Полученные результаты позволяют предположить, что либо пептиды в этих фракциях конотоксина связываются с общими структурными элементами в разных доменах PfEMP1 со сходным общим каркасом, как мы обсуждали выше, либо несколько разных пептидов во фракции могут взаимодействовать с разными доменами (или рецепторами), блокируя взаимодействия домен-рецептор. Способность этих фракций ингибировать связывание адгезинов IE с множественной специфичностью связывания с широким набором рецепторов может быть чрезвычайно полезной при разработке эффективных и безопасных антиадгезионных препаратов против SM [15, 16], поскольку IE от пациентов с SM часто связывают несколько рецепторов [83, 57]. Таким образом, натуральные продукты, такие как конопептиды, выступают многообещающим источником соединений для разработки противоадгезионных противомалярийных препаратов.

#### БИБЛИОТЕКИ TPIMS

Приведенные выше результаты демонстрируют, что скрининг больших библиотек может обеспечить достаточное количество соединений, дающих низкие значения IC50, которые в дальнейшем могут стать основой для разработки препаратов против адгезии, и что чрезвычайно полезными классами молекул в этом смысле могут быть пептиды и пептидомиметики. Такие большие библиотеки на основе смесей, идеально подходящие для разработанного нами двухэтапного подхода, были разработаны в Институте молекулярных исследований Торри Пайнс (TPIMS). Они существуют в очень удобном формате, позволяющем анализировать миллионы соединений с использованием всего лишь от сотен до нескольких тысяч смесей этих соединений [84–86]. Суть здесь заключается в подготовке библиотек позиционного сканирования с использованием подхода «чайный пакетик» [87], когда каждая из библиотек содержит разные каркасы с несколькими группами замены. Подбиблиотеки каждого каркаса представлены одной фиксированной (определенной) замещающей группой и смесью других замещающих групп. Количество подбиблиотек равно количеству вариантов для позиций замещающих групп. Анализ активности

результатов скрининга позволяет выявить наиболее активные замещающие группы. Затем готовится новая подбиблиотека (или подбиблиотеки), содержащая все комбинации этих наиболее активных групп, и новые комбинации опять проверяются на активность. В 2–3 итерациях (в зависимости от сложности исходной библиотеки) подготавливается библиотека индивидуальных соединений на основе активности смесей с определенными замещающими группами и идентифицируются отдельные наиболее активные соединения. Как мы упоминали выше, скрининг библиотек на основе смесей требует значительно меньше усилий, времени и ресурсов по сравнению с традиционным скринингом НТ отдельных соединений.

Библиотеки TPIMS лишь частично перекрываются структурным пространством одобренных в настоящее время лекарств. Таким образом, они добавляют молекулярной сложности библиотекам, обычно используемым при высокопроизводительном скрининге [88, 89], и расширяют традиционное релевантное пространство медицинской химии [89]. Кроме того, большие библиотеки на основе смесей, созданные на ограниченном числе молекулярных каркасов, дают возможность быстро понять взаимосвязи между структурой и активностью (SAR) во время скрининга. Коллекция TPIMS характеризуется большей молекулярной сложностью и более обширным трехмерным конформационным пространством, чем коммерческие коллекции, находящиеся в привычном доступе [88], и обладает лекарственными свойствами, аналогичными пространству свойств известных лекарств [89]. Успешное использование коллекции библиотеки TPIMS в доклинических и клинических исследованиях подробно рассмотрено в ряде исследований [85, 90].

В нашей работе [91] мы проверили коллекцию библиотек TPIMS, состоящую более чем из 30 миллионов соединений, сконструированных вокруг 75 молекулярных каркасов, с целью идентификации антиадгезионных свойств при связывании рецептора ICAM-1, вовлеченного в СМ, и соответствующего связывающего домена PF11\_0521 DBL2β3 из белка PfEMP1 линии 3D7 [11, 46, 47] с IC50 в наномолярном диапазоне.

На основании начального скрининга была отобрана синтетическая комбинаторная библиотека позиционного сканирования дитиазола (соединения TPI-2103, n = 3990) с наивысшим уровнем ингибирования и самой низкой сложностью (две замещающие группы, R1 и R2) для позиционной сканирующей деконволюции соединений, ингибирующих связывание. 104 индивидуальных соединения были получены деконволюцией TPI-2103 и представляли все

комбинации выбранных наиболее активных замещающих групп R1 и R2. Их тестирование выявило два соединения (2648-40 и 2648-33) с ингибированием связывания ICAM-1 более чем на 50% при концентрации 1 мкМ. Затем эти два соединения были охарактеризованы в диапазоне концентраций как ингибиторы связывания ICAM-1 (a) *in vitro* с использованием домена, связанного с шариками BioPlex, и (b) с живыми эритроцитами, инфицированными гетерологичной линией паразита 3G8, связывающейся с ICAM-1; также их проверили на цитотоксичность в отношении двух линий клеток человека.

