

УДК 577.152.3

© Коллектив авторов

## SPR БИОСЕНСОРНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА АНАЛИЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ЦИТОХРОМОМ P450 51A1 (CYP51A1) ЧЕЛОВЕКА

*О.В. Гнеденко<sup>1\*</sup>, Л.А. Калужский<sup>1</sup>, А.А. Мольнар<sup>1</sup>, А.В. Янцевич<sup>2</sup>,  
Д.В. Муха<sup>2</sup>, А.А. Гилеп<sup>2</sup>, С.А. Усанов<sup>2</sup>, В.А. Стоник<sup>3</sup>, А.С. Иванов<sup>1</sup>,  
А.В. Лисица<sup>1</sup>, А.И. Арчаков<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
“Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н.Ореховича” Российской академии медицинских наук,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; факс: 7(495)245-0857;  
эл. почта: oksana\_gnedenko@pochta.ru

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский  
институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Разработана SPR тест-система для скрининга лигандов цитохрома P450 51A1 (CYP51A1) человека. Тест-система проверена с помощью известных азольных ингибиторов цитохромов P450. Обнаружена избирательность взаимодействия исследованных азолов с цитохромом P450 51A1 человека и показано, что наибольшим сродством к цитохрому обладает кетоконазол. На примере 19 ранее не тестированных стероидных и тритерпеновых соединений показана эффективность созданной SPR тест-системы при проведении автоматизированного скрининга лигандов цитохрома P450 51A1 человека.

**Ключевые слова:** цитохром P450 51A1 (CYP51A1) человека, SPR тест-система, ингибиторы CYP51A1, азолы, скрининг лигандов, атеросклероз.

**ВВЕДЕНИЕ.** Фармакологический контроль эндогенного синтеза холестерина занимает важное место в лечении и профилактике развития атеросклероза. Для этого в настоящее время в клинической практике используются препараты из группы статинов [1], которые ингибируют активность гидроксиметилглутарил-СоА-редуктазы (ГМГ-СоА-редуктазы, КФ 1.1.1.34), то есть прерывают первое звено в цепочке синтеза холестерина:

Ацетил-СоА → мевалонат → пиррофосфомевалонат →  
3-изопентенилпиррофосфат → 3,3-диметилаллилпиррофосфат →  
геранилпиррофосфат → фарнезилпиррофосфат → сквален →  
ланостерин → холестерин

\* - адресат для переписки

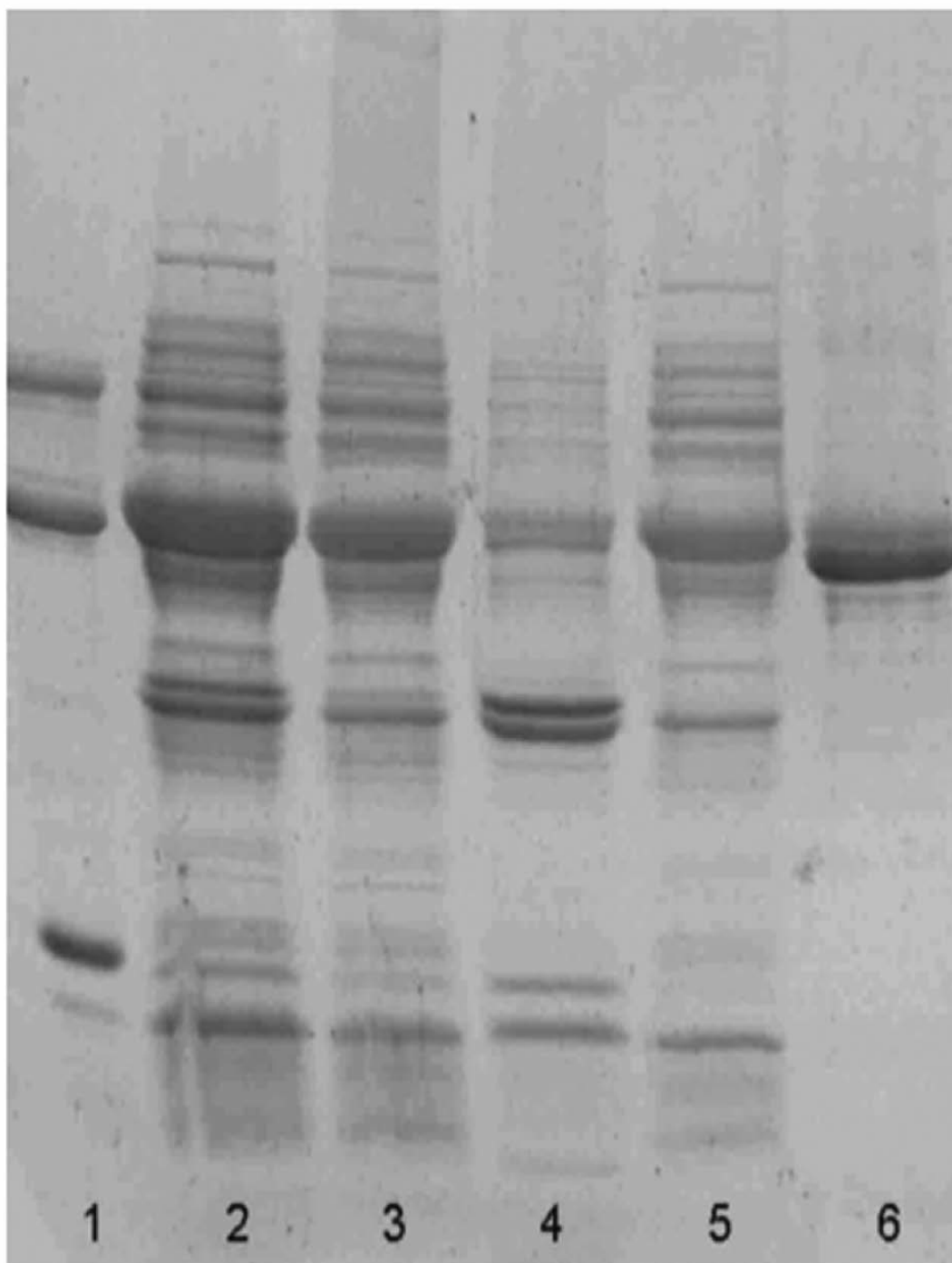
Негативный эффект использования статинов заключается в том, что ингибирование ГМГ-СоА-редуктазы останавливает синтез не только холестерина, но и других продуктов этого метаболического пути, что приводит к опасным побочным эффектам, в том числе печеночной недостаточности, скелетной миопатии и рабдомиолизу [2]. По этой причине актуальным остаётся создание препаратов, блокирующих эндогенный синтез холестерина после стадии образования фарнезилпирофосфата, и, тем самым, не затрагивающих биосинтез изопреноидов [3]. Цитохром P450 51A1 человека (CYP51A1A1), катализирующий одну из заключительных стадий биосинтеза холестерина, а именно, окислительное удаление 14 $\alpha$ -метильной группы ланостерина [4], рассматривается как перспективная мишень для создания лекарств нового поколения.

