

ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, ПОЛЕЗНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГРАММЫ И СЕРВИСЫ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SPR БИОСЕНСОРА ПРИ ПОИСКЕ ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ПРИМЕРЕ ЦИТОХРОМА P450(51) В КАЧЕСТВЕ БЕЛКА-МИШЕНИ

Л.А. Калужский^{1*}, П.В. Еришов¹, Т.В. Шкель², О.В. Гнеденко¹, Н.В. Иванчина³, Н.В. Струшкевич²,
А.А. Кича³, И.П. Грабовец², А.А. Гилев², С.А. Усанов², В.А. Стоник³, А.С. Иванов¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул. 10; *эл. почта : la-kaluzhskiy@yandex.ru

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Беларусь, 220141, Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича 5/2

³Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук,
690022, Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку 159

Интеграция различных компьютерных, биоинформатических и экспериментальных технологий в единую платформу, покрывающую путь “от гена до прототипа лекарства”, значительно ускорила и оптимизировала поиск базовых структур для создания новых лекарственных препаратов. При этом необходимость экспериментальной проверки найденных компьютерными методами сотен структурных гипотез, представляющих собой выборки из молекулярных баз данных или сконструированных de novo соединений, требует привлечения быстрых и чувствительных скрининговых методов анализа их возможных взаимодействий с белком-мишенью. А в случае позитивного результата и возможности количественной оценки аффинности, кинетики и термодинамики межмолекулярного взаимодействия. Технология поверхностного плазмонного резонанса (SPR) позволяет решать все перечисленные задачи. В данной статье рассматриваются методические аспекты применения оптического SPR биосенсора для поиска прототипов лекарственных средств на примере цитохрома P450(51) человека, катализирующего ключевую стадию биосинтеза холестерина.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс (SPR); скрининг; цитохром P450(51) человека; прототипы лекарственных средств

DOI: 10.18097/BMCRM00055

ВВЕДЕНИЕ

За последнее время создание интегрированной платформы “от гена до прототипа лекарства”, объединившей компьютерные, биоинформатические и экспериментальные подходы, позволило значительно ускорить и оптимизировать процессы поиска базовых структур для создания новых лекарственных препаратов. Компьютерное моделирование, виртуальный скрининг и предсказание свойств будущего лекарственного препарата позволяют значительно сократить время и стоимость начальной стадии разработки нового лекарства [1].

Полученную выборку соединений, которые, согласно компьютерному моделированию, могут взаимодействовать с молекулярной мишенью, необходимо тестировать в реальных экспериментах *in vitro* с использованием чувствительных и высокопроизводительных технологий. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) является методом первого выбора для решения подобных задач, поскольку позволяет регистрировать факт физического взаимодействия соединения с белком-мишенью в режиме реального времени и определять константы скоростей ассоциации и диссоциации комплексов, равновесную константу диссоциации комплекса (K_d) и даже термодинамические параметры процесса. В данной статье рассматриваются методические аспекты применения оптического SPR биосенсора для поиска прототипов лекарственных средств на примере цитохрома P450(51) человека, катализирующего ключевую стадию биосинтеза холестерина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве молекулярной мишени был использован препарат рекомбинантного цитохрома P450(51) человека (CYP51A1) (>95% чистоты по данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях). Белок был получен и очищен по протоколу, описанному

ранее [2]. Низкомолекулярные соединения, использованные в работе, получены согласно ранее опубликованным протоколам [3-11].

Следующие реактивы были получены от фирмы-производителя оборудования (“GE Healthcare”, США): HBS-N буфер (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), ацетатные буферы (10 mM ацетат натрия, pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5), 1 M этаноламин-HCl (pH 8.5). Остальные реактивы аналитической чистоты были получены от отечественных поставщиков.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

SPR анализ был выполнен с применением оптического биосенсора Biacore 3000 (“GE Healthcare”). В работе были использованы оптические чипы типа CM5 (“GE Healthcare”), поверхность которых покрыта карбоксиметилированным декстраном для ковалентной иммобилизации белка-лиганда путём образования амидных связей между карбоксильными группами декстрана и свободными аминогруппами белков. В качестве рабочего буфера был использован буфер HBS-N. Все измерения проводили при температуре 25°C. Полученные сенсограммы представляли собой запись сигнала биосенсора в реальном времени в резонансных единицах RU (1 RU соответствует 1 пг белка на поверхности оптического чипа). Результирующий сигнал биосенсора представлял собой разницу между рабочим (с иммобилизованным белком-лигандом) и контрольным (без белка) каналами биосенсора. Значения констант скорости ассоциации и диссоциации комплексов, а также K_d комплексов вычислялись с использованием лицензионной компьютерной программы Biacore BIAevaluation v.4.1 (“GE Healthcare”).

Выбор иммобилизационного буфера

Для выбора оптимального значения pH иммобилизационного буфера были приготовлены образцы растворов CYP51A1 концентрации 20 мкг/мл



в 10 мМ ацетатных буферах с pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5. Они были инжестированы в течении 2-х мин при скорости потока 5 мкл/мин для оценки уровня прекоцентрирования белка у поверхности чипа CM5. При этом активация поверхности чипа смесью EDC/NHS не проводилась. После каждой инъекции поверхность чипа промывали 50 мМ NaOH в течении 30 с при скорости потока 35 мкл/мин.