Наши эксперименты показали, что соединения 2648-40 и 2648-33 имеют *in vitro* IC<sub>50</sub> 362 нМ и 696 нМ соответственно, что примерно в 50 и ~25 раз лучше, чем у соединений, идентифицированных в нашей предыдущей работе с небольшой подбиблиотекой ChEMbridge [47]. Важно отметить, что эта ингибирующая активность была аналогичной при использовании живых IE давая IC<sub>50</sub> 352 нМ и 669 нМ для соединений 2648-40 и 2648-33 соответственно. Таким образом, лучшее ингибирование связывания ICAM-1 на шариках одним из соединений соответствует лучшему ингибированию связывания между IE и иммобилизованным на поверхности ICAM-1 тем же соединением. Это соответствует нашему предыдущему наблюдению [47]. Кроме того, связывающие домены ICAM-1 белка PfEMP1, экспрессируемые на поверхности эритроцитов, инфицированных линией NF54 (использованной для экспериментов *in vitro*) и линией 3G8 (использованной в экспериментах с живыми IE), довольно существенно отличаются друг от друга своими аминокислотными последовательностями (44% идентичностей, 55% положительных результатов и 15% пробелов по данным BLAST). Тем не менее, активные соединения, идентифицированные с использованием одного генетического фона для анализов *in vitro*, оказались успешными в ингибировании связывания живых IE с очень разным генетическим фоном, снова подтверждая наши результаты в [47] с использованием совершенно разных соединений. Мы полагаем, что наш подход универсален для идентификации антиадгезионных соединений против различных пар рецептор-домен, несмотря на значительное разнообразие доменов / белков PfEMP1.

Исследования цитотоксичности продемонстрировали индекс селективности (SI, отношение 50% цитотоксической концентрации (CC<sub>50</sub>) на линиях клеток человека к концентрации ингибирования 50% связывания (IC<sub>50</sub>) между поверхностно-иммобилизованными рецепторами и живым IE) ~70 и ~37 для этих двух соединений соот-

ветственно. Это отличный результат, так как  $SI > 10$  считается минимально приемлемым, а более чем 50-кратное значение  $SI$  является идеальным для целевого профиля соединения кандидата (TCP-1) [48], поскольку обычные лекарственные средства, убивающие малярию, в крови должны проникать как минимум через 3 мембраны. (красные кровяные тельца, паразитофорная вакуоль и плазматическая мембрана паразита). В случае введения в кровь антиадгезионных препаратов они должны немедленно воздействовать на внешнюю поверхность IE. Таким образом, эти два идентифицированных основных соединения обеспечивают отличную отправную точку для разработки лекарств против адгезии против SM и CM, в которых адгезия IE к рецептору ICAM-1 играет чрезвычайно важную патологическую роль.

Как мы упоминали выше, связывание с ICAM-1 и EPCR является предпосылкой SM и CM. Многие паразиты, которые стали причиной SM или CM, продемонстрировали наличие как ICAM-1-связывающих, так и EPCR-связывающих доменов в тандеме внутри экспрессированных молекул PfEMP1 [59, 60, 92–96]. Даже если оба домена в тандеме необходимы для развития SM и/или CM, лекарства для успешного блокирования секвестрации не обязательно должны ингибировать связывание обоих доменов с соответствующими рецепторами. В этом случае простое ингибирование связывания с ICAM-1 может значительно снизить эффективность секвестрации IE, особенно в микрососудах головного мозга, где EPCR экспрессируется на низких уровнях, а ICAM-1 экспрессируется на высоких уровнях и дополнительно увеличивается во время воспалений головного мозга (обзор [97]), включая воспаление при CM, индуцированное TNF $\alpha$  (обзор [98]). В этом отношении идентификация других соединений, которые будут не только предотвращать, но и обращать вспять секвестрацию ICAM-1, может дать значительное преимущество в дополняющем лечении с помощью антиадгезионных препаратов. Однако это может оказаться нетривиальной задачей, так как мы и другие обнаружили, что ICAM-1 связывается с ICAM-1-связывающими доменами DBL с чрезвычайно высокой avidностью до 2–4 нМ [46, 59]. Соединения, которые давали бы нужный эффект, скорее всего, должны действовать аллостерическим, а не конкурентным способом. Идентифицированные нами молекулярные структуры, рассмотренные здесь [47, 91], не способны разрушить сформированные комплексы между ICAM-1 рецептором и доменом. Таким образом, молекулы с этой особенностью еще предстоит открыть. Тем не менее, простое блокирование связывания ICAM-1 может быть достаточным для уменьшения или предотвращения пато-

логии продолжающейся секвестрации IE в SM или CM, что следует выяснить экспериментально в будущих исследованиях.

### IX. ПРОБЛЕМЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРОТИВОМАЛЯРИЙНЫХ АНТИАДГЕЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Поскольку лекарства против адгезии в целом не убивают паразитов малярии (если они убивают, это будет дополнительным важным бонусом), нелегко оправдать их испытания на людях, больных тяжелыми формами малярии. Один из их эффектов – это уменьшение воспаления эндотелиальных клеток (EC) путем предотвращения или отмены цитоадгезии IE. Это может быть изучено *in vitro* путем инкубации EC с IE, которые могут прилипнуть к этим клеткам (например, CSA-связывающие IE и клетки BeWo, полученные из трофобласта человека, экспрессирующие CSA, или связывающие ICAM-1 IE и TNF $\alpha$ -стимулированные эндотелиальные клетки человеческих почечных сосудов (HUVEC), экспрессирующие ICAM1) в присутствии и в отсутствие антиадгезионных соединений с последующим обнаружением воспалительных молекул, секретируемых этими клетками. Однако эти эффекты нелегко продемонстрировать *in vivo* в доклинических исследованиях, поскольку не существует подходящей животной модели для малярии *P. falciparum*. Белки PfEMP1 специфичны только для видов *P. falciparum*, а виды малярии, поражающие грызунов, сильно различаются и не имеют белков, гомологичных PfEMP1. Даже модель малярии гуманизированных мышей [99], где иммунодефицитным лабораторным мышам NOD-scid гамма (NSG) вводят человеческие эритроциты в течение нескольких дней для замены эритроцитов мыши, а затем заражают *P. falciparum* для установления инфекции, здесь не подойдет, поскольку эндотелиальные рецепторы мыши, несмотря на гомологию, отличаются от рецепторов человека, взаимодействующих с белками PfEMP1, и не обязательно дадут адекватную цитоадгезию IE. Следовательно, помимо проверки цитотоксичности таких соединений на клетках, животных и людях, необходимо также разработать модели тестирования их антиадгезионных свойств. Некоторые приматы, не относящиеся к человекообразным, такие как обезьяны *Aotus* [100], потенциально могут стать подходящими моделями для тестирования секвестрации IE и активности антиадгезионных препаратов.

## Х. ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИАДГЕЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДРУГИХ ЦЕЛЕЙ

Двухэтапный подход, разработанный нами для высокопроизводительной идентификации антиадгезионных соединений, может быть полезен при лечении других заболеваний, где важную роль в патологии играют взаимодействия между двумя известными молекулами / молекулярными структурами, например, при инфицировании клеток вирусами, паразитами, или бактериальными патогенами через специфические рецепторы. Идентификация антиадгезионных соединений из больших библиотек методом НТ *in vitro* с последующим тестированием этих активных соединений *in vivo* или *ex vivo* может значительно ускорить открытие новых терапевтических средств для других заболеваний.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарю всех соавторов наших совместных опубликованных статей, которые были здесь упомянуты. Финансирование нашей работы, описанной здесь, было предоставлено Фондом Билла и Мелинды Гейтс (гранты 29202 и 1634); НИН (гранты 1R21AI064503, 1R56AI083668, 1R01AI092120) и стартовый фонд Атлантического университета Флориды (FAU).

### ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. World Malaria Report (2019).
2. Hughes, K.R., Biagini, G.A., Craig, A.G., (2010) Continued cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells after antimalarial treatment. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **169** (2), 71–78.
3. Duffy, P.E., Acharya, P., Oleinikov, A.V. (2016) Cytoadherence. In: Hommel M, Kremsner PG (eds) *Encyclopedia of Malaria*. Springer Science and Business Media, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Germany. doi:<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8757-9>.
4. Fried, M., Duffy, P.E. (1996) Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*, **272** (5267), 1502–1504.
5. Miller, L.H., Good, M.F., Milon, G. (1994) Malaria pathogenesis. *Science*, **264** (5167), 1878–1883.
6. Newbold, C., Warn, P., Black, G., Berendt A, Craig A, Snow B, Msobo M, Peshu N, Marsh K (1997) Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **57** (4), 389–398.
7. Turner, G.D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T.M., Looareesuwan, S., Buley, I.D., Gatter, K.C., Newbold, C.I., Pukritayakamee, S., Nagachinta, B., et al. (1994) An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

- Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *The American Journal of Pathology*, **145** (5), 1057–1069.
8. Duffy PE, Fried M (2003) Antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infection and Immunity*, **71** (11), 6620–6623.
  9. Fried, M., Duffy, P.E. (1998) Maternal malaria and parasite adhesion. *Journal of Molecular Medicine*, **76** (3–4), 162–171.
  10. Fried, M., Avril, M., Chaturvedi, R., Fernandez, P., Lograsso, J., Narum, D., Nielsen, M.A., Oleinikov, A.V., Resende, M., Salanti, A., Saveria, T., Williamson, K., Dicko, A., Scherf, A., Smith, J.D., Theander, T.G., Duffy, P.E. (2013) Multilaboratory approach to preclinical evaluation of vaccine immunogens for placental malaria. *Infection and Immunity*, **81** (2), 487–495.
  11. Oleinikov, A.V., Amos, E., Frye, I.T., Rossmagle, E., Mutabingwa, T.K., Fried, M., Duffy, P.E. (2009) High throughput functional assays of the variant antigen PfEMP1 reveal a single domain in the 3D7 *Plasmodium falciparum* genome that binds ICAM1 with high affinity and is targeted by naturally acquired neutralizing antibodies. *PLOS Pathogens*, **5** (4), e1000386.
  12. Cohen, S., Mc, G.I., Carrington, S. (1961) Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, **192**, 733–737.
  13. Harrington, W.E., Mutabingwa, T.K., Muehlenbachs, A., Sorensen, B., Bolla, M.C., Fried, M., Duffy, P.E. (2009) Competitive facilitation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria parasites in pregnant women who receive preventive treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **106** (22), 9027–9032.
  14. Hsieh, F.L., Turner, L., Bolla, J.R., Robinson, C.V., Lavstsen, T., Higgins, M.K. (2016) The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. *Nature Communications*, **7** (12837), 12837.
  15. Fairhurst, R.M., Wellem, T.E. (2006) Modulation of malaria virulence by determinants of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 display. *Current Opinion in Hematology*, **13** (3), 124–130.
  16. Ch'ng, J.H., Moll, K., Quintana, Mdel P., Chan, S.C., Masters, E., Moles, E., Liu, J., Eriksson, A.B., Wahlgren, M. (2016) Rosette-Disrupting Effect of an Anti-Plasmodial Compound for the Potential Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria Complications. *Scientific Reports*, **6** (29317), 29317.
  17. Barnwell, J.W., Asch, A.S., Nachman, R.L., Yamaya, M., Aikawa, M., Ingravallo, P. (1989) A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, **84** (3), 765–772.
  18. Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansley, J., Newbold, C.I., Marsh, K. (1989) Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **341** (6237), 57–59.
  19. Barragan, A., Spillmann, D., Carlson, J., Wahlgren, M. (1999) Role of glycans in *Plasmodium falciparum* infection. *Biochemical Society Transactions*, **27** (4), 487–493.
  20. David, P.H., Handunnetti, S.M., Leech, J.H., Gamage, P., Mendis, K.N. (1988) Rosetting: a new cytoadherence property of malaria-infected erythrocytes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **38** (2), 289–297.

21. Handunnetti, S.M., David, P.H., Perera, K.L., Mendis, K.N. (1989) Uninfected erythrocytes form «rosettes(9,5 пр) around Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **40** (2), 115–118.
22. Dondorp, A.M. (2008) Clinical significance of sequestration in adults with severe malaria. *Transfusion Clinique et Biologique*, **15** (1–2), 56–57. Epub 2008 May 2023.
23. Vasquez, A.M., Segura, C., Blair, S. (2013) Induction of pro-inflammatory response of the placental trophoblast by Plasmodium falciparum infected erythrocytes and TNF. *Malaria Journal*, **12** (421), 421.
24. Basilico, N., Mondani, M., Parapini, S., Speciale, L., Ferrante, P., Taramelli, D. (2004) Plasmodium falciparum parasitized red blood cells modulate the production of endothelin-1 by human endothelial cells. *Minerva Medica*, **95** (2), 153–158.
25. Yipp, B.G., Robbins, S.M., Resek, M.E., Baruch, D.I., Looareesuwan, S., Ho, M. (2003) Src-family kinase signaling modulates the adhesion of Plasmodium falciparum on human microvascular endothelium under flow. *Blood*, **101** (7), 2850–2857.
26. Jenkins, N., Wu, Y., Chakravorty, S., Kai, O., Marsh, K., Craig, A. (2007) Plasmodium falciparum intercellular adhesion molecule-1-based cytoadherence-related signaling in human endothelial cells. *The Journal of Infectious Diseases*, **196** (2), 321–327.
27. Adams, S., Brown, H., Turner, G. (2002) Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends in Parasitology*, **18** (8), 360–366.
28. Cruz, L.N., Wu, Y., Craig, A.G., Garcia, C.R. (2012) Signal transduction in Plasmodium-Red Blood Cells interactions and in cytoadherence. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **84** (2), 555–572.
29. Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A., Wellem, T.E. (1995) The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell*, **82** (1), 89–100.
30. Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I., Miller, L.H. (1995) Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, **82** (1), 101–110.
31. Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, **419** (6906), 498–511.
32. Biggs, B.A., Gooze, L., Wycherley, K., Wilkinson, D., Boyd, A.W., Forsyth, K.P., Edelman, L., Brown, G.V., Leech, J.H. (1990) Knob-independent cytoadherence of Plasmodium falciparum to the leukocyte differentiation antigen CD36. *Journal of Experimental Medicine*, **171** (6), 1883–1892.

33. Scherf, A., Lopez-Rubio, J.J., Riviere, L. (2008) Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*, **62**, 445–470.
34. Roberts, D.J., Craig, A.G., Berendt, A.R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K., Newbold, C.I. (1992) Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*, **357** (6380), 689–692.
35. Smith, J.D., Craig, A.G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagen, T., Pinches, R., Baruch, D.I., Newbold, C.I., Miller, L.H. (2000) Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97** (4), 1766–1771.
36. Rask, T.S., Hansen, D.A., Theander, T.G., Gorm Pedersen, A., Lavstsen, T. (2010) *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes--divide and conquer. *PLOS Computational Biology*, **6** (9). (pii):e1000933.
37. McHenry, A.M., Adams, J.H. (2006) The crystal structure of *P. knowlesi* DBPalpha DBL domain and its implications for immune evasion. *Trends in Biochemical Sciences*, **31** (9), 487–491.
38. Singh, S.K., Hora, R., Belrhali, H., Chitnis, C.E., Sharma, A. (2006) Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature*, **439** (7077), 741–744.
39. Higgins, M.K. (2008) The structure of a chondroitin sulfate-binding domain important in placental malaria. *Journal of Biological Chemistry*, **283** (32), 21842–21846.
40. Singh, K., Gittis, A.G., Nguyen, P., Gowda, D.C., Miller, L.H., Garboczi, D.N. (2008) Structure of the DBL3x domain of pregnancy-associated malaria protein VAR2CSA complexed with chondroitin sulfate A. *Nature Structural & Molecular Biology*, **24**, 24.
41. Klein, M.M., Gittis, A.G., Su, H.P., Makobongo, M.O., Moore, J.M., Singh, S., Miller, L.H., Garboczi, D.N. (2008) The cysteine-rich interdomain region from the highly variable *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 exhibits a conserved structure. *PLOS Pathogens*, **4** (9), e1000147.
42. Howell, D.P.G., Samudrala, R., Smith, J.D. (2006) Disguising itself—insights into *Plasmodium falciparum* binding and immune evasion from the DBL crystal structure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **148** (1), 1–9.
43. Chakravorty, S.J., Hughes, K.R., Craig, A.G. (2008) Host response to cytoadherence in *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Society Transactions*, **36** (Pt 2), 221–228.
44. Oleinikov, A.V., Rosnagle, E., Francis, S., Mutabingwa, T.K., Fried, M., Duffy, P.E. (2007) Effects of sex, parity, and sequence variation on seroreactivity to candidate pregnancy malaria vaccine antigens. *The Journal of Infectious Diseases*, **196** (1), 155–164.
45. Oleinikov, A.V., Voronkova, V.V., Frye, I.T., Amos, E., Morrison, R., Fried, M., Duffy, P.E. (2012) A Plasma Survey Using 38 PfEMP1 Domains Reveals Frequent Recognition of the *Plasmodium falciparum* Antigen VAR2CSA among Young Tanzanian Children. *PLoS ONE*, **7** (1), e311011. doi:10.1371/journal.pone.0031011.
46. Gullingsrud, J., Saveria, T., Amos, E., Duffy, P.E., Oleinikov, A.V. (2013) Structure-function-immunogenicity studies of PfEMP1 domain DBL2betaPF11\_0521, a malaria parasite ligand for ICAM-1. *PLoS One*, **8** (4), e61323.

47. Gullingsrud, J., Milman, N., Saveria, T., Chesnokov, O., Williamson, K., Srivastava, A., Gamain, B., Duffy, P.E., Oleinikov, A.V. (2015) High throughput screening platform identifies small molecules that prevent sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of Infectious Diseases*, **211** (7), 1134–1143.
48. Chesnokov, O., Merritt, J., Tcherniuk, S.O., Milman, N., Oleinikov, A.V. (2018) *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes can bind to host receptors integrins  $\alpha$ V $\beta$ 3 and  $\alpha$ V $\beta$ 6 through DBL $\Delta$ 1\_D4 domain of PFL2665c PfEMP1 protein. *Scientific Reports*, **8** (1), 17871. doi:10.1038/s41598-018-36071-2.
49. Quintana, M.D.P., Ecklu-Mensah, G., Tcherniuk, S.O., Ditlev, S.B., Oleinikov, A.V., Hviid, L., Lopez-Perez, M. (2019) Comprehensive analysis of Fc-mediated IgM binding to the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family in three parasite clones. *Scientific Reports*, **9** (1), 6050. doi:10.1038/s41598-019-42585-0.
50. Salanti, A., Dahlback, M., Turner, L., Nielsen, M.A., Barfod, L., Magistrado, P., Jensen, A.T., Lavstsen, T., Ofori, M.F., Marsh, K., Hviid, L., Theander, T.G. (2004) Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *Journal of Experimental Medicine*, **200** (9), 1197–1203.
51. Salanti, A., Staalsoe, T., Lavstsen, T., Jensen, A.T., Sowa, M.P., Arnot, D.E., Hviid, L., Theander, T.G. (2003) Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Molecular Microbiology*, **49** (1), 179–191.
52. Viebig, N.K., Levin, E., Dechavanne, S., Rogerson, S.J., Gysin, J., Smith, J.D., Scherf, A., Gamain, B. (2007) Disruption of var2csa gene impairs placental malaria associated adhesion phenotype. *PLoS One*, **2** (9), e910.
53. Duffy, M.F., Maier, A.G., Byrne, T.J., Marty, A.J., Elliott, S.R., O'Neill, M.T., Payne, P.D., Rogerson, S.J., Cowman, A.F., Crabb, B.S., Brown, G.V. (2006) VAR2CSA is the principal ligand for chondroitin sulfate A in two allogeneic isolates of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **148** (2), 117–124.
54. Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B.J., Duffy, P.E. (1998) Maternal antibodies block malaria. *Nature*, **395** (6705), 851–852.
55. Soerli, J., Barfod, L., Lavstsen, T., Bernasconi, N.L., Lanzavecchia, A., Hviid, L. (2009) Human monoclonal IgG selection of *Plasmodium falciparum* for the expression of placental malaria-specific variant surface antigens. *Parasite Immunology*, **31** (6), 341–346.
56. Ochola, L.B., Siddondo, B.R., Ocholla, H., Nkya, S., Kimani, E.N., Williams, T.N., Makale, J.O., Liljan-der, A., Urban, B.C., Bull, P.C., Szeszak, T., Marsh, K., Craig, A.G. (2011) Specific receptor usage in *Plasmodium falciparum* cytoadherence is associated with disease outcome. *PLoS ONE*, **6** (3), e14741. doi:10.1371/journal.pone.0014741.
57. Tuikue Ndam, N., Moussiliou, A., Lavstsen, T., Kamaliddin, C., Jensen, A.T.R., Mama, A., Tahar, R., Wang, C.W., Jespersen, J.S., Alao, J.M., Gamain, B., Theander, T.G., Deloron, P. (2017) Parasites Causing Cerebral Falciparum Malaria Bind Multiple Endothelial Receptors and Express EPCR and ICAM-1-Binding PfEMP1. *The Journal of Infectious Diseases*, **215** (12), 1918–1925. doi:10.1093/infdis/jix230.
58. Moxon, C.A., Wassmer, S.C., Milner, D.A., Jr., Chisala, N.V., Taylor, T.E., Seydel, K.B., Molyneux, M.E., Fa-

- ragher, B., Esmon, C.T., Downey, C., Toh, C.H., Craig, A.G., Heyderman, R.S. (2013) Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children. *Blood*, **122** (5), 842–851.
59. Lennartz, F., Adams, Y., Bengtsson, A., Olsen, R.W., Turner, L., Ndam, N.T., Ecklu-Mensah, G., Moussiliou, A., Ofori, M.F., Gamain, B., Lusingu, J.P., Petersen, J.E., Wang, C.W., Nunes-Silva, S., Jespersen, J.S., Lau, C.K., Theander, T.G., Lavstsen, T., Hviid, L., Higgins, M.K., Jensen, A.T. (2017) Structure-Guided Identification of a Family of Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Cerebral Malaria. *Cell Host & Microbe*, **21** (3), 403–414. doi:10.1016/j.chom.2017.02.009.
60. Avril, M., Bernabeu, M., Benjamin, M., Brazier, A.J., Smith, J.D. (2016) Interaction between Endothelial Protein C Receptor and Intercellular Adhesion Molecule 1 to Mediate Binding of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes to Endothelial Cells. *mBio*, **7** (4), e00615-16. doi:10.1128/mBio.00615-16.
61. Howell, D.P., Levin, E.A., Springer, A.L., Kraemer, S.M., Phippard, D.J., Schief, W.R., Smith, J.D. (2008) Mapping a common interaction site used by Plasmodium falciparum Duffy binding-like domains to bind diverse host receptors. *Molecular Microbiology*, **67** (1), 78–87.
62. Bengtsson, A., Joergensen, L., Rask, T.S., Olsen, R.W., Andersen, M.A., Turner, L., Theander, T.G., Hviid, L., Higgins, M.K., Craig, A., Brown, A., Jensen, A.T. (2013) A Novel Domain Cassette Identifies Plasmodium falciparum PfEMP1 Proteins Binding ICAM-1 and Is a Target of Cross-Reactive, Adhesion-Inhibitory Antibodies. *Journal of Immunology*, **190** (1), 240–249. doi:10.4049/jimmunol.1202578.
63. Bernabeu, M., Smith, J.D. (2017) EPCR and Malaria Severity: The Center of a Perfect Storm. *Trends in Parasitology*, **33** (4), 295–308. doi:10.1016/j.pt.2016.11.004.
64. Smith, J.D. (2014) The role of PfEMP1 adhesion domain classification in Plasmodium falciparum pathogenesis research. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **195** (2), 82–87.
65. Goncalves, B.P., Huang, C.Y., Morrison, R., Holte, S., Kabyemela, E., Prevots, D.R., Fried, M., Duffy, P.E. (2014) Parasite burden and severity of malaria in Tanzanian children. *The New England Journal of Medicine*, **370** (19), 1799–1808.
66. Hogh, B. (1996) Clinical and parasitological studies on immunity to Plasmodium falciparum malaria in children. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Suppl. **102**, 1–53.
67. Jensen, A.R., Adams, Y., Hviid, L. (2020) Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunological Reviews*, **293** (1), 230–252. doi:10.1111/imr.12807.
68. Nishanth, G., Schlüter, D. (2019) Blood-Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Trends in Parasitology*, **35** (7), 516–528. doi:10.1016/j.pt.2019.04.010.
69. Cunnington, A.J., Walther, M., Riley, E.M. (2013) Piecing together the puzzle of severe malaria. *Science Translational Medicine*, **5** (211), 211ps218.
70. Francischetti, I.M., Seydel, K.B., Monteiro, R.Q. (2008) Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation*, **15** (2), 81–107. doi:10.1080/10739680701451516.
71. Kim, H., Higgins, S., Liles, W.C., Kain, K.C. (2011) Endothelial activation and dysregulation in malaria:

- a potential target for novel therapeutics. *Current Opinion in Hematology*, **18** (3), 177–185. doi:10.1097/MOH.0b013e328345a4cf.
72. van der Heyde, H.C., Nolan, J., Combes, V., Gramaglia, I., Grau, G.E. (2006) A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in Parasitology*, **22** (11), 503–508. doi:10.1016/j.pt.2006.09.002.
  73. Dormeyer, M., Adams, Y., Kramer, B., Chakravorty, S., Tse, M.T., Pegoraro, S., Whittaker, L., Lanzer, M., Craig, A. (2006) Rational design of anticytoadherence inhibitors for *Plasmodium falciparum* based on the crystal structure of human intercellular adhesion molecule 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50** (2), 724–730.
  74. Janes, J.H., Wang, C.P., Levin-Edens, E., Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Melcher, M., Mercereau-Puijalon, O., Smith, J.D. (2011) Investigating the host binding signature on the *Plasmodium falciparum* PfEMP1 protein family. *PLOS Pathogens*, **7** (5), e1002032. doi:10.1371/journal.ppat.1002032.
  75. Mu, J., Awadalla, P., Duan, J., McGee, K.M., Joy, D.A., McVean, G.A., Su, X.Z. (2005) Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum*. *PLOS Biology*, **3** (10), e335.
  76. Preston, M.D., Campino, S., Assefa, S.A., Echeverry, D.F., Ocholla, H., Amambua-Ngwa, A., Stewart, L.B., Conway, D.J., Borrmann, S., Michon, P., Zongo, I., Ouédraogo, J.B., Djimde, A.A., Doumbo, O.K., Nosten, F., Pain, A., Bousema, T., Drakeley, C.J., Fairhurst, R.M., Sutherland, C.J., Roper, C., Clark, T.G. (2014) A barcode of organellar genome polymorphisms identifies the geographic origin of *Plasmodium falciparum* strains. *Nature Communications*, **5**, 4052. doi:10.1038/ncomms5052.
  77. Padilla, A., Dovell, S., Chesnokov, O., Hoggard, M., Oleinikov, A.V., Mari, F. (2021) Conus venom fractions inhibit the adhesion of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains to the host vascular receptors. *Journal of proteomics*, **234**, 104083. doi:10.1016/j.jprot.2020.104083.
  78. Jin, A.H., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Himaya, S.W.A., Kaas, Q., Craik, D.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F. (2019) Conotoxins: Chemistry and Biology. *Chemical reviews* **119** (21), 11510–11549. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00207.
  79. Kaas, Q., Yu, R., Jin, A.H., Dutertre, S., Craik, D.J. (2012) ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Research*, **40** (Database issue), D325–D330. doi:10.1093/nar/gkr886.
  80. Fu, Y., Li, C., Dong, S., Wu, Y., Zhangsun, D., Luo, S. (2018) Discovery Methodology of Novel Conotoxins from Conus Species. *Marine drugs*, **16** (11), 16 (11), 417. doi:10.3390/md16110417.
  81. Bingham, J.P., Andrews, E.A., Kiyabu, S.M., Cabalteja, C.C. (2012) Drugs from slugs. Part II - conopeptide bioengineering. *Chemico-biological interactions*, **200** (2–3), 92–113. doi:10.1016/j.cbi.2012.09.021.
  82. Dhiman, V., Pant, D. (2021) Human health and snails. *Journal of immunoassay & immunochemistry*, **42** (3), 211–235. doi:10.1080/15321819.2020.1844751.
  83. Heddini, A., Pettersson, F., Kai, O., Shafi, J., Obiero, J., Chen, Q., Barragan, A., Wahlgren, M., Marsh, K. (2001) Fresh isolates from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors. *Infection and Immunity*, **69** (9), 5849–5856.

84. Houghten, R.A., Pinilla, C., Giulianotti, M.A., Appel, J.R., Dooley, C.T., Nefzi, A., Ostresh, J.M., Yu, Y., Maggiora, G.M., Medina-Franco, J.L., Brunner, D., Schneider, J. (2008) Strategies for the use of mixture-based synthetic combinatorial libraries: scaffold ranking, direct testing in vivo, and enhanced deconvolution by computational methods. *Journal of Combinatorial Chemistry*, **10** (1), 3–19. doi:10.1021/cc7001205.
85. Pinilla, C., Edwards, B.S., Appel, J.R., Yates-Gibbins, T., Giulianotti, M.A., Medina-Franco, J.L., Young, S.M., Santos, R.G., Sklar, L.A., Houghten, R.A. (2013) Selective agonists and antagonists of formyl-peptide receptors: duplex flow cytometry and mixture-based positional scanning libraries. *Molecular Pharmacology*, **84** (3), 314–324. doi:10.1124/mol.113.086595.
86. Reilley, K.J., Giulianotti, M., Dooley, C.T., Nefzi, A., McLaughlin, J.P., Houghten, R.A. (2010) Identification of two novel, potent, low-liability antinociceptive compounds from the direct in vivo screening of a large mixture-based combinatorial library. *The AAPS Journal*, **12** (3), 318–329. doi:10.1208/s12248-010-9191-3.
87. Pinilla, C., Appel, J.R., Houghten, R.A. (1996) Tea bag synthesis of positional scanning synthetic combinatorial libraries and their use for mapping antigenic determinants. *Methods in Molecular Biology*, **66**, 171–179. doi:10.1385/0-89603-375-9:171.
88. Lopez-Vallejo, F., Giulianotti, M.A., Houghten, R.A., Medina-Franco, J.L. (2012) Expanding the medically relevant chemical space with compound libraries. *Drug Discovery Today* **17** (13-14), 718–726. doi:10.1016/j.drudis.2012.04.001.
89. Singh, N., Guha, R., Giulianotti, M.A., Pinilla, C., Houghten, R.A., Medina-Franco, J.L. (2009) Chemoinformatic analysis of combinatorial libraries, drugs, natural products, and molecular libraries small molecule repository. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **49** (4), 1010–1024. doi:10.1021/ci800426u.
90. Wu, J., Zhang, Y., Maida, L.E., Santos, R.G., Welmaker, G.S., LaVoi, T.M., Nefzi, A., Yu, Y., Houghten, R.A., Toll, L., Giulianotti, M.A. (2013) Scaffold ranking and positional scanning utilized in the discovery of nAChR-selective compounds suitable for optimization studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, **56** (24), 10103–10117. doi:10.1021/jm401543h.
91. Chesnokov, O., Visitdesotrakul, P., Kalani, K., Nefzi, A., Oleinikov, A.V. (2021) Small Molecule Compounds Identified from Mixture-Based Library Inhibit Binding between Plasmodium falciparum Infected Erythrocytes and Endothelial Receptor ICAM-1. *International journal of molecular sciences*, **22** (11), 5659. doi:10.3390/ijms22115659.
92. Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S.S., Wang, C.W., Petersen, J.E., Avril, M., Brazier, A.J., Freeth, J., Jespersen, J.S., Nielsen, M.A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J.D., Higgins, M.K., Theander, T.G. (2013) Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*, **498** (7455), 502–505.
93. Kessler, A., Dankwa, S., Bernabeu, M., Harawa, V., Danziger, S.A., Duffy, F., Kampondeni, S.D., Potchen, M.J., Dambrauskas, N., Vigdorovich, V., Oliver, B.G., Hochman, S.E., Mowrey, W.B., MacCormick, I.J.C., Mandala, W.L., Rogerson, S.J., Sather, D.N., Aitchison, J.D., Taylor, T.E., Seydel, K.B., Smith, J.D., Kim, K. (2017) Linking EPCR-Binding PfEMP1 to Brain Swelling in Pediatric Cerebral Malaria. *Cell Host & Microbe*, **22** (5), 601–614.e605. doi:10.1016/j.chom.2017.09.009.

94. Olsen, R.W., Ecklu-Mensah, G., Bengtsson, A., Ofori, M.F., Lusingu, J.P.A., Castberg, F.C., Hviid, L., Adams, Y., Jensen, A.T.R. (2018) Natural and Vaccine-Induced Acquisition of Cross-Reactive IgG-Inhibiting ICAM-1-Specific Binding of a *Plasmodium falciparum* PfEMP1 Subtype Associated Specifically with Cerebral Malaria. *Infection and Immunity*, **86** (4), e00622-17. doi:10.1128/iai.00622-17.
95. Bernabeu, M., Gunnarsson, C., Vishnyakova, M., Howard, C.C., Nagao, R.J., Avril, M., Taylor, T.E., Seydel, K.B., Zheng, Y., Smith, J.D. (2019) Binding Heterogeneity of *Plasmodium falciparum* to Engineered 3D Brain Microvessels Is Mediated by EPCR and ICAM-1. *mBio*, **10** (3), e00420-19. doi:10.1128/mBio.00420-19.
96. Storm, J., Jespersen, J.S., Seydel, K.B., Szestak, T., Mbewe, M., Chisala, N.V., Phula, P., Wang, C.W., Taylor, T.E., Moxon, C.A., Lavstsen, T., Craig, A.G. (2019) Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. *EMBO molecular medicine*, **11** (2), e9164. doi:10.15252/emmm.201809164.
97. Dietrich, J.B. (2002) The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *Journal of neuroimmunology*, **128** (1–2), 58–68. doi:10.1016/S0165-5728(02)00114-5.
98. Gimenez, F., Barraud de Lagerie, S., Fernandez, C., Pino, P., Mazier, D. (2003) Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **60** (8), 1623–1635. doi:10.1007/s00018-003-2347-x.
99. Jiménez-Díaz, M.B., Mulet, T., Viera, S., Gómez, V., Garuti, H., Ibáñez, J., Alvarez-Doval, A., Shultz, L.D., Martínez, A., Gargallo-Viola, D., Angulo-Barturen, I. (2009) Improved murine model of malaria using *Plasmodium falciparum* competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2Rγ<sup>manull</sup> mice engrafted with human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53** (10), 4533–4536. doi:10.1128/aac.00519-09.
100. Schmidt, L.H. (1973) Infections with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the owl monkey - model systems for basic biological and chemotherapeutic studies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **67** (4), 446–474. doi:10.1016/0035-9203(73)90077-1.