В настоящий момент известны 3 кристаллические структуры CYP51A1: белок без лигандов (код PDB 3JUV) и два комплекса с азольными ингибиторами - кетоконазолом (код PDB 3I3K) и эконазолом (код PDB 3JUS) [5]. Эти структурные данные могут быть использованы для компьютерного поиска и конструирования новых потенциальных ингибиторов CYP51A1 методами виртуального скрининга химических баз данных и 3D моделирования комплексов белок-лиганд [6].

Одной из проблем поиска новых ингибиторов CYP51A1 является экспериментальная проверка относительно большого числа компьютерных гипотез о действии низкомолекулярных соединений на активность фермента. Значительные трудности возникают из-за необходимости реконструкции *in vitro* сложной монооксигеназной системы с участием CYP51A1 [7]. Однако, экспериментальный скрининг может осуществляться с использованием на первом этапе простой тест-системы для получения выборки наиболее перспективных соединений, которые будут протестированы с использованием биохимической системы на втором этапе. В качестве тест-системы для первичного скрининга может выступать анализ взаимодействий низкомолекулярное соединение - белок с помощью оптического биосенсора, использующего эффект поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Известно, что SPR-биосенсоры успешно применяются для скрининга различных соединений [8-11]. Ранее также была показана эффективность применения SPR для анализа взаимодействия низкомолекулярных соединений с цитохромами P450 на примере связывания азольных ингибиторов с CYP3A4 [12].

Целью данной работы было создание SPR тест-системы для скрининга лигандов CYP51A1 и её проверка с использованием описанных в литературе ингибиторов цитохромов P450 (в том числе: кетоконазола, итраконазола, парконазола, пенконазола и лиарозола [13-15]), а также ряда стероидных и тритерпеновых соединений, обладающих структурным сходством с известными лигандами CYP51A1.

**МЕТОДИКА.** В работе был использован высокоочищенный рекомбинантный CYP51A1. Белок экспрессирован в клетках *E. coli* штамма DH-5 $\alpha$ , трансформированных плазмидной ДНК pCWori+CYP51hum. Клетки разрушали с использованием гомогенизатора Emulsiflex C5 ("Avestine", Канада), после чего белок солюбилизировали из мембран детергентом (ЧАПС). Нерастворимый материал удаляли центрифугированием (35000 g, 60 мин), а содержащийся в супернатанте фермент очищали до гомогенного состояния (>95% согласно данным ДСН-электрофореза в 12% ПААГ, рис. 1) с использованием метал-аффинной хроматографии (сорбент Ni<sup>2+</sup>-IDA сефароза 6B). Присутствующий в препарате имидазол удаляли с помощью адсорбционной хроматографии (сорбент - гидроксиапатит).



**Рисунок 1.**

ДСН электрофореграмма в 12 % ПААГ рекомбинантного СУР51А1 человека на различных стадиях выделения:

- 1 - стандарты молекулярных масс (84, 56, 16 кДа);
- 2 - образцы клеток *E. coli*, экспрессировавших белок;
- 3 - образец супернатанта, полученный после солюбилизации ЧАПС и фракционирования центрифугированием;
- 4 - нерастворимый осадок после солюбилизации ЧАПС и фракционирования центрифугированием;
- 5 - белки, не связывающиеся с сорбентом  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA;
- 6 - препарат фермента, использованный в работе.

## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ CYP51A1 С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Для экспериментальной проверки тест-системы анализа взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1 были использованы 8 соединений, полученных от фирмы “Sigma-Aldrich” (США) (таблица, соединения 1 - 8), и 19 стероидных и тритерпеновых соединений из лабораторной коллекции низкомолекулярных соединений (соединения 9 - 27).

Таблица. Список соединений, использованных для скрининга.

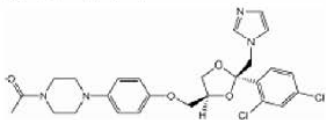
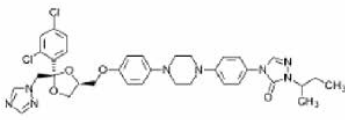
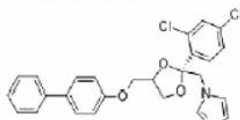
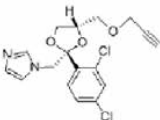
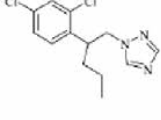
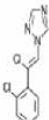
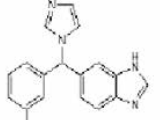
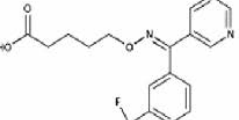
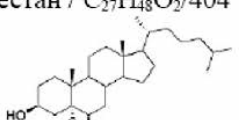
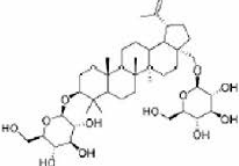
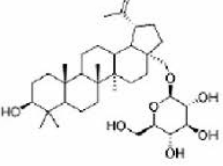
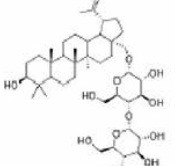
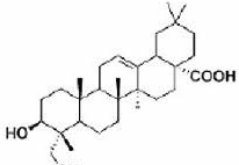
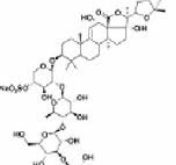
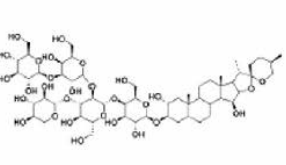
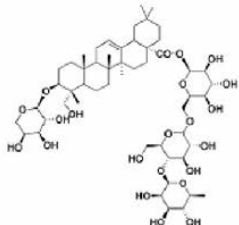
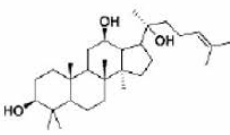
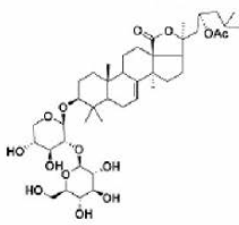
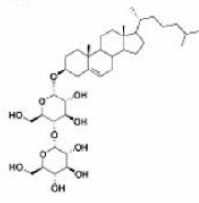
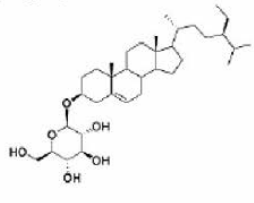
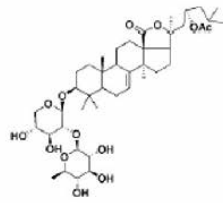
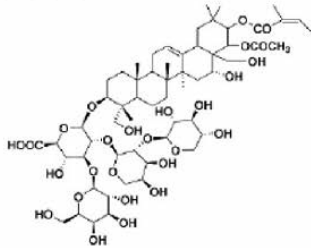
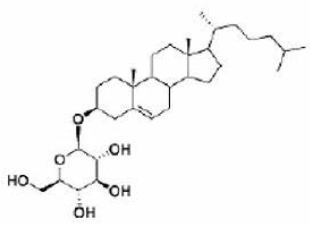
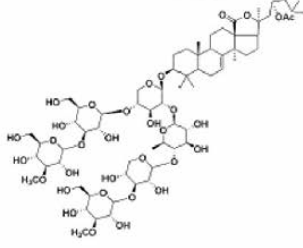
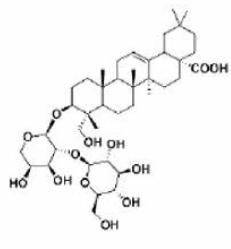
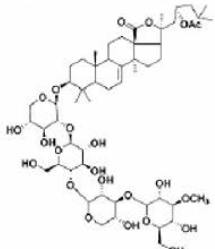
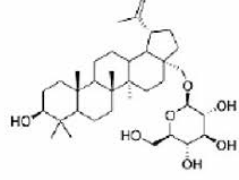
№ соединения название/формула/мол. вес, Da/ структурная формула		
<p>№1 кетоконазол / C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> / 531</p> 	<p>№2 итраконазол / C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>O / 705</p> 	<p>№3 доконазол / C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / 481</p> 
<p>№4 парконазол / C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / 367</p> 	<p>№5 пенконазол / C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub> / 284</p> 	<p>№6 лореклезол / C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub> / 274</p> 
<p>№7 лиарозол / C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub> / 308</p> 	<p>№8 ридогрел / C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / 366</p> 	<p>№9 3β,6β-дигидрокси-5α-холестан / C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub> / 404</p> 
<p>№10 бис-глюкозид бетулина / C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>12</sub> / 766</p> 	<p>№11 глюкозид бетулина / C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>7</sub> / 604</p> 	<p>№12 мальтозид бетулина / C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>12</sub> / 766</p> 
<p>№13 хедерагенин / C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub> / 472</p> 	<p>№14 голотурин А / C<sub>54</sub>H<sub>85</sub>NaO<sub>27</sub>S / 1221</p> 	<p>№15 дигитонин / C<sub>56</sub>H<sub>92</sub>O<sub>29</sub> / 1229</p> 

Таблица. Список соединений, использованных для скрининга (продолжение).

№ соединения название/ формула/ мол. вес/ структурная формула		
№16 каулозид D / $C_{53}H_{86}O_{22}$ / 1075 	№17 бетулафолиентриол / $C_{30}H_{52}O_3$ / 460 	№18 стихопозид B / $C_{43}H_{68}O_{14}$ / 809 
№19 мальтозид холестерина / $C_{39}H_{66}O_{11}$ / 710 	№20 глюкозид β-ситостерина / $C_{35}H_{60}O_6$ / 576 	№21 стихопозид A / $C_{43}H_{68}O_{13}$ / 793 
№22 теасапонин / $C_{59}H_{92}O_{27}$ / 1232 	№23 глюкозид холестерина / $C_{33}H_{56}O_6$ / 548 	№24 стихопозид C / $C_{68}H_{110}O_{32}$ / 1440 
№25 каулозид C / $C_{41}H_{66}O_{13}$ / 767 	№26 теленотозид B / $C_{55}H_{88}O_{23}$ / 1116 	№27 28-O-β-D-глюкопиранозид бетулина / $C_{36}H_{60}O_7$ / 604 

Следующие реагенты были получены от фирмы “GE Healthcare” (США): HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% детергент P20, 10 мМ HEPES, pH 7,4); 10 мМ ацетатный буфер, pH 4,0; набор реагентов



## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ CYP51A1 С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ

для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 М этаноламин-HCl, pH 8,5). Остальные реактивы аналитической чистоты были получены от фирмы "Sigma-Aldrich".

Для исследования межмолекулярных взаимодействий был использован оптический SPR-биосенсор Biacore T200 ("GE Healthcare"). Сигнал биосенсора регистрировался в каждом канале биосенсора независимо в резонансных единицах (RU, 1 RU = 1 пг белка/мм<sup>2</sup> поверхности оптического чипа) и представлялся в виде сенсограмм, показывающих его изменение во времени. Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5 ("GE Healthcare"), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана.

*Иммобилизация CYP51A1 на поверхности оптического чипа.* Оптимальное значение pH иммобилизационного буфера было выбрано с помощью процедуры pH-скаутинга, выполненного по стандартной методике [16]. Карбоксильные группы декстрана активировали путём пропускания смеси 0,2 М EDC/0,05 М NHS в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин с последующей промывкой HBS-буфером в течение 3 мин при той же скорости. Далее осуществляли иммобилизацию CYP51A1 путём пропускания его раствора (20 мкг/мл) в иммобилизационном 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,0) в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Не прореагировавшие с белком активированные карбоксильные группы декстрана блокировали 1 М раствором этаноламина (pH 8,5) в течение 6 мин при скорости потока 1 мкл/мин.

*Регистрация межмолекулярных взаимодействий.* Сенсограммы взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1 получали в виде разности сигналов между опытным (с иммобилизованным CYP51A1) и контрольным (без белка) каналами биосенсора. В качестве рабочего буфера использовали HBS-буфер с добавлением 3% диметилсульфоксида (ДМСО). Все выбранные для скрининга вещества растворяли в ДМСО в концентрации 3 мМ с последующим разведением до конечных концентраций с помощью рабочего буфера. Скрининг осуществляли путём последовательного пропускания 30 мкМ растворов тестовых веществ через опытный и контрольный каналы биосенсора в течение 6 мин при скорости 10 мкл/мин. Поверхность оптического чипа регенерировали с помощью инъекции 1 М раствора NaCl в HBS-буфере в течение 30 с при скорости 50 мкл/мин. Результаты скрининга оценивали по разности сигналов опытного и контрольного каналов биосенсора на последней минуте инъекции раствора низкомолекулярного соединения.

Равновесную константу диссоциации комплекса кетоконазола с иммобилизованным CYP51A1 вычисляли с помощью метода нелинейной регрессии, имеющегося в пакете программ BIAevaluation v.4.1, из зависимости равновесного сигнала биосенсора от концентрации кетоконазола в соответствии с уравнением [17]:

$$R_{eq}/R_{max} = C/(K_d + C),$$

где  $R_{eq}$  - равновесный сигнал биосенсора при данной концентрации кетоконазола,  $R_{max}$  - максимальный сигнал биосенсора при данном количестве иммобилизованного CYP51A1,  $C$  - концентрация кетоконазола в растворе,  $K_d$  - равновесная константа диссоциации комплекса. Средняя величина и стандартная ошибка  $K_d$  вычислены по данным трёх независимых экспериментов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Разработка новых лекарств, снижающих уровень холестерина, является крайне актуальной задачей, так как в мире ежегодно растёт число больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, причиной которых является атеросклероз. CYP51A1 рассматривается в качестве новой мишени для таких препаратов.

Целью нашей работы было создание SPR тест-системы для автоматизированного анализа взаимодействий проверяемых соединений с иммобилизованным рекомбинантным CYP51A1 человека на базе SPR биосенсора Biacore T200 и стандартных оптических чипов CM5.

CYP51A1 был иммобилизован на поверхности оптического чипа CM5 как описано выше. Сенсограмма иммобилизации показана на рисунке 2. Видно, что в результате было иммобилизовано 12 нг белка.

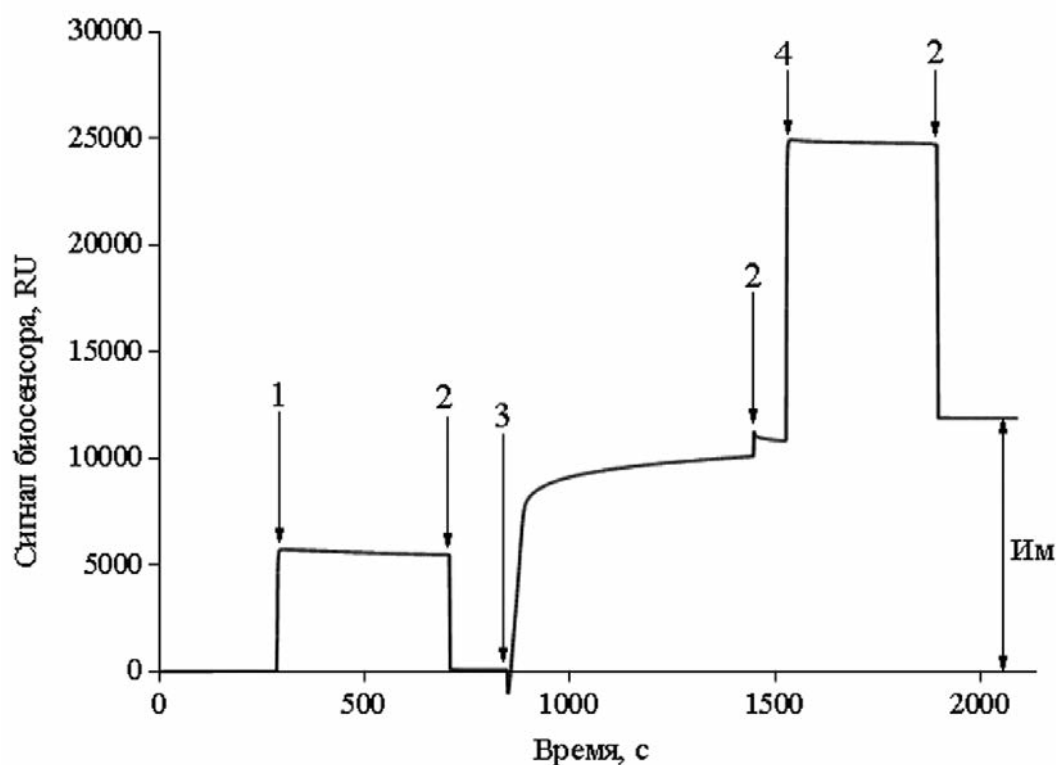


Рисунок 2.

Сенсограмма иммобилизации CYP51A1 на чипе CM5.

Стрелками обозначены инъекции следующих растворов: 1 - смесь 0,2 М EDC/0,05 М NHS;

2 - HBS-буфер; 3 - CYP51A1 в 10 mM ацетатном буфере, pH 4,0;

4 - 1 М раствор этаноламина, pH 8,5; Им - количество иммобилизованного белка.

Работоспособность SPR тест-системы проверяли путём анализа взаимодействия азольных производных (таблица, соединения 1-7) и соединения 8 (ридогрел) с иммобилизованным CYP51A1. Обнаружено, что из указанной группы веществ только кетоконазол взаимодействует с CYP51A1. Этот результат подтвердил существующие данные о наличии определённой избирательности в ингибировании азолами разных цитохромов P450 - в нашей работе было показано, что с CYP51A1 человека связывается только кетоконазол, в то время как с CYP51A1 патогенных грибов [14] связываются преимущественно итраконазол, парконазол и пенконазол, а с CYP19 и CYP26 - лиарозол [13].

## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ CYP51A1 С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Взаимодействие кетоконазола с иммобилизованным ферментом исследовали в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкМ. Полученные результаты показаны на рисунке 3 в виде набора сенсограмм. Была рассчитана величина  $K_d$  комплекса кетоконазола с CYP51A1, которая оказалась равной  $6,1 \pm 0,5$  мкМ. Надо отметить, что полученное нами значение  $K_d$  для комплексов кетоконазола с CYP51A1 заметно выше  $K_d$ , полученной ранее в экспериментах по спектрофотометрическому титрованию  $0,18 \pm 0,02$  мкМ [5]. Данный результат может иметь несколько объяснений: 1) разная прочность комплексов, находящихся в растворе и на поверхности оптического чипа; 2) различие методик расчетов  $K_d$  для данных технологий; 3) несовершенство оценок реальных концентраций взаимодействующих веществ.

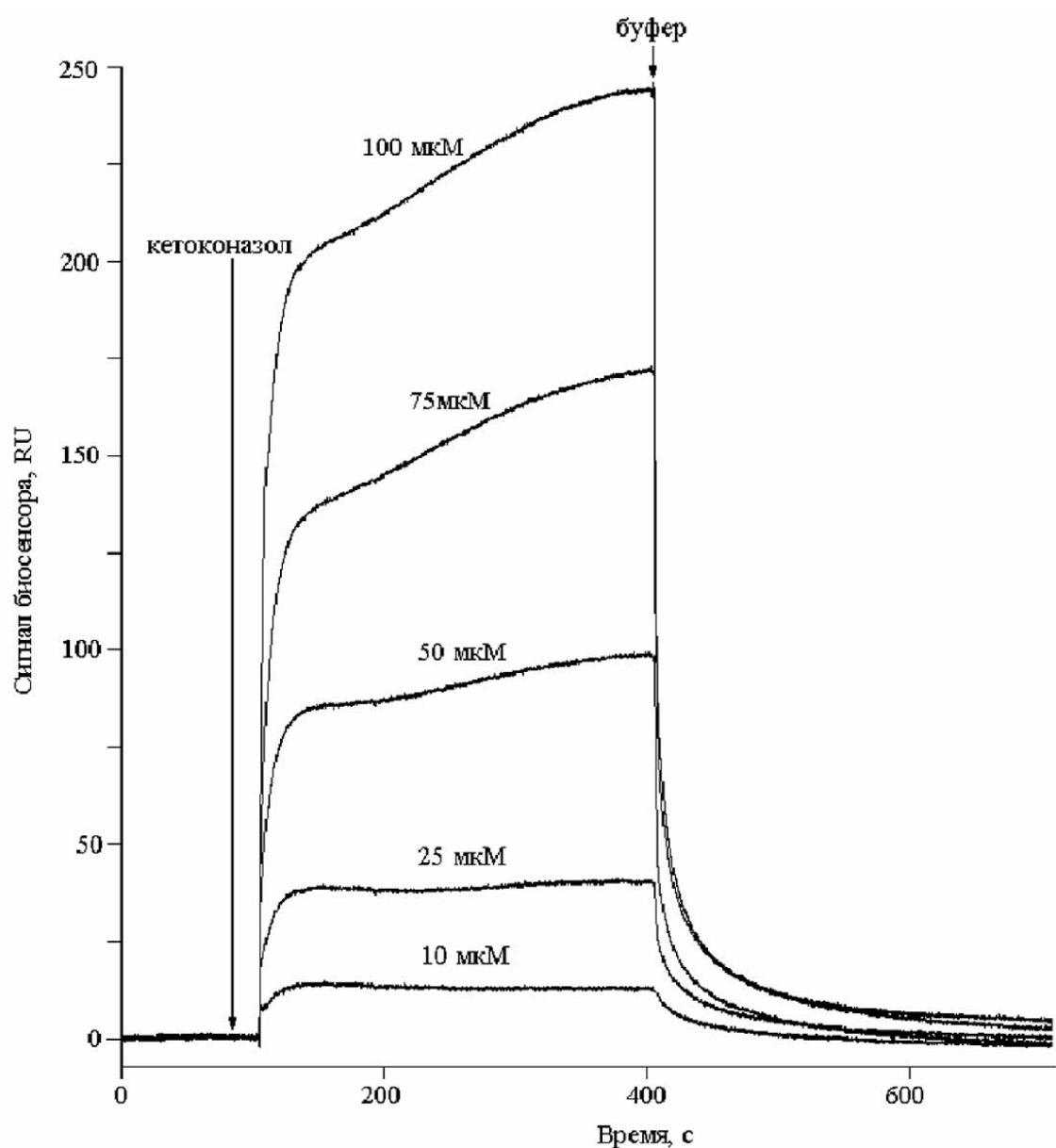


Рисунок 3.

Сенсограммы взаимодействия кетоконазола с CYP51A1.

Концентрации кетоконазола: 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ(3), 75 мкМ (4), 100 мкМ (5).



Дальнейшие эксперименты были выполнены в автоматизированном режиме с использованием разработанной тест-системы и 19 соединений (таблица, соединения 9–27), взаимодействие которых с CYP51A1 ранее не изучалось. Для этого 30 мкМ растворы данных соединений были помещены в 96-луночный планшет в 3-х повторах. В качестве положительного контроля был использован раствор кетоконазола (известный лиганд CYP51A1 человека). Из полученных результатов (см. рис. 4) видно, что с CYP51A1 взаимодействуют 11 из 19 тестируемых веществ (соединения 10, 12, 14, 15-19, 22, 24-25). Остальные соединения показали результат < 10 RU, т. е. с CYP51A1 в данной тест-системе не взаимодействуют.

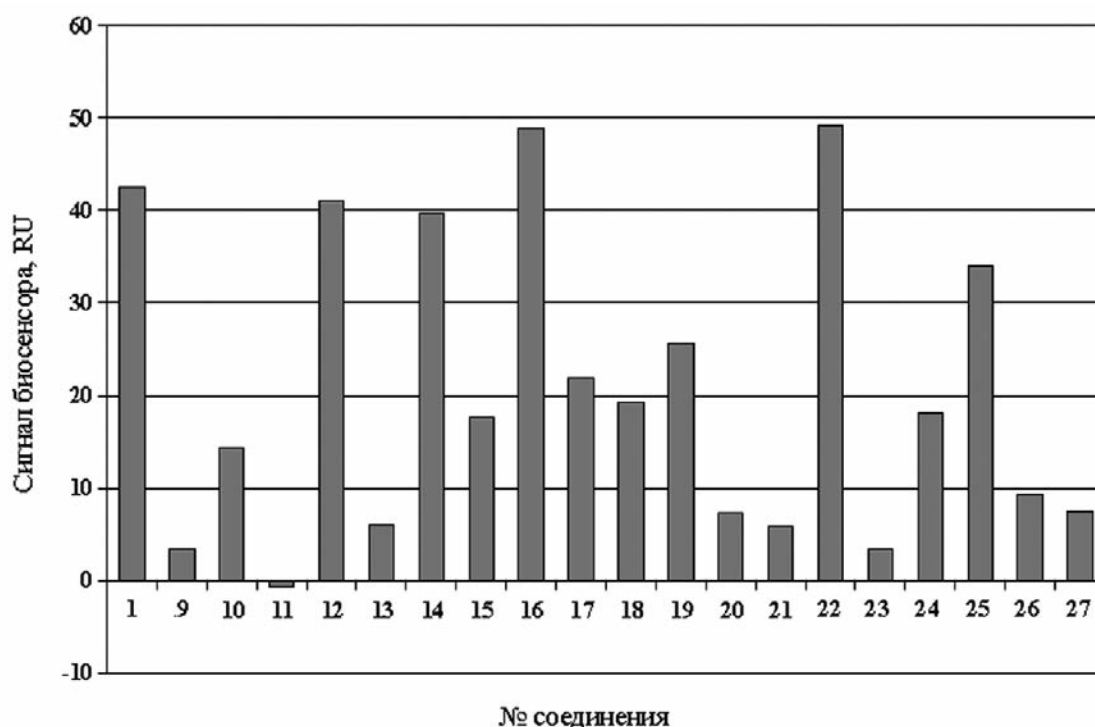


Рисунок 4.

Результаты скрининга лигандов CYP51A1 *in vitro*.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.

Создана SPR тест-система для автоматизированного анализа взаимодействий низкомолекулярных соединений с рекомбинантным CYP51A1 человека

Проверка SPR тест-системы с помощью известных лигандов цитохромов P450 показала её работоспособность и пригодность для скрининга *in vitro* низкомолекулярных соединений по взаимодействию с CYP51A1 человека. При этом была обнаружена избирательность взаимодействия среди исследованных азолов: с CYP51A1 человека взаимодействует только кетоконазол.

В результате выполнения пилотного варианта скрининга среди 19 соединений, которые ранее не тестировались на взаимодействие с цитохромами P450, было выявлено 11 веществ, взаимодействующих с CYP51A1. Мы планируем продолжить исследование данных соединений с целью поиска среди них новых ингибиторов этого фермента.

Данная работа была поддержана РФФИ (грант 11-04-01107а) и Министерством образования и науки РФ (ГК 16.552.11.7001 и соглашение № 8274). Авторы также благодарят фирму GE Healthcare (РФ) за техническую поддержку.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Taylor F., Ward K., Moore T.H., Burke M., Davey Smith G., Casas J.P., Ebrahim S. (2011) *Cochrane Database Syst. Rev.*, **1**, CD004816.
2. Baker S.K. (2005) *Muscle Nerve*, **31**, 572-580.
3. Korošec T., Ačimovič J., Seliškar M., Kocjan D., Fon Tacer K., Rozman D., Urleb U. (2008) *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 209-221.
4. Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L. (1998) *FEBS Lett.*, **425**, 263-265.
5. Strushkevich N., Usanov S.A., Park H.-W. (2010) *J. Mol. Biol.*, **397**, 1067-1078.
6. Mukha D.V., Feranchuk S.I., Gilep A.A., Usanov S.A. (2011) *Biochemistry (Moscow)*, **76**(2), 175-185.
7. Bellamine A., Mangla A.T., Nes W.D., Waterman M.R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8937-8942.
8. Markgren P.-O., Hamalainen M., Danielson H. (1998) *Anal. Biochem.*, **265**, 340-350.
9. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Mezentsev Yu.V., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2007) *J. Bioinf. Comput. Biol.*, **5**, 579-592.
10. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Archakov A.I., Podust L.M. (2010) *ACS Chemical Biology*, **5**, 767-776.
11. Ershov P.V., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Lisitsa A.V., Ivanov A.S., Archakov A.I. (2009) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **3**(3), 272-288.
12. Pearson J.T., Hill J.J., Swank J., Isoherranen N., Kunze K.L., Atkins W.M. (2006) *Biochemistry*, **45**, 6341-6353.
13. Van Wauwe J., Van Nyen G., Coene M.C., Stoppie P., Cools W., Goossens J., Borghgraef P., Janssen P.A. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 773-779.
14. Parker J.E., Merkamm M., Manning N.J., Pompon D., Kelly S.L., Kelly D.E. (2008) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3597-3603.
15. Warrilow A.G.S., Martel C.M., Parker J.E., Melo N., Lamb D.C., Nes W.D., Kelly D.E., Kelly S.L. (2010) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**, 4235-4245.
16. *Biacore Sensor Surface Handbook*, 2003, 35.
17. Majka J., Speck C. (2007) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **104**, 13-36.

Поступила: 11. 10. 2012.

**SPR-BIOSENSOR ASSAY FOR ANALYSIS OF SMALL COMPOUNDS INTERACTION  
WITH HUMAN CYTOCHROME P450 51A1 (CYP51A1)**

***O.V. Gnedenko<sup>1</sup>, L.A. Kaluzhskiy<sup>1</sup>, A.A. Molnar<sup>1</sup>, A.V. Yantsevich<sup>2</sup>, D.V. Mukha<sup>2</sup>, A.A. Gilep<sup>2</sup>,  
S.A. Usanov<sup>2</sup>, V.A. Stonik<sup>3</sup>, A.S. Ivanov<sup>1</sup>, A.V. Lisitsa<sup>1</sup>, A.I. Archakov<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; fax: +7(495)245-0857;  
e-mail: oksana\_gnedenko@pochta.ru

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry NASB, Minsk, Belarus

<sup>3</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch of Russian Academy of Sciences,  
Vladivostok, Russia

The SPR assay for human cytochrome P450 51A1's (CYP51A1) ligand screening was developed. Assay has been validated with known azole inhibitors of cytochrome P450s. The studied azoles selectively interacted with human cytochrome P450 51A1, which showed the highest affinity towards ketoconazole. The efficiency of the SPR assay was showed with 19 steroid and triterpene compounds, which were not investigated as potential ligands of CYP51A1.

**Key words:** human cytochrome P450 51A1 (CYP51A1), sterol-14 $\alpha$ -demethylase, SPR assay, CYP51A1's inhibitors, azoles, interaction screening, atherosclerosis.