Ковалентная иммобилизация CYP51A1 на оптическом чипе CM5

Согласно протоколу ковалентной иммобилизации белков за аминогруппы [3-5] были последовательно выполнены следующие процедуры: (1) активация карбоксильных групп декстрана чипа CM5 инъекцией смеси равных объёмов 0.2 М EDC и 0.05 М NHS в течении 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин, (2) инъекция раствора белка-лиганда в иммобилизационном буфере (20 мкг/мл раствор CYP51A1 в 10 мМ ацетатном буфере с pH 5.0) в течении 10 мин при скорости потока 5 мкл/мин, (3) инактивация непрореагировавших с белком активированных карбоксильных групп декстрана путём инъекции 1 М этаноламина-HCl (pH 8.5) в течение 1 мин при скорости потока 5 мкл/мин.

Подготовка образцов низкомолекулярных соединений для скринингового SPR анализа

Маточные 3 мМ растворы исследованных низкомолекулярных соединений готовили путём их растворения в диметилсульфоксиде (DMSO). Рабочие растворы соединений получали разведением маточных растворов рабочим буфером HBS-N до концентрации 30 мкМ. При этом конечное содержание DMSO в анализируемых образцах составляло 1%. Для минимизации скачкообразного сдвига сигнала биосенсора (так называемого балк-эффекта) при инъекции тестовых образцов, обусловленного разницей коэффициентов преломления образца и рабочего буфера, в последний добавляли DMSO до конечной концентрации 1%. Образцы последовательно инжестировали в течение 6 мин при скорости потока 10 мкл/мин. После инъекции каждого образца проводили двукратную промывку рабочего и контрольного каналов биосенсора регенерирующим раствором (2 М NaCl, 0.4% масса/объём CHAPS) в течение 17 с при скорости потока 35 мкл/мин. Анализ выполнялся в автоматическом режиме по следующему протоколу, записанному в управляющей программе биосенсора Biacore 3000 Control Software v4.1 ("GE Healthcare"), в подпрограмме "New Application Wizard – Customized Application":

1. Cycle Settings (команда устанавливает общие параметры анализа)

- Temperature: 25 (°C) (установка рабочей температуры)
- Detection Mode: 2-1 (установка режима регистрации сигналов каналов биосенсора – в канале 2 находится иммобилизован белок-лиганд, пустой канал 1 использован в качестве контрольного)

2. Keyword (установка опознавательного слова-метки для записываемой сенсограммы)

- Keyword: Sample_ID (в приведённом примере используется вариативное значение – уникальный идентификатор экспериментального образца)

3. Flow (установка скорости потока рабочего буфера)

- Flow: 10 (µl/min)

4. Wait (установка времени промывки рабочим буфером с установленной ранее скоростью)

- Time: 300 (s)

5. Inject (установка параметров инъекции)

- Injection Mode: Optimized for kinetics, including dissociation time (KINJECT) (установка типа инъекции)

- Solution: Sample_ID – Vary by Cycle (формирование списка экспериментальных образцов)

- Volume: 60 (µl) (установка объёма инъекции)

- Dissociation Time: 120 (s) (установка времени регистрации распада комплекса)

- Report Point (установка параметров метки точки базовой линии)

- Time: 10 (s) Before Injection Start

- Window: 5 (s)

- Id: baseline

- Baseline

- Inject End

- Report Point (установка параметров метки точки конца инъекции)

- Time: 10 (s) After Injection End

- Window: 5 (s)

- Id: bound

6. Wait

- Time: 180 (s)

7. Flow

- Flow: 35 (µl/min)

8. Inject

- Injection Mode: Optimized for speed, minimum wash (QUICKINJECT)

- Solution: "Regeneration"

- Volume: 10 (µl)

9. Inject

- Injection Mode: Optimized for speed, minimum wash (QUICKINJECT)

- Solution: "Regeneration"

- Volume: 10 (µl)

10. Wait

- Time: 60 (s)

11. Flow

- Flow: 10 (µl/min)

12. Wait

- Time: 180 (s)

Уровень сигнала связывания низкомолекулярного соединения с белком-мишенью выше 15 RU считали позитивным результатом скрининга. В этом случае для дальнейшего количественного анализа выявленного взаимодействия готовили серию тестовых образцов данного соединения с разными концентрациями.

SPR анализ аффинности и термодинамических параметров взаимодействия между белком-мишенью и выявленным при скрининге позитивным тестовым соединением

Промежуточный раствор низкомолекулярного соединения готовили путём разведения маточного раствора HBS-N буфером до концентрации 100 мкМ (содержание DMSO составляло 3.33%). Из данного раствора готовили серию тестовых образцов с концентрациями соединения в диапазоне 1-100 мкМ.

Для выравнивания коэффициента преломления (R_i) каждого образца из серии и рабочего буфера биосенсора применяли следующую последовательность действий с использованием прецизионного рефрактометра RX-5000 ("ATAGO", Япония):

- Определяли R_i HBS-N буфера (R_{i1}).
- Определяли R_i промежуточного раствора соединения (R_{i2}).
- Определяли R_i буфера HBS-N с добавкой 3.33% DMSO (R_{i3}).
- Вычисляли поправочный коэффициент R_{iK} по формуле 1:

$$Ri_K = \frac{(Ri_2 - Ri_1)}{(Ri_2 - Ri_1)} \quad (1)$$

Далее готовили все образцы серии с различной концентрацией низкомолекулярного соединения путём разбавления промежуточного раствора (100 мкМ) с использованием рабочего буфера, в который был добавлен DMSO. Содержание DMSO в рабочем буфере вычисляли с помощью поправочного коэффициента по формуле 2:

$$C_{DMSO} = 0.033 \times Ri_K \quad (2)$$

Полученную серию образцов последовательно инжестировали через рабочий и контрольный каналы биосенсора в течение 6 мин при скорости потока 10 мкл/мин с последующей регистрацией диссоциации комплекса в течение 6 мин. После окончания каждой инъекции осуществляли двукратную промывку каналов биосенсора регенерирующим раствором (2 М NaCl, 0.4% масса/объём CHAPS) в течение 17 с при скорости потока 35 мкл/мин. Анализ выполнялся в автоматическом режиме согласно следующему протоколу, записанному в управляющей программе биосенсора Biacore 3000 Control Software v4.1 (“GE Healthcare”), с помощью подпрограммы “New Application Wizard – Customized Application”:

1. Cycle Settings

- Temperature: 25 (°C)
- Detection Mode: 2-1

2. Keyword

- Keyword: Sample_ID

3. Flow

- Flow: 10 (µl/min)

4. Wait

- Time: 300 (s)

5. Inject

- Injection Mode: Optimized for kinetics, including dissociation time (KINJECT)
- Solution: Sample_ID - Vary by Cycle
- Volume: 60 (µl)

d. Dissociation Time: 360 (s) (в приведённом примере установлена регистрация процесса диссоциации комплекса к течению 6 мин). Для некоторых соединений, показавших крайне низкую скорость распада комплекса с белком-мишенью (СУР51А) данный параметр увеличивали до 20 мин.

e. Report Point

- Time: 10 (s) Before Injection Start
- Window: 5 (s)
- Id: baseline
- Baseline

6. Inject End

a. Report Point

- Time: 10 (s) After Injection End
- Window: 5 (s)
- Id: bound

7. Wait

- Time: 180 (s)

8. Flow

- Flow: 35 (µl/min)

9. Inject

- Injection Mode: Optimized for speed, minimum wash (QUICKINJECT)
- Solution: “Regeneration”
- Volume: 10 (µl)

10. Inject

- Injection Mode: Optimized for speed, minimum wash (QUICKINJECT)
- Solution: “Regeneration”
- Volume: 10 (µl)

11. Wait

- Time: 60 (s)

12. Flow

- Flow: 10 (µl/min)

13. Wait

- Time: 180 (s)

Для измерения термодинамических параметров взаимодействия описанный выше SPR анализ серии образцов с разной концентрацией тестового соединения многократно повторяли при рабочих температурах в диапазоне 10-40°C с шагом в 5 градусов. Полученная температурная зависимость K_d низкомолекулярного соединения с белком-мишенью была использована для построения зависимости изменения свободной энергии Гиббса (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) [12, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор иммобилизационного буфера

Все белки-мишени отличаются по эффективности иммобилизации на оптических чипах СМ из-за разных значений их изоэлектрических точек, поэтому для оптимизации условий иммобилизации выполняли процедуру так называемого рН скаутинга, представляющую собой экспериментальный подбор оптимального значения рН иммобилизационного буфера, при котором наблюдается максимальное прекоцентрирование белка у поверхности чипа. На рисунке 1 в качестве примера показан результат рН скаутинга для СУР51А1. Видно, что максимальная прекоцентрация наблюдалась в 10 мМ ацетатном буфере при рН 5.0.

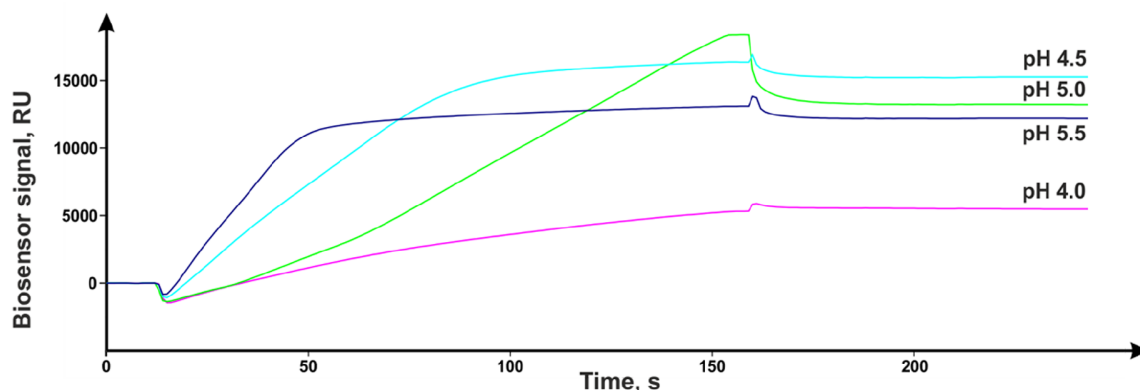


Рисунок 1. Сенсограммы поиска рН буфера, оптимального для иммобилизации СУР51А1.

Иммобилизация CYP51A1 на поверхности оптического чипа CM5

Согласно сложившейся практике по выбору типа оптического чипа для иммобилизации белковых молекул, принимают во внимание необходимый уровень массы иммобилизованного белка на поверхности чипа. Так, для проведения скрининговых исследований с низкомолекулярными анантами с молекулярной массой меньше 1 кДа уровень иммобилизации белка-лиганда должен быть достаточно высоким (от 5000 до 15000 RU). Это необходимо для обеспечения максимальной чувствительности при регистрации взаимодействий. Поэтому в данном случае предпочтение отдавалось выбору чипа CM5, поверхность которого содержит наибольшее число карбоксильных групп.

На рисунке 2 приведена типичная сенсограмма иммобилизации белка-мишени (на примере CYP51A1) на карбоксиметилдекстрановой поверхности чипа CM5.

Скрининговый анализ взаимодействия выборки низкомолекулярных соединений с иммобилизованным на чипе CYP51A1

Из опыта наших работ [3-5] мы сделали вывод, что для выполнения SPR скрининга оптимально использовать растворы тестовых соединений с концентрацией 30 мкМ. Для различных моделей SPR биосенсоров существует разный порог детекции низкомолекулярных соединений по минимальной молекулярной массе. В нашей работе был использован оптический биосенсор Biacore 3000, для которого данный порог составляет 150 Да. Молекулярная масса всех тестовых соединений была больше указанного порога. При анализе результатов SPR скрининга важным моментом является выбор уровня отсечки, то есть величины сигнала биосенсора, при превышении которой результат теста при инъекции раствора тестового соединения считается позитивным. Выбор оптимального порога отсечки определяет эффективность скрининга – при снижении значения отсечки чувствительность теста растёт, а специфичность, следовательно, снижается.

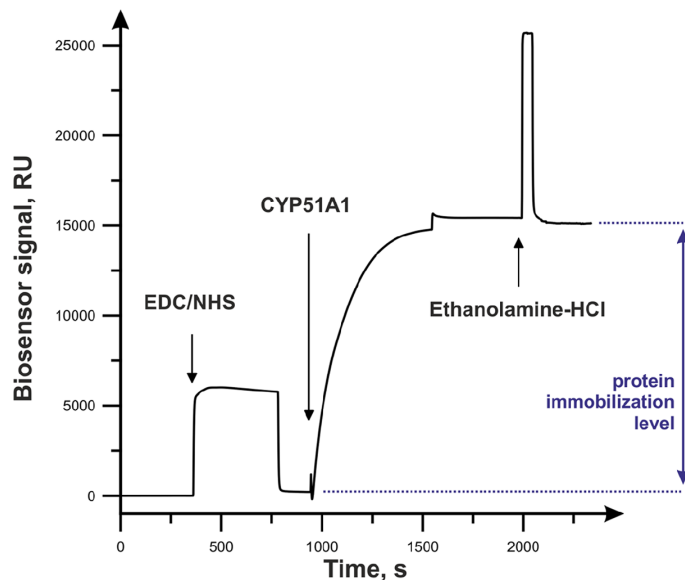


Рисунок 2. Типичная сенсограмма иммобилизации CYP51A1 на поверхности оптического чипа CM5. Стрелками указаны моменты начала инъекций растворов.

В экспериментах с CYP51A1 уровень значимого порога отсечки был установлен 15 RU, что значительно превышает уровень шума и скорость дрейфа сигнала биосенсора. При повторных измерениях коэффициент вариации (CV) снижался с 10% до 2.5%. На рисунке 3 показаны результаты скрининга выборки 39 низкомолекулярных соединений (гликозидов, выделенных из экстрактов морских животных и растений) и природного субстрата CYP51A1 (ланостерола), для которого ранее были получены кристаллографические данные и определены сайты связывания с молекулой белка [2]. Позитивный результат взаимодействия с CYP51A1 показал 21 образец. Последующий анализ аффинности выявленных взаимодействий показал, что у 19 соединений значения K_d находятся в диапазоне 1–100 мкМ, а одно соединение

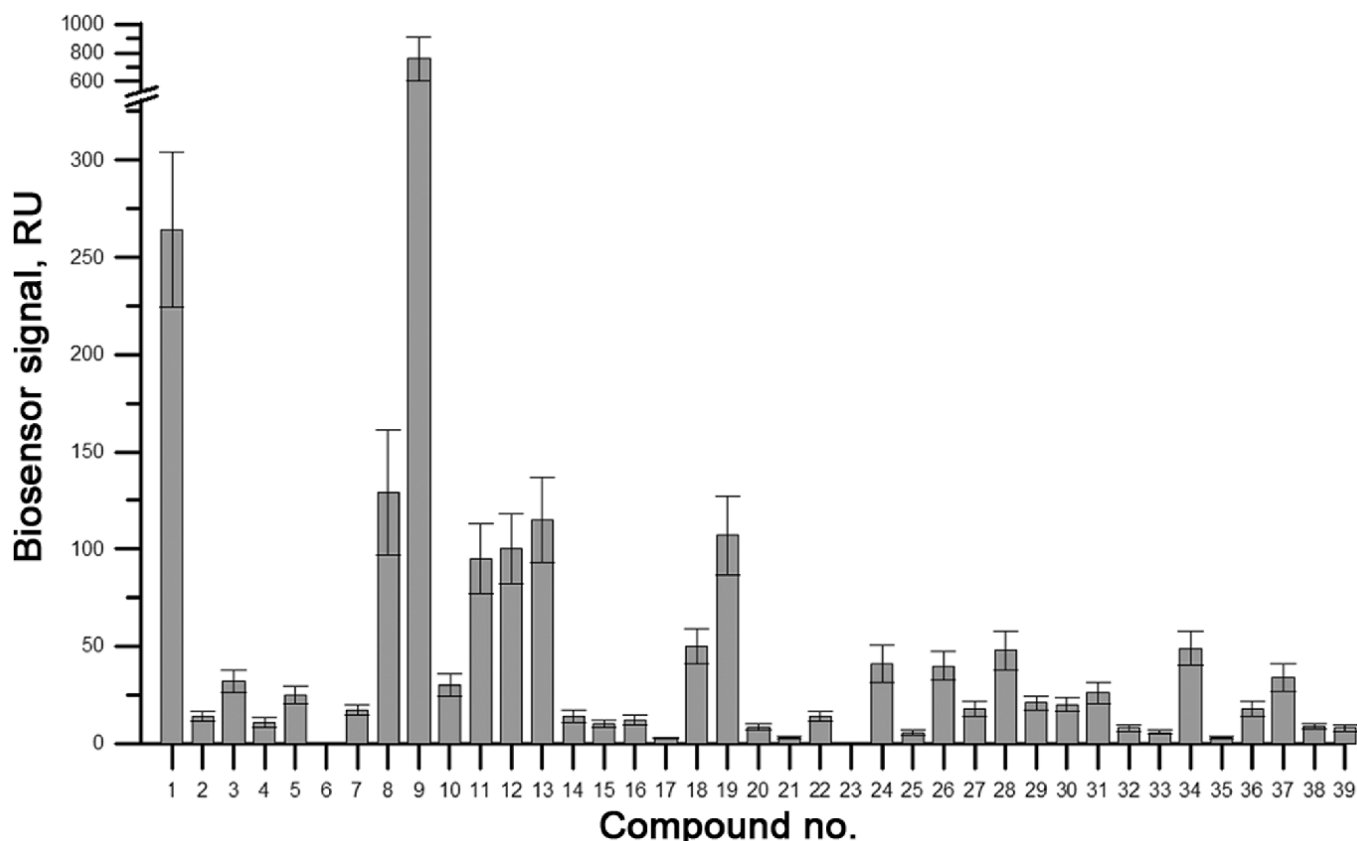


Рисунок 3. Результат SPR скрининга низкомолекулярных соединений по взаимодействию с CYP51A1 *in vitro* [4].

связывалось с CYP51A1 с K_d приблизительно 0.27 мкМ. Последующий анализ данных комплексов с помощью технологии спектрального титрования показал, что данные соединения не взаимодействуют с активным центром CYP51A1, что свидетельствует о наличии сайта связывания подобных соединений на поверхности белковой молекулы [4].

На рисунке 4 показан другой пример SPR скрининга выборки из 11 соединений стероидной природы на их способность взаимодействовать с CYP51A1. Был получен позитивный результат для 9 соединений. Для данных комплексов значения K_d оказались в диапазоне 0.1–10 мкМ [5].

На рисунке 5 в качестве примера показана серия сенсограмм, полученная для взаимодействия разных концентраций левискулозида G (соединение 6 на рис. 4) с CYP51A1. Из данного набора сенсограмм рассчитывали величину K_d с использованием теоретической модели поверхностного связывания Лэнгмюра (1:1). Для данного соединения значение K_d составило 0.65 мкМ [5].

Далее соединения 1, 2, 4-7, 9-11, показавшие позитивный результат при SPR скрининге, были проверены на способность взаимодействовать с активным центром CYP51A1 с помощью технологии спектрального титрования. Для четырёх соединений (ланостерол, хенрициозид H1, левискулозид G, астеросапонин P1) был получен позитивный

результат, свидетельствующий о непосредственном их взаимодействии с атомом железа в геме цитохрома, находящегося в активном центре фермента. Для данных взаимодействий были получены значения K_d в диапазоне 10^{-6} – 10^{-8} М [5]. Найденные новые лиганды CYP51A1, способные взаимодействовать с активным центром фермента, были далее проверены с помощью биохимического теста в реконструированной монооксигеназной системе цитохрома P450(51) по методу Trosken и соавт. [14] с незначительными изменениями [2, 5]. Два соединения (хенрициозид H1 и левискулозид G) показали способность ингибировать активность CYP51A1 со значением IC_{50} 80-90 мкМ [5]. Таким образом, поскольку эти соединения являются ингибиторами активности CYP51A1, то следующим этапом будут исследования, посвященные тестированию новых химически модифицированных базовых структур для поиска такого низкомолекулярного соединения прототипа лекарства, которое бы связывалось с CYP51A1 с более высокой аффинностью и обладало большим потенциалом ингибиторного действия. Ввиду наличия высокой субстратной специфичности для цитохромов семейства P450(51) [15], найденные при SPR скрининге новые соединения могут представлять интерес в качестве ингибиторов других представителей данного семейства, которые рассматриваются как потенциальные мишени для терапии паразитарных инвазий и микозов [16].

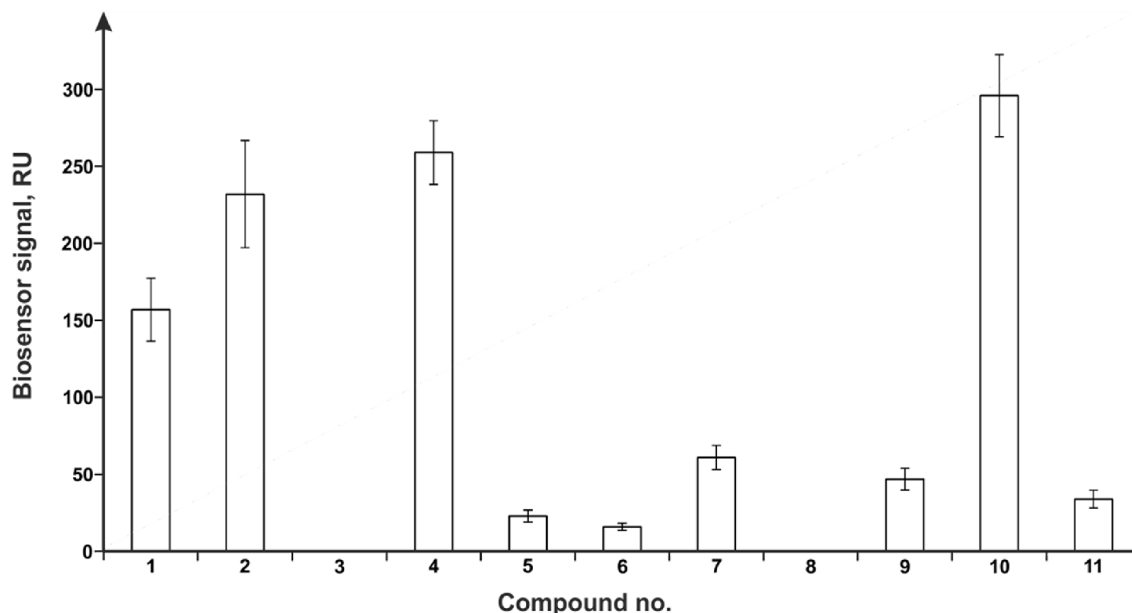


Рисунок 4. Результат SPR скрининга стероидных соединений на их способность взаимодействовать с CYP51A1 *in vitro* [5].

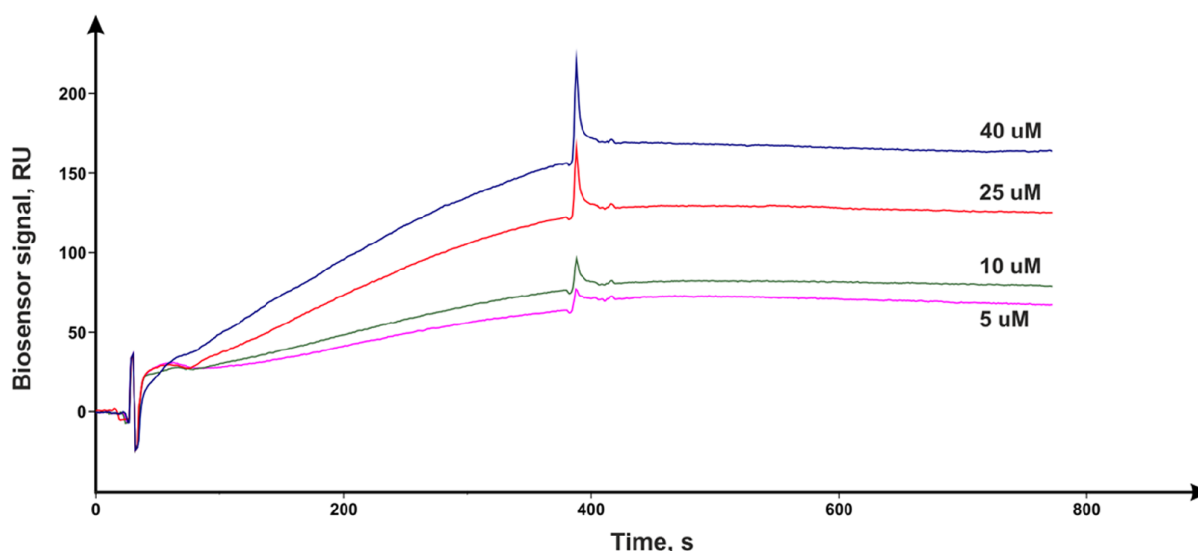


Рисунок 5. Сенсограммы взаимодействия левискулозида G с CYP51A1.

Помимо данных о кинетических и равновесных параметрах взаимодействий, SPR-анализ позволяет получить данные о термодинамических параметрах взаимодействия исследуемого соединения с макромолекулой-мишенью. Эти данные позволяют оценить вклад различных термодинамических компонент в процесс комплексообразования. На рисунке 6 приведены ранее не опубликованные термодинамические данные для взаимодействия ряда низкомолекулярных соединений с CYP51A1 (ланостерола (соединение 1 на рис. 3, 4), кетоконазола (известный ингибитор CYP51A1 [2], K_d – приблизительно 6 мкМ [3]), голотурина А (соединение 26 на рис. 3), астеросапонина P1 (соединение 7 на рис. 4), бетулафолиентриола (соединение 29 на рис. 3), теасапонина (соединение 34 на рис. 3), левискулозида G (соединение 6 на рис. 4), хенрициозида H1 (соединение 5 на рис. 4), дигитонина (соединение 27 на рис. 3). Значительное изменение энтальпии в ходе взаимодействия может говорить о заметном вкладе в процесс взаимодействия электростатических взаимодействий, образования солевых мостиков или водородных связей и изменения конформации белка, в то время как изменение энтропийной составляющей говорит о вкладе гидрофобных взаимодействий и перестройках сольватных оболочек взаимодействующих молекул [17].

Таким образом, с помощью SPR-анализа можно получить следующие данные о характере взаимодействия низкомолекулярного соединения:

- зафиксировать сам факт взаимодействия;
- определить K_d комплекса “белок – низкомолекулярное соединение”;
- определить константы скоростей ассоциации и диссоциации комплексов;
- определить термодинамические параметры процесса комплексообразования для понимания природы межмолекулярных взаимодействий и ведущей роли энтропии/энтальпии.

Вышесказанное подтверждает, что оптический биосенсор как средство первичного поиска прототипов новых лекарственных препаратов и количественной характеристики конкретного взаимодействия органично сочетается с рядом дополнительных методов (электрохимические, биохимические, спектральные, компьютерное молекулярное моделирование, кристаллография).

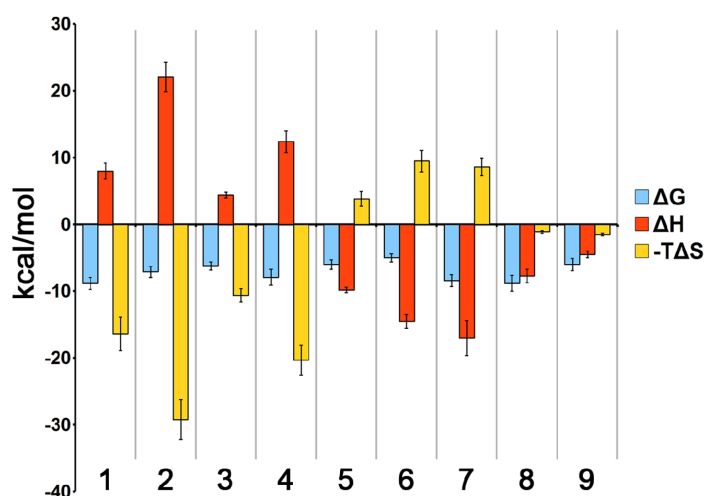


Рисунок 6. Термодинамические параметры взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51A1. 1 - ланостерол, 2 - кетоконазол, 3 - голотурин А, 4 - астеросапонин P1, 5 - бетулафолиентриол, 6 - теасапонин, 7 - левискулозид G, 8 - хенрициозид H1, 9 - дигитонин; ΔG - изменение энергии Гиббса, ΔH - изменение энтальпии, $-T\Delta S$ - изменение энтропии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (0518-2018-0003) с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ, поддержанном Минобрнауки РФ в рамках соглашения №14.621.21.0017 (идентификатор RFMEFI62117X0017). Экспрессия белков, спектральное титрование и биохимический анализ были выполнены при поддержке Государственной программы Республики Беларусь “Наукоёмкие технологии и техника” на 2016-2020 гг (подпрограмма 1, “Инновационные биотехнологии – 2020”).

ЛИТЕРАТУРА

- Ivanov, A.S., Veselovsky, A.V., Dubanov, A.V., Skvortsov, V.S. (2006) Bioinformatics platform development: from gene to lead compound. *Methods in Molecular Biology*, 316, 389-431. DOI: 10.1385/1-59259-964-8:389
- Strushkevich, N., Usanov S.A., Park H.W. (2010) Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles. *Journal of Molecular Biology*, 397(4), 1067-1078. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.01.075
- Gnedenko, O.V., Kaluzhskiy, L.A., Molnar, A.A., Yantsevich, A.V., Mukha, D.V., Gilep, A.A., Usanov, S.A., Stonik, V.A., Ivanov, A.S., Lisitsa, A.V., Archakov, A.I. (2013) The SPR-based biosensor test system for analysis of small compounds interaction with human cytochrome P450 51A1 (CYP51A1). *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B, Biomedical Chemistry*, 7, 187-195. DOI: 10.1134/S1990750813030049
- Kaluzhskiy, L.A., Gnedenko, O.V., Gilep, A.A., Strushkevich, N.V., Shkel, T.V., Chernovetsky, M.A., Ivanov, A.S., Lisitsa, A.V., Usanov, A.S., Stonik, V.A., Archakov, A.I. (2014) Screening of human cytochrome P450(51) (CYP51A1) inhibitors: structural lanosterol analogues of plant and animal origin. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B, Biomedical Chemistry*, 8, 349-360. DOI: 10.1134/S199075081404012X
- Kaluzhsky, L.A., Shkel, T.V., Ivanchina, N.V., Kicha, A.A., Grabovec, I.P., Gilep, A.A., Strushkevich, N.V., Chernovetsky, M.A., Medvedev, A.E., Usanov, S.A., Ivanov, A.S. (2017) Structural analogues of lanosterol from marine organisms of the class *Asteroidea* as potential inhibitors of human and *Candida albicans* lanosterol 14 α -demethylases. *Natural Product Communications*, 12(12), 1843-1846.
- Kicha, A.A., Kalinovskiy, A.I., Levina, E.V., Stonik, V.A., Elyakov, G.B. (1983) Asterosaponin P1 from the starfish *Patiria pectinifera*. *Tetrahedron Letters*, 24, 3893-3896. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)94305-3
- Kicha, A.A., Ivanchina, N.V., Gorshkova, I.A., Ponomarenko, L.P., Likhatskaya, G.N., Stonik, V.A. (2001) The distribution of free sterols, polyhydroxysteroids and steroid glycosides in various body components of the starfish *Patiria (=Asterina) pectinifera*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 128, 43-52. DOI: 10.1016/S1096-4959(00)00317-1
- Kicha, A.A., Kalinovskii, A.I., Gorbach, N.V., Stonik, V.A. (1993) New polyhydroxysteroids from the Far Eastern sea star *Henricia* sp. *Chemistry of Natural Compounds*, 29, 206-210. DOI: 10.1007/BF00630116
- Kicha, A.A., Kalinovskii, A.I. (1993) Isolation of laeviuscoloside G from the starfish *Henricia derjugini* and correction of the structures of echinasterosides B₁ and B₂. *Chemistry of Natural Compounds*, 29, 547-548. DOI: 10.1007/BF00630593
- Kicha, A.A., Kapustina, I.I., Ivanchina, N.V., Kalinovskiy, A.I., Dmitrenok, P.S., Stonik, V.A., Pal'yanova, N.V., Pankova, T.M., Starostina, M.V. (2008) Polyhydroxylated steroid compounds from the Far Eastern starfish *Distolasterias nipon*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 34, 118–124. DOI: 10.1134/S1068162008010160
- Ivanchina, N.V., Kicha, A.A., Huong, T.T., Kalinovskiy, A.I., Dmitrenok, P.S., Agafonova I.G., Long, P.Q., Stonik, V.A. (2010) Highly hydroxylated steroids of the starfish *Archaster typicus* from the Vietnamese waters. *Steroids*, 75, 897-904. DOI: 10.1016/j.steroids.2010.05.012
- Myszka, D.G. (2000) Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. *Methods in Enzymology*, 323, 325-340. DOI: 10.1016/S0076-6879(00)23372-7

13. Ershov, P.V., Gnedenko, O.V., Molnar, A.A., Lisitsa, A.V., Ivanov, A.S., Archakov, A.I. (2012) Kinetic and thermodynamic analysis of dimerization inhibitors binding to HIV protease monomers by surface plasmon resonance. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 6(1), 94-97. DOI: 10.1134/S1990750812010039
14. Trosken, E.R., Straube, E., Lutz, W.K., Volkel, W., Pattenm C. (2004) Quantitation of lanosterol and its major metabolite FF-MAS in an inhibition assay of CYP51 by azoles with atmospheric pressure photoionization based LC-MS/MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15, 1216-1221. DOI: 10.1016/j.jasms.2004.04.036
15. Lepesheva G.I., Waterman M.R. (2007) Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 1770, 467-477. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.07.018
16. Lepesheva, G.I., Friggeri, L., Waterman, M.R. (2018) CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. *Parasitology*, 12, 1-17. DOI: 10.1017/S0031182018000562
17. Gilli, P., Gilli, G., Borea, P.A., Varani, K., Scatturin, A., Dalpiaz, A. (2005) Binding thermodynamics as a tool to investigate the mechanisms of drug-receptor interactions: thermodynamics of cytoplasmic steroid/nuclear receptors in comparison with membrane receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(6), 2026-2035. DOI: 10.1021/jm040842z

Поступила: 17. 07. 2018.
Принята к публикации: 14. 11. 2018.

APPLICATION OF THE SPR BIOSENSOR IN DRUG PROTOTYPES DISCOVERY WITH HUMAN CYTOCHROME P450(51) AS AN EXAMPLE

L.A. Kaluzhskiy^{1}, P.V. