

УДК 577.152.3.

©Коллектив авторов

## БИОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ДИМЕРИЗАЦИИ С ПРОТЕАЗОЙ ВИЧ-1

*П.В. Ершов\*, О.В. Гнеденко, А.А. Мольнар, А.В. Лисица,  
А.С. Иванов, А.И. Арчаков*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121, Москва,  
Погодинская ул., д.10; факс: (499) 245-0857; эл. почта: ersh2006@list.ru

Ингибиторы белок-белковых взаимодействий рассматриваются в настоящее время как перспективные прототипы лекарств нового поколения. Наиболее эффективными мишенями для действия таких ингибиторов являются олигомерные ферменты, в которых активные центры сформированы аминокислотными остатками различных субъединиц. Классическим примером является протеаза ВИЧ-1 (пВИЧ), функционирующая только в виде гомодимера. Нами был разработан подход для скрининга ингибиторов димеризации пВИЧ. Была разработана оригинальная биосенсорная тест-система на основе дифференциального анализа взаимодействия тестируемого вещества с димерами и мономерами пВИЧ. С её помощью был выполнен анализ наиболее перспективных веществ-кандидатов, предсказанных ранее методом виртуального скрининга, а также ряда производных глицирризина, тритерпеновых и стероидных гликозидов. В результате было найдено одно соединение, взаимодействующее преимущественно с мономерами пВИЧ и ингибирующее *in vitro* ферментативную активность с IC<sub>50</sub> порядка 10<sup>-6</sup> М.

**Ключевые слова:** протеаза ВИЧ-1, димеризация, ингибиторы димеризации, валидация, оптический биосенсор, поверхностный плазмонный резонанс.

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время известно, что большинство белков функционируют в составе сложных надмолекулярных комплексов, часто состоящих из нескольких макромолекул и низкомолекулярных лигандов. Такие комплексы, сильно различающиеся по структуре, и, обладая разнообразной биологической активностью, играют важную роль во многих клеточных процессах [1]. В белковом банке PDB [2] на текущий момент содержится информация о более 50000 трехмерных структур белков, среди которых порядка 15000 структур содержат 2 или более белковые цепи. Все белковые комплексы условно можно разделить на два типа : гомо- и гетеро-комплексы. Из статистики PDB известно, что гомо-комплексы наиболее часто встречаются в виде димеров, реже в виде тетрамеров и крайне редко в виде тримерных и мультимерных комплексов [3].

Контактные поверхности в белковых комплексах имеют уникальное строение и свойства, что делает белок-белковые взаимодействия перспективными молекулярными мишенями для создания лекарств нового поколения [1], блокирующих сборку функционально активных белковых комплексов. Наиболее эффективными мишенями для действия ингибиторов белок-белковых взаимодействий являются ферменты, работающие только в виде олигомерных комплексов, в которых активные центры ферментов сформированы аминокислотными остатками различных субъединиц. Классическим примером фермента, функционирующего только в виде гомодимера, является протеаза ВИЧ-1 (пВИЧ) [4]. Каждая из ее субъединиц состоит из 99 аминокислотных остатков. Главной функцией пВИЧ является разрезание вирусных пробелков Gag и Gag-Pol на отдельные зрелые белки [5]. Димеризация пВИЧ абсолютно необходима для проявления каталитической активности, так как активный центр фермента

---

\* - адресат для переписки

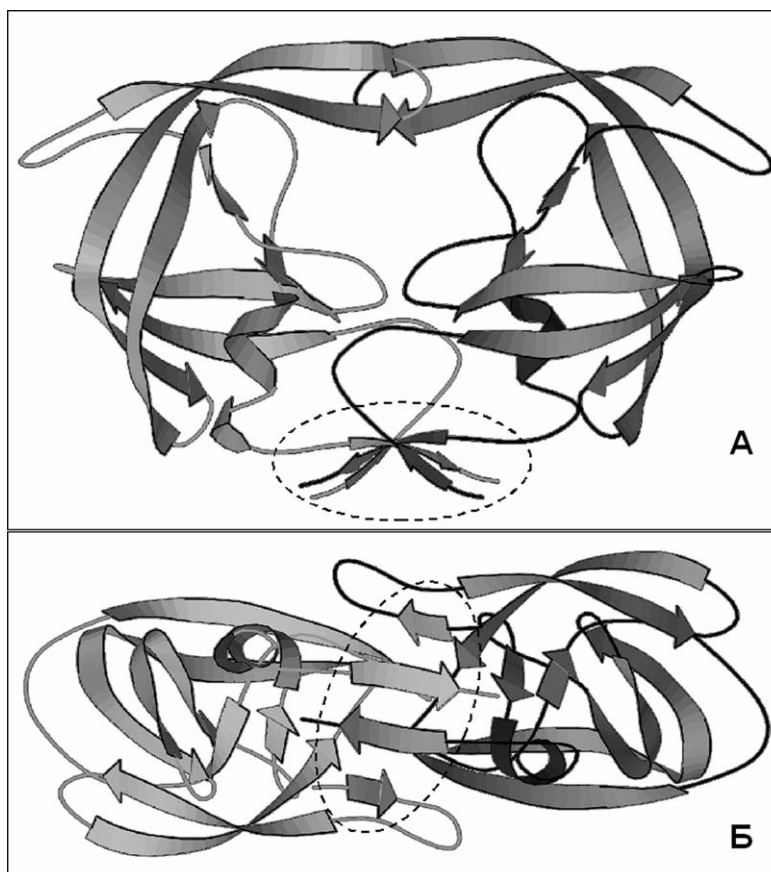
## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1 С ИНГИБИТОРАМИ

образован на границе двух субъединиц, несущих по одному каталитическому остатку аспарагиновой кислоты (Asp25). Данная протеаза повреждает также белки клетки-хозяина, усиливая процесс развития СПИДа [4, 5].

В настоящее время разработаны десятки эффективных конкурентных ингибиторов пВИЧ и некоторые из них уже используются в клинической практике для терапии СПИДа [6]. Однако систематическое применение конкурентного ингибитора пВИЧ неизбежно приводит к появлению новых штаммов ВИЧ, резистентных к действию, как данного ингибитора, так и его структурных аналогов. Это обусловлено быстрой мутационной изменчивостью вируса, приводящей к появлению мутантных пВИЧ, резистентных к действию применявшегося ингибитора [7, 8].

В тоже время в молекуле пВИЧ существуют структурно-консервативные участки, мутации в которых должны приводить к нарушению контактного интерфейса между субъединицами и, как следствие, к нарушению процесса димеризации и снижению ферментативной активности. В результате такие мутации являются “летальными” для процесса размножения вируса и не могут закрепляться в новых поколениях вируса. Таким образом, наблюдаемая мутационная изменчивость пВИЧ не затрагивает интерфейс димеризации, что исключает возможность появления мутантных вариантов пВИЧ, резистентных к действию ингибиторов димеризации [9].

Основная область интерфейса в гомодимере пВИЧ представляет собой антипараллельный  $\beta$ -лист, состоящий из четырех  $\beta$ -тяжей, сформированных С- и N-концевыми участками двух субъединиц (рис. 1).



**Рисунок 1.**

Схематическая структура гомодимера пВИЧ (А - вид спереди, Б - вид снизу). Пунктиром обведена область основного интерфейса димеризации пВИЧ, представляющая собой антипараллельный  $\beta$ -лист, состоящий из четырех  $\beta$ -тяжей, сформированных С- и N-концевыми участками двух субъединиц [4].

В последние годы активно ведутся работы по поиску ингибиторов димеризации пВИЧ [9, 10], однако больших успехов пока не достигнуто. Большинство найденных ингибиторов димеризации по своей природе являются пептидами или суррогатными пептидомиметиками (комбинация пептидов с небелковыми органическими структурами).

В данной работе для поиска потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ были использованы принципы совместного использования виртуальных (компьютерных) и экспериментальных технологий, описанные нами ранее [11-13].

Первый этап поиска потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ недавно был успешно выполнен [13]. Методом виртуального аланинового сканирования были идентифицированы ключевые аминокислотные остатки, играющие основную роль в димеризации пВИЧ. Затем был осуществлен виртуальный скрининг химических соединений из баз данных NCI Open Database (порядка 250000 записей) и NCI Diversity Set (порядка 2500 записей) и в результате был получен список из 14 потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ.

Для экспериментального тестирования *in vitro* потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ была разработана оригинальная тест-система, основанная на дифференциальном анализе взаимодействия тестируемого вещества с димерами и мономерами пВИЧ. Данная тест-система была реализована на базе оптического биосенсора, работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR) [14]. SPR-технология является универсальной - она позволяет осуществлять высокочувствительную регистрацию (до  $10^{-12}$  М) в реальном времени практически любых межмолекулярных взаимодействий независимо от типа взаимодействующих веществ и природы сил, приводящих к их взаимодействию. Данная технология обеспечивает получение как кинетической, так и термодинамической информации [15], а также регистрацию взаимодействия с белками низкомолекулярных лигандов с массой от 100 Да. С помощью разработанной тест-системы был выполнен скрининг наиболее перспективных веществ-кандидатов, найденных методом виртуального поиска [13], а также ряда производных глицирризина, тритерпеновых и стероидных гликозидов, выбранных из лабораторной коллекции на основе литературных данных о том, что некоторые соединения данных типов [16-22] могут быть ингибиторами белок-белковых взаимодействий и, в том числе, ингибиторами димеризации пВИЧ.

В результате выполненного экспериментального тестирования было найдено соединение, взаимодействующее преимущественно с мономерами пВИЧ. Биохимический анализ ингибирующего действия этого соединения на ферментативную активность пВИЧ, показал, что данное соединение является ингибитором данного фермента с  $IC_{50}$  порядка  $10^{-6}$  М.

**МЕТОДИКА. Протеаза ВИЧ.** В работе была использована рекомбинантная протеаза ВИЧ-1 (пВИЧ) фирмы Bachem AG (препарат Н-9040).

**Хромогенный субстрат для пВИЧ.** Для анализа ферментативной активности пВИЧ был использован специфический хромогенный субстрат VII:

**H-Lys-Ala-Arg-Val-Tyr-Phe(pNO<sub>2</sub>)-Glu-Ala-(Nor-Leu)-NH<sub>2</sub>,**  
производства фирмы Bachem AG (препарат Н-1286).

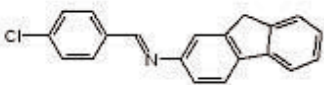
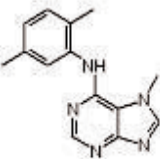
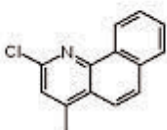
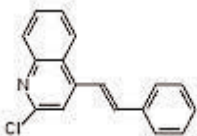
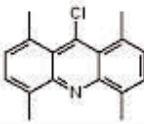
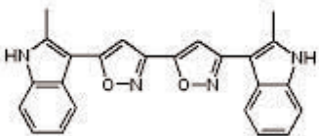
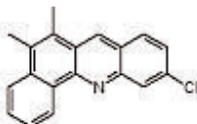
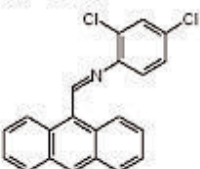
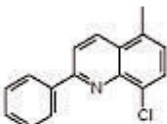
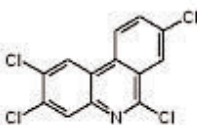
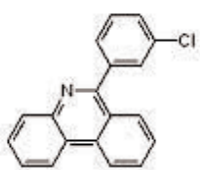
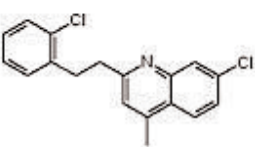
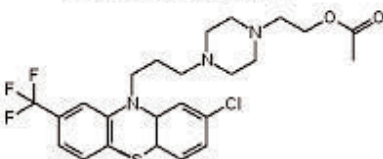
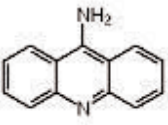
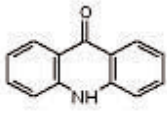
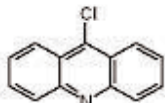
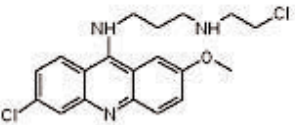
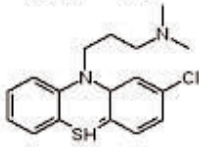
**Контрольный ингибитор димеризации пВИЧ.** Для позитивного контроля в работе был использован известный пептидный ингибитор димеризации пВИЧ (так называемый ингибитор Шрамма [23]): **Palmitoyl-Thr-Val-Ser-Tyr-Glu-Leu** (Bachem AG, Швейцария).

**Образцы низкомолекулярных соединений.** Для экспериментальной проверки потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ были использованы:

1) образцы 12 соединений, которые были ранее предсказаны с помощью виртуального скрининга [13] (таблица 1, соединения №1-12) как потенциальные ингибиторы димеризации пВИЧ, данные образцы были получены из Национального института рака США (National Cancer Institute, NCI);

# АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1 С ИНГИБИТОРАМИ

Таблица 1. Структуры низкомолекулярных соединений, отобранных в ходе виртуального скрининга из базы данных "NCI Open Database" и соединений, отобранных из лабораторной коллекции на основе структурного сходства с первыми.

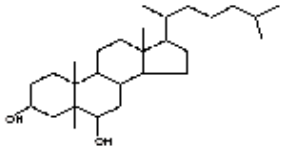
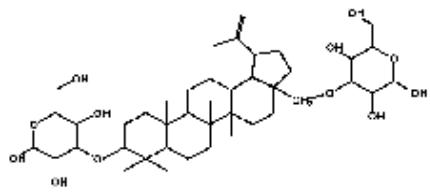
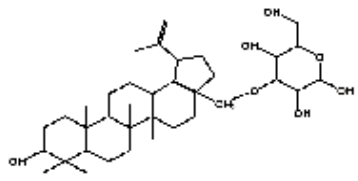
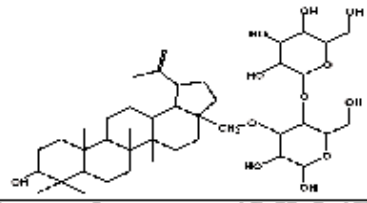
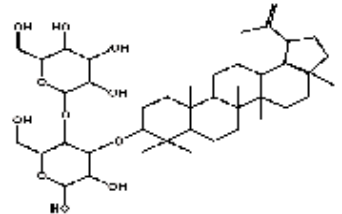
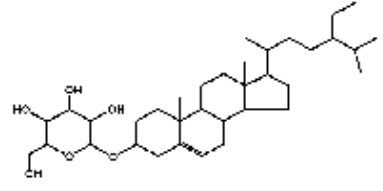
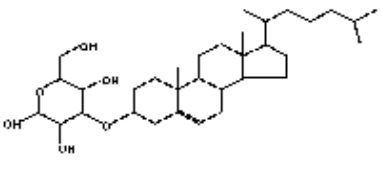
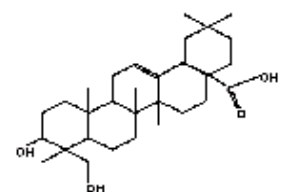
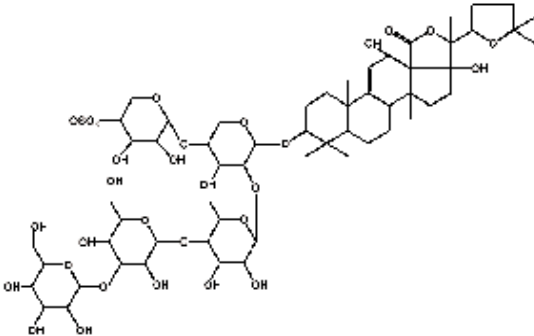
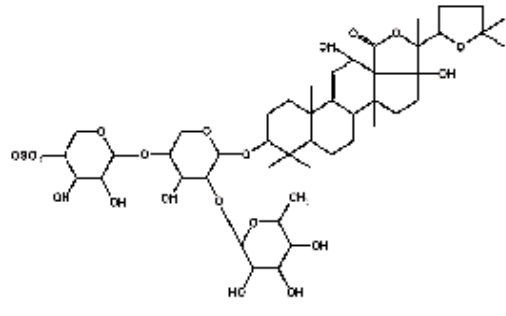
№ соединения		NSC №/CAS №/ формула/мол. вес		Структурная формула	
№1	12303 / 82899-02-3 / C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> ClN / 304	№2	19140 / (None) / C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub> / 288	№3	109757 / 61773-06-6 / C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> ClN / 228
					
№4	116597 / 93260-59-4 / C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> ClN / 266	№5	408209 / (None) / C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> ClN / 270	№6	371684 / (None) / C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> / 394
					
№7	522261 / 2381-12-6 / C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> ClN / 292	№8	308816 / (None) / C <sub>21</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> N / 350	№9	139054 / 25413-16-5 / C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClN / 254
					
№10	134382 / (None) / C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>4</sub> N / 317	№11	158553 / (None) / C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> ClN / 290	№12	152042 / (None) / C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> N / 314
					
№13	226515 / 2021-89-8 / C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S / 480	№14	(None) / 90-45-9 / C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> HCl·H <sub>2</sub> O / 249	№15	(None) / 578-95-0 / C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> NO / 195
					
№16	(None) / 1207-69-8 / C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> ClN / 214	№17	(None) / 17070-45-0 / C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O·2HCl / 451	№18	(None) / 50-53-3 / C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> S / 318
					

2) дополнительная выборка из 6 соединений, отобранных из лабораторной коллекции на основе структурного сходства с предсказанными (таблица 1, соединения №13-18);



3) выборка из 24 соединений (таблица 2, соединения №19-42), выбранных из лабораторной коллекции низкомолекулярных соединений на основе анализа литературных данных, указывающих на то, что некоторые соединения типа производных глицирризина [16-20], тритерпеновых и стероидных гликозидов [16, 21, 22] могут быть ингибиторами белок-белковых взаимодействий и возможно ингибиторами димеризации пВИЧ.

Таблица 2. Структуры низкомолекулярных соединений типа производных глицирризина, тритерпеновых и стероидных гликозидов, отобранных из лабораторной коллекции на основе

№ соединения / название / формула/мол. вес	
Структурная формула	
№19 / 3 $\beta$ , 6 $\beta$ -дигидроксн-5 $\alpha$ -холестан / $C_{27}H_{47}O_2$ / 415	№20 / Бисгликозид бетулина / $C_{47}H_{78}O_{12}$ / 764
	
№21 / Гликозид бетулина C-28 / $C_{38}H_{59}O_7$ / 603	№22 / Маммосид бетулина C-28 / $C_{47}H_{78}O_{12}$ / 762
	
№23 / Маммосид бетулина C-3 / $C_{47}H_{78}O_{11}$ / 746	№24 / Гликозид $\beta$ -ситостерина / $C_{35}H_{58}O_4$ / 571
	
№25 / Гликозид холестерина / $C_{34}H_{56}O_4$ / 536	№26 / Хедрагенин / $C_{28}H_{48}O_4$ / 473
	
№27 / Гологурин А / $C_{54}H_{85}NaO_{27}S$ / 1221	№28 / Гологурин В / $C_{41}H_{65}NaO_{17}S$ / 833
	

# АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1 С ИНГИБИТОРАМИ

Таблица 2. Продолжение.

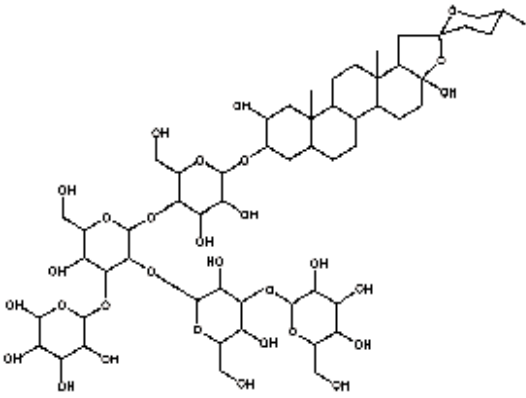
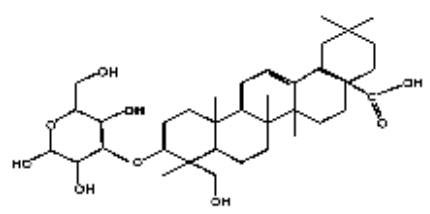
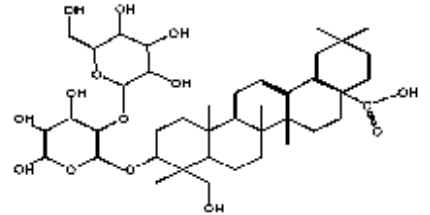
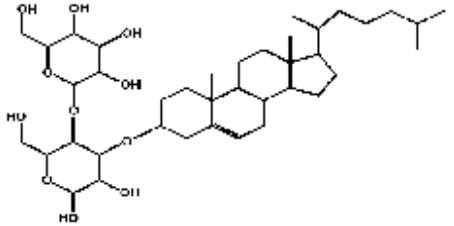
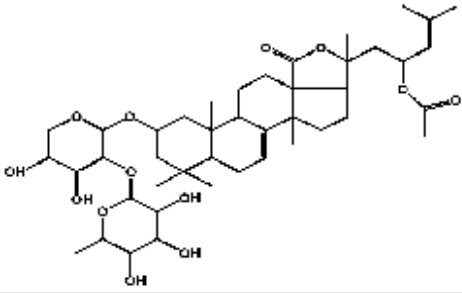
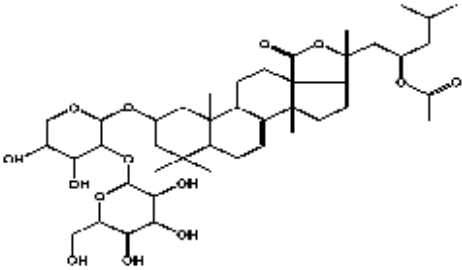
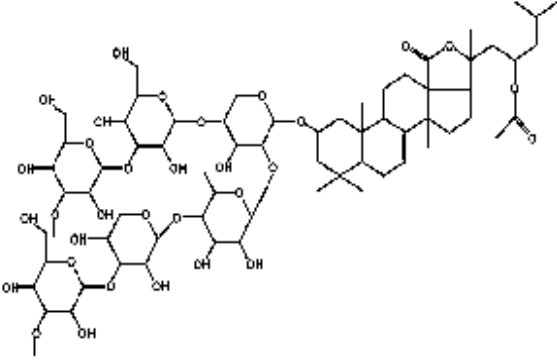
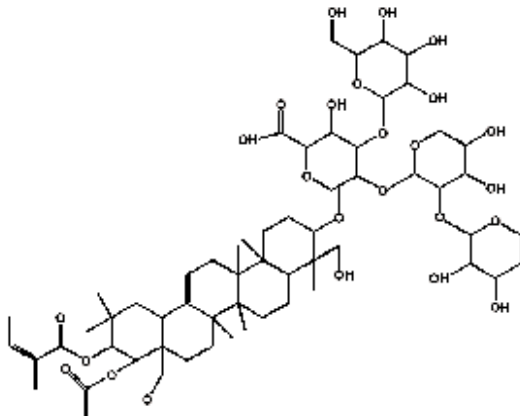
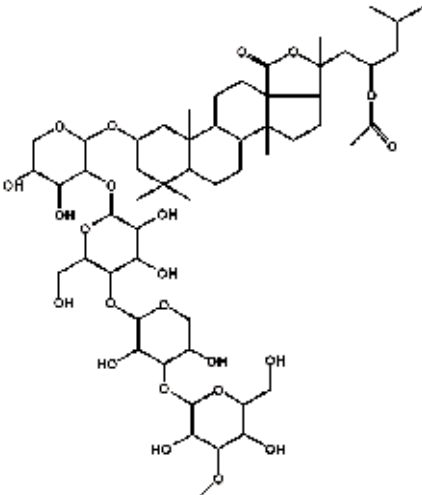
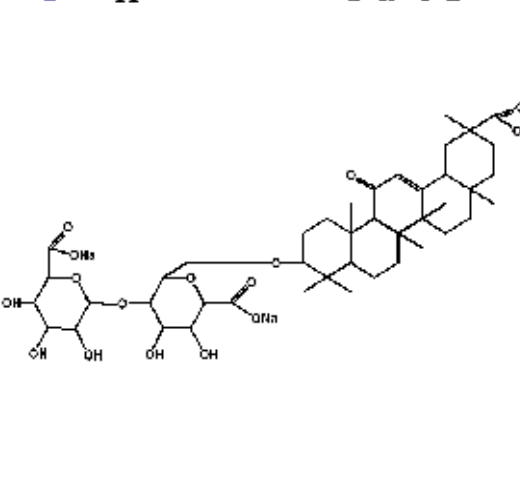
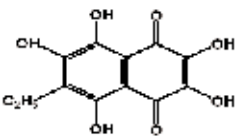
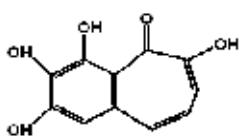
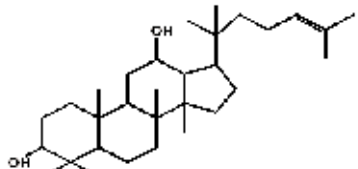
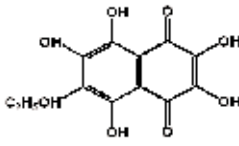
№ соединения / название / формула/мол. вес Структурная формула	
<p><b>№29 / Дигитонин / <math>C_{58}H_{92}O_{25}</math> / 1229</b></p> 	<p><b>№30 / Каулозид D / <math>C_{33}H_{48}O_{21}</math> / 1075</b></p> 
<p><b>№31 / Каулозид C / <math>C_{41}H_{64}O_{13}</math> / 767</b></p> 	<p><b>№32 / Маннозид холестерина / <math>C_{40}H_{64}O_{11}</math> / 722</b></p> 
<p><b>№33 / Стихолозид A / <math>C_{47}H_{76}O_{15}</math> / 793</b></p> 	<p><b>№34 / Стихолозид B / <math>C_{49}H_{80}O_{14}</math> / 820</b></p> 
<p><b>№35 / Стихолозид C / <math>C_{52}H_{80}O_{21}</math> / 1324</b></p> 	<p><b>№36 / Текстоинин / <math>C_{39}H_{52}O_{21}</math> / 1233</b></p> 

Таблица 2. Продолжение.

№ соединения / название / формула/мол. вес Структурная формула	
<b>№37 / Тетрагалактозил В / <math>C_{54}H_{88}O_{23}</math> / 1102</b> 	<b>№38 / Галактураминовая кислота / <math>C_{47}H_{74}Na_2O_{15}</math> / 867</b> 
<b>№39 / Эхинохром А / <math>C_{12}H_{14}O_7</math> / 266</b> 	<b>№40 / Пуриурогаллин / <math>C_{11}H_8O_5</math> / 220</b> 
<b>№41 / Бетуллофониопропил / <math>C_{31}H_{50}O_7</math> / 461</b> 	<b>№42 / Эхинохром А (окисл.) / <math>C_{12}H_{10}O_8</math> / 283</b> 

**Химические реактивы.** От фирмы Biacore AB (Швеция) были получены следующие растворы и реагенты для оптического биосенсора Biacore-3000: 1) рабочий HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% сурфактант P20, 10 мМ HEPES, pH 7,4); 2) 10 мМ ацетатный буфер, pH 4,0; 3) 50 мМ NaOH; 4) 10 мМ глицин-HCl, pH 2,5; 5) набор реагентов для ковалентной иммобилизации лигандов за первичные аминогруппы: (1) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид-HCl), (2) NHS (N-гидроксисукцинимид), (3) этаноламин-HCl (1 М, pH 8,5).

Другие реактивы и препараты, использованные в работе, были получены от отечественных производителей.

## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1 С ИНГИБИТОРАМИ

*Оптические чипы.* В работе были использованы стандартные оптические чипы CM5 (фирма Biacore AB), поверхность которых покрыта слоем карбокси-метилованного декстрана.

*Оборудование.* Для регистрации межмолекулярных взаимодействий в работе был использован оптический биосенсор Biacore-3000 (Biacore AB), работающий на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и под управлением компьютерных программ “Biacore Control” и “Biacore Evaluation v. 4.1”. Все эксперименты были выполнены при 25°C с использованием 4-х канальной проточной микрожидкостной системы биосенсора и оптических чипов CM5.

Для регистрации ферментативной активности пВИЧ был использован спектрофотометр Libra S32PC (Biochrom, Англия) с кварцевой полумикрокюветой.

*Иммобилизация пВИЧ на поверхности оптического чипа.* Молекулы пВИЧ закрепляли на поверхности оптического чипа CM5 путем образования ковалентных связей между карбоксильными группами карбоксиметилованного декстрана и боковыми аминогруппами остатков лизина и/или N-концевой аминогруппой, расположенными на поверхности белка. Для этого карбоксильные группы декстрана активировали смесью EDC/NHS (молярное соотношение 4:1), промывали HBS-буфером и осуществляли иммобилизацию пВИЧ путем введения раствора фермента. Не прореагировавшие с белком активированные группы декстрана блокировали раствором этаноламина [24].

*Регистрация межмолекулярных взаимодействий.* В каждом канале оптического биосенсора производилась регистрация межмолекулярных взаимодействий в виде сенсограмм, представляющих собой запись сигналов биосенсора в резонансных единицах (RU) как функцию времени. Все сенсограммы обрабатывались с помощью компьютерной программы “Biacore Evaluation” с автоматической коррекцией неспецифических эффектов [25]. Кривые специфических взаимодействий низкомолекулярных соединений с иммобилизованным на оптическом чипе белком получали в виде разности сигналов биосенсора между опытными и контрольными каналами. В качестве последних были использованы каналы без иммобилизованного белка.

*Биохимический анализ активности пВИЧ.* Для измерения ферментативной активности пВИЧ был использован хромогенный субстрат VII, имеющий максимум поглощения в УФ при 300 нм. Препарат пВИЧ (100 нг белка) инкубировали 35 мин при 25°C в 240 мкл буфера (1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,01% CHAPS, 8% ДМСО, 0,1 М ацетат натрия, pH 5,0) в присутствии (опыт) или отсутствии (контроль) разных концентраций соединений, проверяемых на ингибиторную активность. Конечная концентрация пВИЧ была порядка 18 нМ. Затем смесь переносили в кварцевую полумикрокювету спектрофотометра и запускали реакцию добавлением 10 мкл раствора субстрата VII до конечной концентрации 25 мкМ. Смесь быстро перемешивали и активность пВИЧ регистрировали при 25°C по снижению поглощения при 300 нм в режиме “Кинетика” в течение 35 мин. Активность пВИЧ выражали в мкмоль субстрата • мин<sup>-1</sup> • мг<sup>-1</sup> белка. Для расчёта использовали коэффициент молярной экстинкции субстрата равный 1000.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** *Создание биосенсорной тест-системы для скрининга in vitro потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ.* На базе 4-х канального оптического биосенсора Biacore-3000 и стандартных оптических чипов CM5 была разработана схема дифференциального биосенсорного скрининга *in vitro* потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ (рис. 2). Скрининг осуществляется путем последовательного пропускания растворов тестируемых химических соединений через два измерительных канала с димерами и мономерами пВИЧ и регистрацией разности сигналов биосенсора между каналами. Позитивным результатом скрининга считается взаимодействие тестируемого соединения только с мономерами пВИЧ.



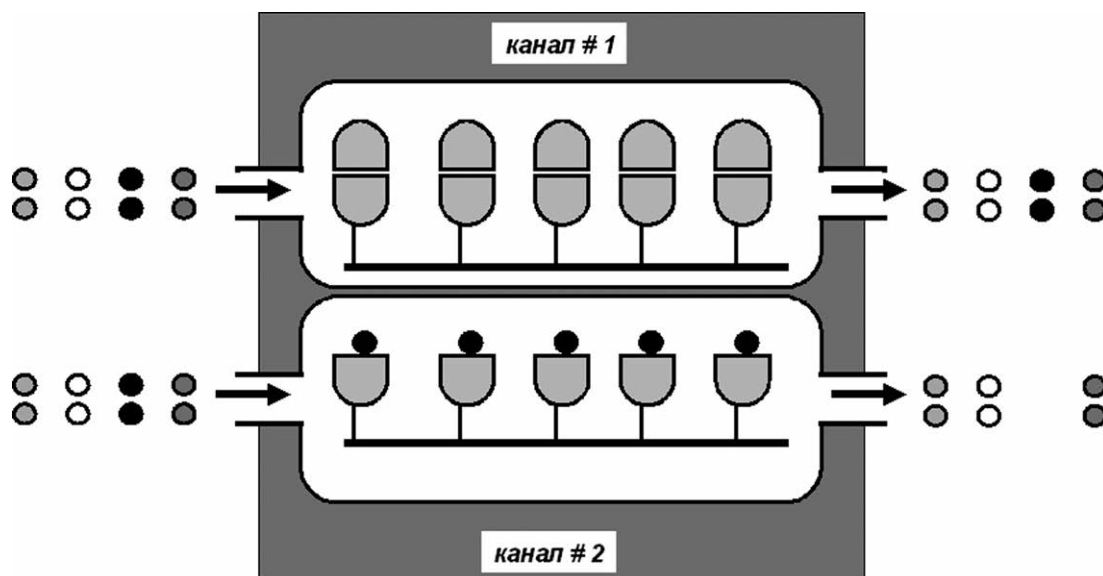


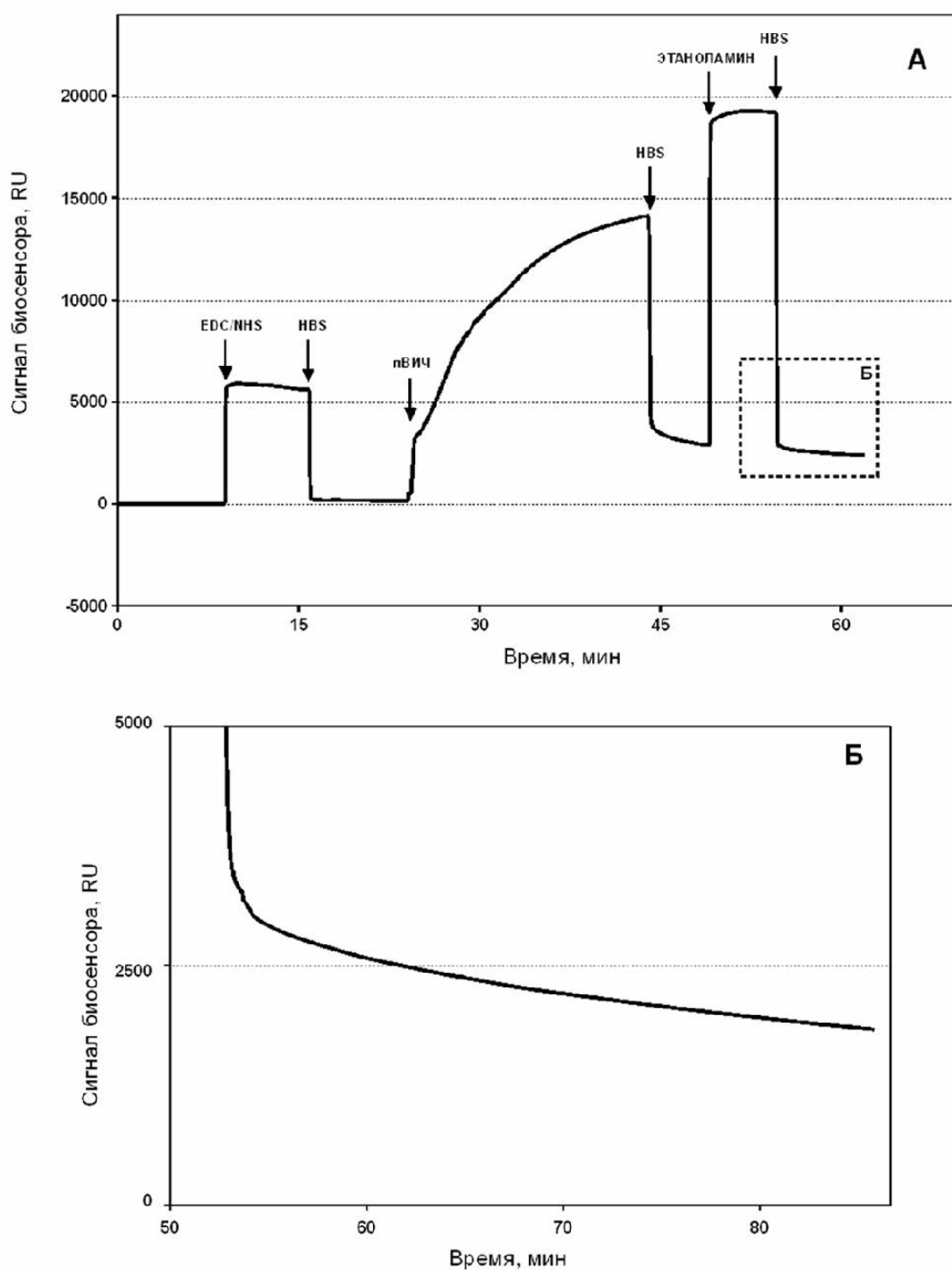
Рисунок 2.

Схема дифференциальной биосенсорной тест-системы анализа взаимодействия потенциальных ингибиторов димеризации с димерами и мономерами пВИЧ.

В канале #1 иммобилизована и стабилизирована димерная форма пВИЧ, в канале #2 - мономерная форма пВИЧ. Тестирование осуществляется путем последовательных инъекций растворов тестируемых соединений (кружки разных цветов) через оба канала биосенсора. Позитивным результатом считается связывание тестируемого соединения только с мономерами пВИЧ в канале #2 (черные кружки).

На рисунке 3 приведена сенсограмма, показывающая порядок выполнения процедур иммобилизации димерной формы пВИЧ. Первоначально карбоксильные группы декстрана активировали путем 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 димерной формы пВИЧ путем введения раствора пВИЧ (3,6 мкМ) в 5 мМ малеатном буфере (pH 6,0) в течение 20 мин при скорости потока 1 мкл/мин. Непрореагировавшие с белком активированные группы декстрана блокировали 1 М раствором этаноламина (pH 8,5) в течение 6 мин при скорости потока 1 мкл/мин.

Можно видеть (рис. 3Б), что после химической иммобилизации при длительной промывке канала биосенсора рабочим буфером димеры пВИЧ медленно распадаются, о чем свидетельствует дрейф сигнала оптического биосенсора вниз (спонтанная потеря массы с поверхности чипа). Постепенный распад димеров пВИЧ и отмывка диссоциировавших мономеров говорит о низкой стабильности иммобилизованных димеров и меньше, чем за сутки, уровень сигнала биосенсора снижается примерно в 2 раза. Ранее в работах [26-28] также был отмечен факт дрейфа сигнала биосенсора вниз в аналогичных условиях. Данный эффект авторы также объяснили спонтанной диссоциацией димеров пВИЧ, и так как дрейф сигнала мешал им выполнять скрининг конкурентных ингибиторов пВИЧ, то был найден простой способ стабилизации димерной формы фермента на поверхности оптического чипа [26]. Была выполнена повторная инъекция смеси EDC/NHS, которая используется для активации поверхности чипа для ковалентной иммобилизации белка. После такой обработки дрейф сигнала биосенсора прекращался, так как димеры пВИЧ оказались стабилизированными за счет химической перепрошивки.



**Рисунок 3.**

Сенсограмма иммобилизации димерной формы пВИЧ на поверхности оптического чипа CM5 (А).

Стрелками обозначены моменты введения: EDC/NHS - смесь 0,2 М EDC / 0,05 М NHS;

HBS - HBS-буфер; пВИЧ - раствор пВИЧ (3,6 мкМ); этаноламин - 1 М раствор этаноламина.

Б - дрейф сигнала биосенсора, свидетельствующий о распаде димеров пВИЧ.

Мы использовали описанный выше подход для разработки протокола создания дифференциального оптического чипа, включающего иммобилизацию и стабилизацию димерной и мономерной форм пВИЧ в двух каналах оптического чипа CM5. Сенсограммы, приведенные на рисунке 4, иллюстрируют порядок выполнения процедур. Первые процедуры (активация поверхности чипа и

иммобилизация пВИЧ) - аналогичны эксперименту, приведенному на рисунке 3: (1) в двух каналах карбоксильные группы декстрана активировали смесью EDC/NHS с последующей промывкой HBS-буфером; (2) в обоих каналах иммобилизовали димеры пВИЧ путем пропускания раствора пВИЧ в малеатном буфере; (3) непрореагировавшие активированные группы декстрана блокировали раствором этаноламина. Далее в канале #1 димеры иммобилизованной пВИЧ были химически стабилизированы повторным введением смеси EDC/NHS в течение 7 мин при скорости 5 мкл/мин. Затем канал промывали HBS-буфером в течение 15 часов для самопроизвольной дезактивации непрореагировавших активных групп. В канале #2, где оставалась нестабильная димерная форма пВИЧ, при промывке рабочим буфером наблюдалось медленное снижение сигнала, свидетельствующее о постепенном распаде димеров и отмывке диссоциировавших мономеров. За 15 часов уровень сигнала в данном канале снизился с 2200 RU до 1150 RU (т.е. примерно в 2 раза), что свидетельствует о практически полной диссоциации димеров пВИЧ. В результате мы получили в каналах #1 и #2 иммобилизованные стабильные димеры и мономеры пВИЧ соответственно.

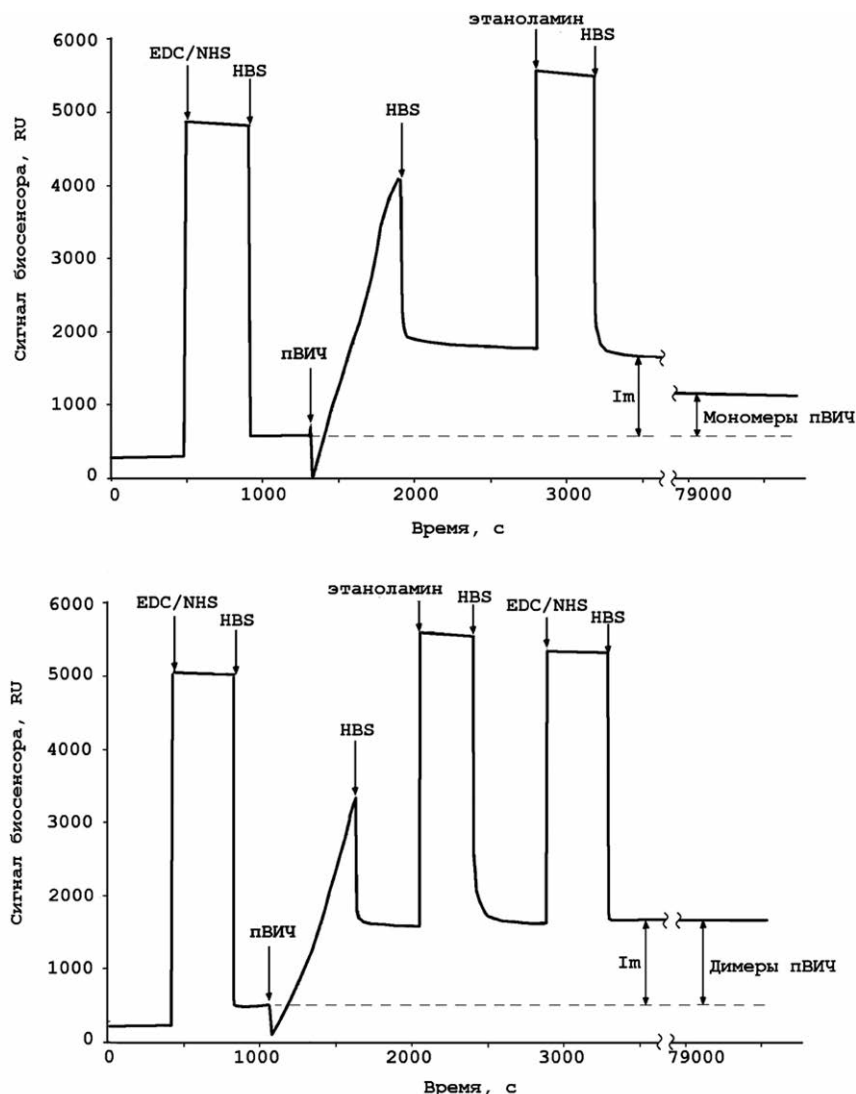


Рисунок 4.

Протокол иммобилизации и стабилизации мономерной и димерной форм пВИЧ на поверхности оптического чипа CM5. Стрелками обозначены моменты введения: EDC/NHS - смесь 0,2 М EDC / 0,05 М NHS; HBS - HBS-буфер; пВИЧ - раствор пВИЧ (3,6 мкМ); этаноламин - 1 М раствор этаноламина. Im - количество иммобилизованного белка.

## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1 С ИНГИБИТОРАМИ

Таким образом, была создана дифференциальная биосенсорная тест-система, позволяющая выявлять соединения, избирательно взаимодействующие с димерами или мономерами пВИЧ, путем регистрации разницы сигналов биосенсора между двумя каналами дифференциального оптического чипа при последовательном пропускании растворов тестируемых веществ. Использование высокоавтоматизированного оптического биосенсора Biacore-3000 обеспечило осуществление экспериментального скрининга всего набора тестируемых веществ в автоматическом режиме.

*Валидация биосенсорной тест-системы для скрининга in vitro потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ.* Пептидный ингибитор Шрамма (контрольный ингибитор димеризации пВИЧ) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 1 мМ. Взаимодействие ингибитора с иммобилизованными димерами и мономерами пВИЧ исследовали в диапазоне концентраций от 2 до 30 мкМ. Для этого маточный раствор ингибитора Шрамма смешивали в различных соотношениях с HBS-буфером и ДМСО (конечная концентрация ДМСО - 3%). В качестве рабочего буфера в биосенсоре использовали HBS-буфер с 3% ДМСО. После каждого цикла регистрации межмолекулярных взаимодействий поверхность оптического чипа регенерировали с помощью введения 10 мМ NaOH в течение 2 мин при скорости потока 5 мкл/мин и последующей промывки рабочим буфером до получения стабильных сигналов в обоих каналах биосенсора.

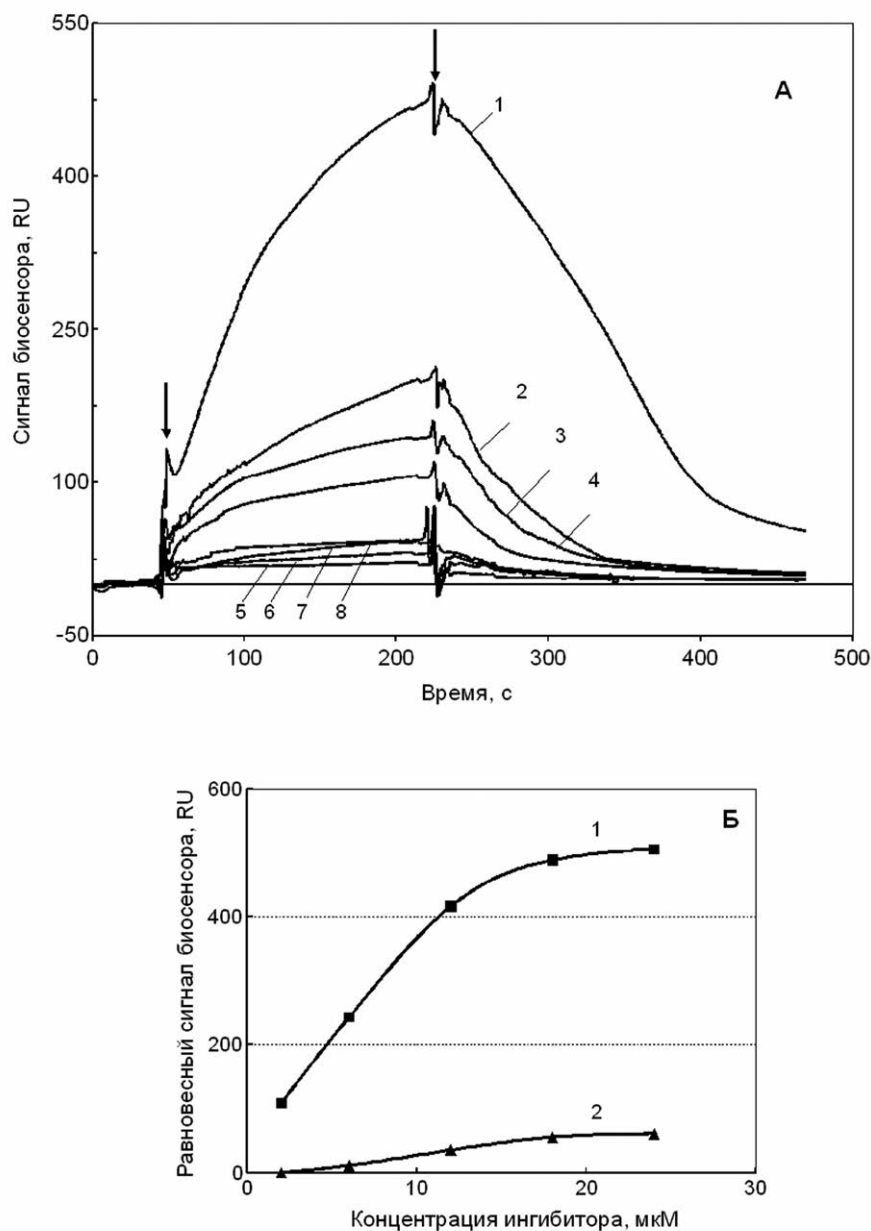
Полученные результаты показаны на рисунке 5 в виде набора сенсограмм. Видно, что ингибитор Шрамма взаимодействует только с мономерами пВИЧ, у которых контактные области димеризации субъединиц открыты и доступны для взаимодействия. С помощью программы "Biacore Evaluation" был выполнен анализ набора кривых связывания ингибитора с мономерами пВИЧ в зависимости от его концентрации и были вычислены константы скорости ассоциации  $k_{on} = (4,32 \pm 0,02) \cdot 10^2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  и диссоциации  $k_{off} = (8,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ , а также равновесная константа диссоциации  $K_D = (2,03 \pm 0,02) \cdot 10^{-6} \text{ М}$ , что сопоставимо с литературными данными [16] о взаимодействии пВИЧ с иммобилизованным биотинилированным пептидом Biotinyl-Thr-Val-Ser-Tyr-Glu-Leu:  $k_{on} = 1,9 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $k_{off} = 6,9 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  и  $K_D = 3,72 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ .

*Экспериментальный скрининг потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ.* Для тестирования были взяты две группы низкомолекулярных соединений: 1) 18 соединений с молекулярной массой от 195 до 480 Да (см. табл. 1); 2) 24 соединения с молекулярной массой от 220 до 1324 Да (см. табл. 2).

Маточные растворы образцов низкомолекулярных лигандов готовили в ДМСО (1 мг/мл). Рабочие растворы образцов получали смешиванием аликвот маточных растворов с HBS-буфером (конечная концентрация 10 мкг/мл или 10-50 мкМ). Скрининг лигандов осуществляли путем последовательных циклов инъекции их рабочих растворов в каналы оптического биосенсора в течение 12 мин при скорости 5 мкл/мин. В качестве рабочего буфера использовали HBS-буфер с добавлением 3% ДМСО. Поверхность чипа регенерировали с помощью инъекции 10 мМ NaOH в течение 2 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Результаты скрининга оценивали по разностному сигналу рабочего и контрольного каналов на последней минуте инъекции раствора образца.

Полученные результаты дифференциального анализа взаимодействия тестируемых соединений с мономерами и димерами пВИЧ представлены на рисунке 6. Как видно из рисунка, из первой группы соединений (табл. 1), только соединение № 0 (положительный контроль - ингибитор Шрамма) и соединение № 10 преимущественно взаимодействовали с мономерами пВИЧ, иммобилизованными в канале #1 оптического биосенсора (рис. 6А). Из второй группы соединений (табл. 2) такими свойствами обладали соединения №№ 21, 26, 28. Однако, сам по себе факт преимущественного взаимодействия с мономерами пВИЧ не позволяет отнести найденные вещества к кандидатам на роль ингибиторов димеризации. Необходима дополнительная проверка прочности образующихся комплексов этих веществ с мономером пВИЧ.

Поэтому нами в отдельных сериях биосенсорных экспериментов были получены наборы сенсограмм взаимодействия с мономером пВИЧ разных концентраций соединений, показавших положительный результат в тест-системе (№№ 10, 21, 26, 28). Далее с помощью программы “Biacore Evaluation v. 4.1.” был выполнен анализ сенсограмм и оценка  $K_D$ . Оказалось, что только соединение № 10 имеет  $K_D$  порядка  $10^{-6}$  М, в то время как остальные три соединения - порядка  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  М, что, по-видимому, указывает на неспецифическую сорбцию данных соединений на поверхности чипа с мономерами пВИЧ.



**Рисунок 5.**

Валидация дифференциальной биосенсорной тест-системы для скрининга *in vitro* потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ. **А** - серия сенсограмм взаимодействия разных концентраций контрольного ингибитора димеризации с мономерами (1-4) и димерами (5-8) пВИЧ. Стрелками обозначены моменты начала и конца инъекции раствора ингибитора через 2 канала биосенсора с иммобилизованными мономерами и димерами пВИЧ. Концентрации ингибитора: 2, 5, 9 и 18 мкМ (кривые 1-4 и 5-8, соответственно). **Б** - Зависимости равновесного сигнала биосенсора от концентрации контрольного ингибитора (1 - для мономеров, 2 - для димеров пВИЧ).



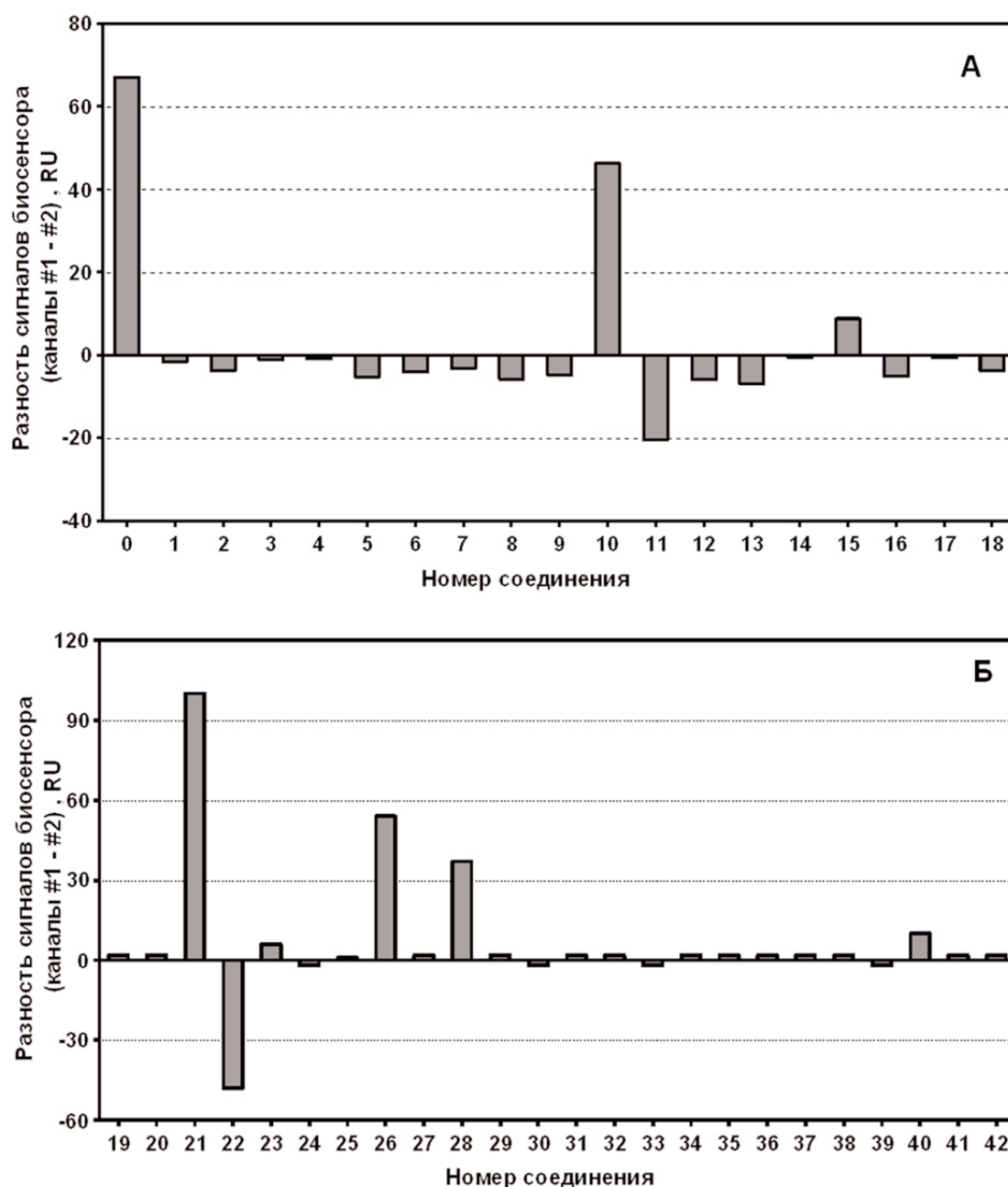


Рисунок 6.

Результаты биосенсорного скрининга *in vitro* потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ.

А - скрининг первой группы соединений (номера соответствуют таблице 1). Соединение с номером 0 - положительный контроль (ингибитор Шрамма). Б - скрининг второй группы соединений (номера соответствуют таблице 2).

Таким образом, в результате экспериментального тестирования потенциальных ингибиторов димеризации пВИЧ было найдено только одно соединение-кандидат (№ 10), удовлетворяющее условиям скрининга. Оно входит в выборку соединений, предсказанных ранее с помощью виртуального скрининга [13]. Необходимо отметить, что остальные 11 соединений из данной выборки (№№ 1-9, 11, 12) дали отрицательный результат, что является важной информацией для оценки эффективности виртуальных методов скрининга подобных соединений.

Необходимо также отметить, что ни одно из 24 соединений из второй группы (производные глицирризина, тритерпеновых и стероидных гликозидов) не показало специфических взаимодействий, характерных для ингибиторов димеризации пВИЧ, и, по-видимому, данные соединения ингибиторами димеризации пВИЧ не являются.

*Биохимическое тестирование ингибиторов пВИЧ.* Для биохимического тестирования были выбраны соединения № 0 (положительный контроль - ингибитор Шрамма), № 10 (соединение, показавшее позитивный результат в биосенсорной тест-системе на селективное взаимодействие с мономерами пВИЧ) и № 3 (отрицательный контроль - соединение, имеющее наибольшее структурное сходство с соединением № 10, но показавшее отрицательный результат в биосенсорной тест-системе).

Полученные результаты представлены на рисунке 7. Видно, что соединение № 3 не оказывает ингибирующего эффекта на активность пВИЧ, в то время как действие соединения № 10 было сравнимо с действием пептидного ингибитора Шрамма (рис. 7А). Из графиков зависимости активности фермента (в %) от концентрации соединения № 10 и ингибитора Шрамма (рис. 7Б) были вычислены их концентрации, вызывающие 50% торможение активности фермента ( $IC_{50}$ ), которые оказались порядка 1 мкМ. Надо отметить, что полученное значение  $IC_{50}$  для ингибитора Шрамма хорошо согласуется с литературными данными (0,5 мкМ, [23]).

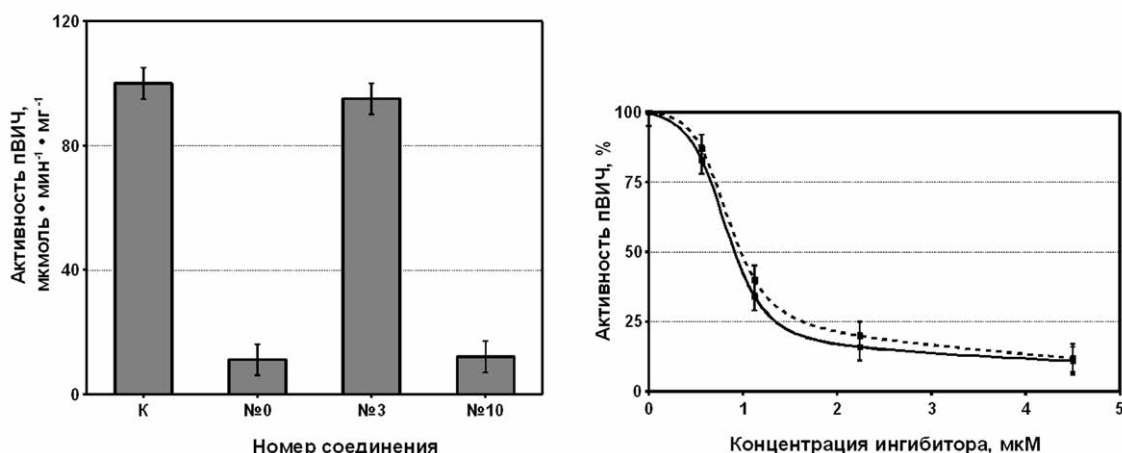


Рисунок 7.

Биохимическое тестирование ингибиторов пВИЧ.

**А** - Анализ ингибирования активности пВИЧ соединением № 10 (активность пВИЧ выражена в мкмоль субстрата • мин<sup>-1</sup> • мг<sup>-1</sup> белка). Обозначения: К - контроль активности пВИЧ; № 0 - ингибитор Шрамма (положительный контроль); № 3 - соединение № 3 (отрицательный контроль); № 10 - соединение номер № 10. Концентрации всех трех соединений - 4,5 мкМ.

**Б** - Зависимость активности пВИЧ от концентрации контрольного ингибитора Шрамма (сплошная линия) и соединения № 10 (пунктирная линия).

Таким образом, в результате применения биосенсорного анализа взаимодействия потенциальных ингибиторов димеризации с пВИЧ в сочетании с современными методами энзимологии был выполнен экспериментальный скрининг соединений-кандидатов и был идентифицирован один новый низкомолекулярный ингибитор димеризации пВИЧ непептидной природы.

Данная работа была частично поддержана программой РАМН “Протеомика для медицины и биотехнологии” и РФФИ (грант 07-04-00575).

Мы также благодарим компанию ЗАО “ХВД Биотех” (Москва, Россия) за научную и техническую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Veselovsky A.V., Ivanov Y.D., Ivanov A.S., Archakov A.I., Lewi P., Janssen P. (2002) *J. Mol. Recognit.*, **15**, 405-422.
2. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000) *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.
3. Jones S., Thornton J.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13-20.
4. Dunn B.M., Goodenow M.M., Gustchina A., Wlodawer A. (2002) *Genome Biology*, **3**(4), reviews 3006. 1-3006.7.
5. Oroszlan S., Luftig R.B. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **157**, 153-185.
6. De Clercq E. (2004) *Med. Chem. Res.*, **13**(6/7), 439-478.
7. Ala P.J., Huston E.E., Klabbe R.M., McCabe D.D., Duke J.L., Rizzo C.J., Korant B.D., DeLoskey R.J., Lam P.Y., Hodge C.N., Chang C.H. (1997) *Biochemistry*, **36**, 1573-1580.
8. Rodriguez-Barrios F., Gago F. (2004) *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **4**, 671-686.
9. Koh Y., Matsumi S., Das D., Amano M., Davis D.A., Li J., Leschenko S., Baldrige A., Shioda T., Yarchoan R., Ghosh A.K., Mitsuya H. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 28709-28720.
10. Boggetto N., Reboud-Ravaux M. (2002) *Biol. Chem.*, **383**(9), 1321-1324.
11. Veselovsky A.V., Ivanov A.S. (2003) *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, **3**, 33-40.
12. Ivanov A.S., Veselovsky A.V., Dubanov A.V., Skvortsov V.S. (2005) *Meth. Mol. Biol.*, **316**, 389-432.
13. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Mezentssev Y.V., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2007) *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **5**(2b), 579-592.
14. McDonnell J.M. (2001) *Cur. Op. Chem. Biol.*, **5**, 572-577.
15. Rich R.L., Myszka D.G. (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 54-61.
16. Patočka J. (2003) *J. Applied Biomedicine*, **1**, 7-12.
17. Ito M., Nakashima H., Baba M., Pauwels R., De Clercq E., Shigeta S., Yamamoto N. (1987) *Antiviral Research*, **7**(3), 127-137.
18. Nakashima H., Matsui T., Yoshida O., Isowa Y., Kido Y., Motoki Y., Ito M., Shigeta S., Mori T., Yamamoto N. (1987) *Japanese J. Cancer Res.*, **78**, 767-771.
19. Ito M., Sato A., Hirabayashi K., Tanabe F., Shigeta S., Baba M., De Clercq E., Nakashima H., Yamamoto N. (1988) *Antiviral Res.*, **10**(6), 289-298.
20. Asl M.N., Hosseinzadeh H. (2008) *Phytotherapy Research*, **22**(6), 709-724.
21. Quéré L., Wenger T., Schramm H.J. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **227**(2), 484-488.
22. Park S.H., Raines R.T. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 847-851.
23. Schramm H.J., Boetzel J., Büttner J., Fritsche E., Göhring W., Jaeger E., König S., Thumfart O., Wenger T., Nagel N.E., Schramm W. (1996) *Antiviral. Res.*, **30**(2-3), 155-170.
24. Biacore Sensor Surface Handbook (Biacore ©, 2003) chapter 4.4.
25. BIAevaluation Software Handbook v.4 (Biacore ©, 2004) chapter 4.
26. Markgren P.O., Hamalainen M., Danielson U.H. (1998) *Anal. Biochem.*, **265**(2), 340-350.
27. Markgren P.O., Hamalainen M., Danielson U.H. (2000) *Anal. Biochem.*, **279**(1), 71-78.
28. Markgren P.O., Lindgren M.T., Gertow K., Karlsson R., Hamalainen M., Danielson U.H. (2001) *Anal. Biochem.*, **291**(2), 207-218.

Поступила: 14. 10. 2008.

**BIOSENSOR ANALYSIS OF INTERACTION OF POTENTIAL DIMERIZATION  
INHIBITORS WITH HIV-1 PROTEASE**

*P.V. Ershov, O.V. Gnedenko, A.A. Molnar, A.V. Lisitsa, A.S. Ivanov, A.I. Archakov*

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,  
Pogodinskaya str. 10, Moscow, 119121 Russia: fax: +007(499)245 0857; e-mail: ersh2006@list.ru

Currently inhibitors of protein-protein interactions are considered as perspective prototypes of new generation of drugs. The most attractive targets for such inhibitors are the oligomeric enzymes which active sites are formed by amino acid residues from different subunits. The classic example of such enzyme is HIV protease (HIVp), active only in the homodimeric form. We have developed a new approach for experimental screening of HIVp dimerization inhibitors. It is based on the original biosensoric test-system for differential analysis of interaction of tested substances with HIVp dimers and monomers. Using this test-system we have analyzed the most perspective candidate substances predicted by method of virtual screening, and some derivatives of glycyrrhizin, triterpenic and steroid glycosides. As a result we found one compound, which mainly interacts with HIVp monomers and inhibits *in vitro* activity of this enzyme with IC<sub>50</sub> of about 10<sup>-6</sup> M.

**Key words:** HIV-1 protease, dimerization, inhibitors of dimerization, validation, optical biosensor, surface plasmon resonance.