

БИОИНФОРМАТИКА

УДК 577.152

©Коллектив авторов

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1

*Д.В. Акимов¹, Д.А. Филимонов¹, Т.А. Приказчикова², М.Б. Готтих²,
В.В. Пороиков¹*

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 г. Москва,
ул. Погодинская, 10; тел.: (095) 245-2753,
эл. почта: Vladimir.Poroikov@ibmc.msk.ru

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, г. Москва

Интеграза - фермент, необходимый для репликации вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1). В настоящее время ароматические производные дикетокарбоновых кислот рассматриваются в качестве перспективных ингибиторов интегразы ВИЧ-1. Одно из соединений, относящихся к этому классу, находится на стадии клинических испытаний. Мы создали выборку из 90 производных дикетокарбоновых кислот и провели обучение программы PASS. Точность прогноза антиинтегразной активности при скользящем контроле с исключением по одному составила 99%. Среди более чем 700 тысяч структур коммерчески доступных химических соединений проведен поиск новых потенциальных ингибиторов интегразы ВИЧ-1. Отобрано и исследовано 8 веществ, для которых эта активность была предсказана с относительно высокой вероятностью; для двух соединений наличие антиинтегразной активности подтверждено в эксперименте.

Ключевые слова: интеграза, ВИЧ-1, производные дикетокарбоновых кислот, компьютерное конструирование лекарств.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время применяемая во всем мире методика комбинированной терапии ВИЧ инфекции основана на использовании нуклеотидных и нуклеотидных ингибиторов обратной транскриптазы и ингибиторов протеазы [1, 2]. За последние годы был достигнут существенный прогресс в улучшении фармакотерапевтических свойств указанных классов лекарственных препаратов [3]. Комбинированная терапия ВИЧ-инфицированных больных с применением современных представителей этих классов ингибиторов приводит к снижению уровня вирусной нагрузки в плазме крови ниже определяемых величин, однако полного выздоровления не происходит [4, 5]. Кроме того, к этим лекарствам со временем вырабатывается вирусная устойчивость, а сами они обладают значительными побочными эффектами.

Кроме обратной транскриптазы и протеазы, ВИЧ-1 имеет третий фермент – интегразу, - необходимый для переноса и встраивания вирусного генома в хромосомы человека. Ингибиторы этого фермента могут пополнить арсенал имеющихся сегодня лекарственных препаратов, используемых в терапии ВИЧ/СПИД. Учитывая значительный интерес к созданию новых ингибиторов

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1

интегразы ВИЧ-1, представляется разумной попытка компьютерного поиска новых ингибиторов среди химических соединений из баз данных коммерчески доступных веществ. Можно надеяться, что применение компьютерного поиска позволит существенно повысить эффективность процесса разработки новых ингибиторов интегразы ВИЧ-1 за счет отсева веществ, для которых заведомо прогнозируется низкая вероятность наличия данной биологической активности, либо с высокой вероятностью прогнозируются токсические эффекты.

За 10 лет, прошедших с момента начала исследований интегразы как лекарственной мишени, было найдено и исследовано несколько классов ее ингибиторов: пептиды, нуклеотиды, сульфатированные катехолы, сульфонаты, ароматические производные дикетокарбоновых кислот и др. [6]. Наиболее перспективным классом в настоящее время считаются производные дикетокарбоновых кислот, имеющие высокую антиинтегразную активность и обладающие доказанной избирательностью к ферменту [7]. При этом одно из производных дикетокарбоновых кислот (S-1360) находится на стадии клинических испытаний. Учитывая это обстоятельство, компьютерный поиск проводился нами с использованием опубликованной в литературе информации для данного класса соединений.

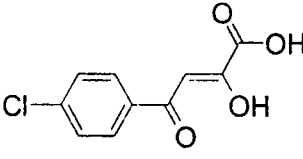
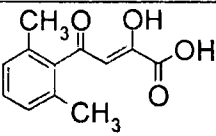
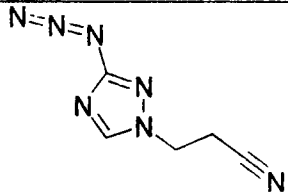
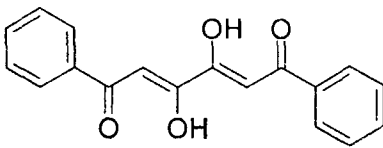
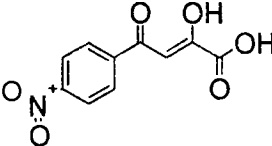
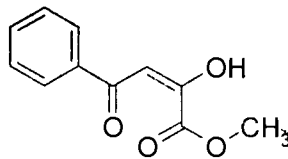
МЕТОДИКА. Для поиска новых потенциальных ингибиторов интегразы нами была создана обучающая выборка, состоящая из 90 ингибиторов интегразы, относящихся к классу ароматических производных дикетокарбоновых кислот и собранных из различных литературных источников [7-13]. Для всех отобранных соединений значения IC_{50} в отношении реакции переноса цепи были менее 100 мкМ. Выборка использовалась для обучения компьютерной программы PASS [14-16] и проведения процедуры скользящего контроля с исключением по одному. В результате обучения средняя ошибка прогноза данного вида активности при скользящем контроле составила ~0,8%; таким образом средняя точность прогноза ~99,2%. Это заметно выше, чем средняя точность ~85% почти для 1000 видов биологических активностей в стандартной программе PASS [16], что объясняется существенно меньшим химическим разнообразием ароматических производных дикетокарбоновых кислот по сравнению с ~50000 веществ обучающей выборки PASS. После обучения проводили поиск потенциальных ингибиторов в базах данных коммерчески доступных химических соединений. Были использованы базы данных ASINEX [17] и IBS [18] за 2004 год, общее количество химических веществ в которых составляет около 730 тысяч.

Исследование ингибирования реакций 3'-процессинга и переноса цепи. Определение анти-интегразной активности отобранных соединений проводили согласно стандартной методике [19]. Использованная в работе рекомбинантная интеграза так же была получена как описано в работе [19]. В качестве ДНК-субстрата интегразы использовали 21-звенный радиоактивно-меченый ДНК-дуплекс U5B/A, имитирующий U5 фрагмент ДНК-копии ВИЧ-1. Для введения радиоактивной метки олигонуклеотид U5B инкубировали с T4-полинуклеотидкиназой ("Fermentas") и [^{32}P]- γ -АТФ. Фермент инактивировали добавлением ЭДТА и нагреванием до 65°C в течение 10 минут. После этого к олигонуклеотиду U5B добавляли эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида U5A. Дуплекс U5B/A формировали медленным охлаждением смеси от 90°C до комнатной температуры в присутствии 100мМ NaCl. Полученный дуплекс U5B/A затем очищали от [^{32}P]- γ -АТФ на колонках Micro Bio-Spin 6 ("Amersham Biosciences"). Этот дуплекс (2,5 нМ) инкубировали в присутствии интегразы (100 нМ) и возрастающих концентраций ингибитора (0,1-100 мкМ) в 20 мкл буфера, содержащего 20 мМ HEPES (pH 7,2), 1 мМ DTT и 7,5 мМ $MgCl_2$ при 37°C в течение 2 часов. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл раствора, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 0,3 М ацетата натрия, 1 мМ ЭДТА и 0,125 мкг/мкл гликогена, интегразу экстрагировали фенолом, продукты реакции осаждали этанолом и ресуспендировали в 80% водном растворе формамида.

Продукты разделяли электрофоретически в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7М мочеви́на) с последующим анализом геля на приборе PhosphorImager ("Molecular Dynamics", США). По результатам исследований строили кривые зависимости эффективности протекания реакций от концентрации ингибитора, по ним определяли значения IC_{50} как концентрацию ингибитора, при которой реакция подавляется на 50%.

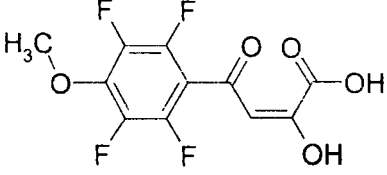
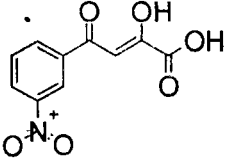
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При поиске новых структур потенциальных ингибиторов интегразы в коммерчески доступных базах данных химических соединений (ASINEX и IBS) мы обнаружили 8 веществ, для которых прогнозировалась антиинтегразная активность (таблица).

Таблица. Структуры потенциальных ингибиторов, найденных в базе данных IBS.

СТРУКТУРА	Прогноз ингибиторной активности (Pa)
 STOCK2S-36356	0,714
 STOCK1S-04849	0,598
 STOCK4S-04306	0,576
 STOCK4S-79879	0,545
 STOCK1S-10945	0,454
 STOCK4S-83532	0,356

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1

Таблица 1. Продолжение.

 <p>STOCK2S-05609</p>	0,332
 <p>STOCK1S-05951</p>	0,303

Примечание: Ра – прогнозируемая вероятность наличия антиинтегразной активности.

В результате биологического тестирования 8 соединений для двух из них было подтверждено наличие ингибирующей активности в отношении реакции переноса цепи, причем IC₅₀ составила 49 мкМ (рис. 1) и 75 мкМ соответственно (рис. 2).

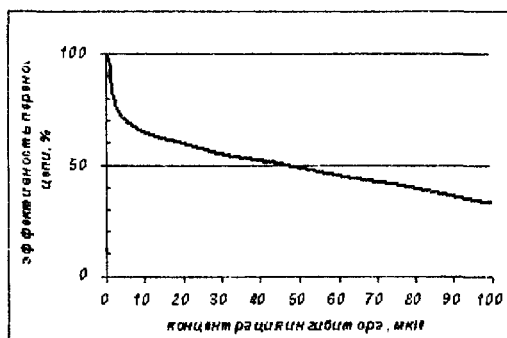
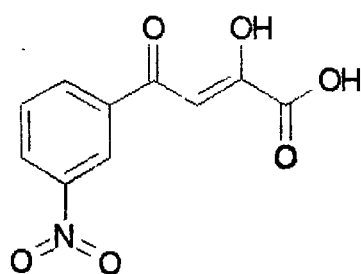


Рисунок 1.

Результаты экспериментальной оценки ингибирования интегразы ВИЧ-1 веществом STOCK1S-05951

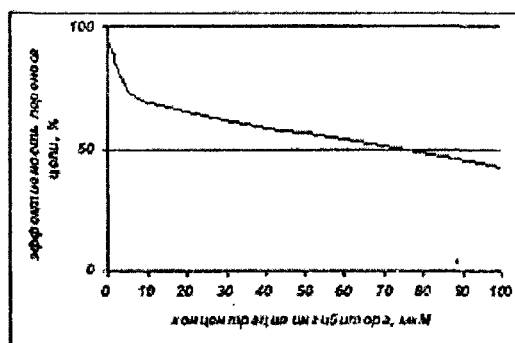
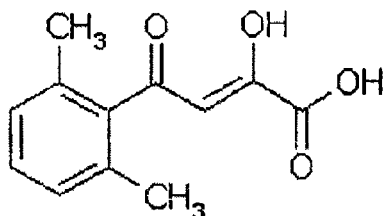


Рисунок 2.

Результаты экспериментальной оценки ингибирования интегразы ВИЧ-1 веществом STOCK1S-04849

Следует отметить, что несмотря на то, что поиск проводился среди достаточно обширной выборки химических веществ, лишь для 8 соединений прогнозируемая вероятность антиинтегразной активности составила более 30%. Интегразы ВИЧ-1 - довольно трудный объект для исследования: структура полноразмерного фермента все еще не получена ввиду высокой склонности интегразы к агрегации и низкой растворимости, что значительно осложняет попытки поиска ингибиторов с использованием молекулярного докинга. Как фермент, интегразы не имеют аналогов в клетках млекопитающих, что, с одной стороны, делает ее привлекательной мишенью для создания новых препаратов из-за вероятного снижения побочных эффектов таких лекарств, но, с другой стороны, ставит исследователей перед трудной задачей из-за невозможности привлечь опыт создания ингибиторов для аналогичного типа ферментов. Ароматические производные дикетокислот, в свою очередь, относятся к малораспространенному классу химических веществ, представленному в использованных базах данных весьма ограниченно. Таким образом, отобранные соединения, обладая новизной структуры, расширяют этот подкласс ингибиторов интегразы ВИЧ-1 и могут быть использованы в дальнейшем при рациональном поиске новых ингибиторов интегразы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Предложенный в настоящей работе подход по компьютерному поиску новых потенциальных ингибиторов интегразы ВИЧ-1 позволил отобрать и исследовать 8 новых химических соединений, для двух из которых анти-интегразная активность подтверждена в биологических экспериментах на очищенном ферменте. Полученные экспериментальные результаты расширяют представления исследователей об ингибиторах интегразы и, дополняя базу знаний, облегчат последующие попытки рационального поиска ингибиторов интегразы ВИЧ-1.

Авторы выражают благодарность компании InterBioScreen Ltd. (IBS) [18] и лично профессору В.Г. Карцеву за предоставленные образцы химических соединений для проведения биологического тестирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balzarini J. (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 1-27.
2. Vella S., Palmisano L. (2000) *Antivir. Res.*, **45**, 1-7.
3. Palella F.J.J., Delaney K.M., Moorman A.C. (1998) *N. Engl. J. Med.* **38**, 853-860.
4. Ramratnam B., Mittler J.E., Zhang L., Boden D., Hurley A., Fang F., Macken C.A., Perelson A.S., Markowitz M., Ho D.D. (2000) *Nat. Med.*, **6**, 82-85.
5. Finzi D., Blankson J., Siliciano J.D., Margolick J.B., Chadwick K., Pierson T., Smith K., Lisiewicz J., Lori F., Flexner C., Quinn T.C., Chaisson R.E., Rosenberg E., Walker B., Gange S., Gallant J., Siliciano R.F. (1999) *Nat. Med.*, **5**, 512-517.
6. Johnson A.A., Marchand C., Pommier Y. (2004) *Curr. Top. Med. Chem.*, **4**, 1059-1077.
7. Sechi M., Derudas M., Dallochio R., Dessi A., Bacchi A., Sannia L., Carta F., Palomba M., Ragab O., Chan C., Shoemaker R., Sei S., Dayam R., Neamati N. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 5298-310.
8. Wai J.S., Egbertson M.S., Payne L.S., Fisher T.E., Embrey M.W., Tran L.O., Melamed J.Y., Langford H.M., Guare J.P. Jr, Zhuang L., Grey V.E., Vacca J.P., Holloway M.K., Naylor-Olsen A.M., Hazuda D.J., Felock P.J., Wolfe A.L., Stillmock K.A., Schleif W.A., Gabryelski L.J., Young S.D. (2000) *J. Med. Chem.*, **43**, 4923-4926.
9. Pais G.C., Zhang X., Marchand C., Neamati N., Cowansage K., Svarovskaia E.S., Pathak V.K., Tang Y., Nicklaus M., Pommier Y., Burke T.R. Jr. (2002) *J. Med. Chem.*, **45**, 3184-94.

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1

10. Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., Miller M.D. (2000) *Science.*, **287**, 646-650.
11. Grobler J.A., Stillmock K., Hu B., Witmer M., Felock P., Espeseth A.S., Wolfe A., Egbertson M., Bourgeois M., Melamed J., Wai J.S., Young S., Vacca J., Hazuda D.J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 6661-6666.
12. Marchand C., Zhang X., Pais G.C., Cowansage K., Neamati N., Burke T.R. Jr., Pommier Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12596-12603.
13. Long Y.Q., Jiang X.H., Dayam R., Sanchez T., Shoemaker R., Sei S., Neamati N. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 2561-2573.
14. Poroikov V.V., Filimonov D.A. (2002) *J. Comput. Aid. Molec. Des.*, **16**, 819-824.
15. Poroikov V., Filimonov D. (2005) in: *Predictive Toxicology* (C. Helma ed.) N.Y.: Taylor & Francis, pp. 459-478.
16. <http://www.ibmc.msk.ru/PASS>
17. <http://www.asinex.com/>
18. <http://www.ibscreen.com/>
19. Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C. & Mouscadet J.F. (2000) *Biochemistry* **39**, 9285-9294.

Поступила: 22. 04. 2005 г.

COMPUTER-AIDED FINDING OF NEW HIV-1 INTEGRASE INHIBITORS

D.V. Akimov¹, D.A. Filimonov¹, T.A. Prikazchikova², M.B. Gottikh¹, V.V. Poroikov¹

¹ V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy Medical Sciences, Pogodinskaya str., 10, Moscow, 119121 Russia; e-mail: Vladimir.Poroikov@ibmc.msk.ru

² A.N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow

HIV-1 integrase is the third enzyme essential for viral replication. It represents an attractive target for new anti-HIV drugs. Diketo acids represent the most prospective class of integrase inhibitors; one of them (S1360) is currently under clinical trials. We prepared the training set containing 90 diketoacid derivatives and performed re-training of computer program PASS. Average accuracy of prediction in LOO cross-validation for HIV-1 integrase inhibitors was shown to be 99%. We selected eight new potential HIV-1 integrase inhibitors among about the 700.000 substances from the databases of commercially available chemicals; anti-integrase activity was found experimentally in two selected compounds.

Key words: integrase, HIV-1, diketo acid derivatives, QSAR.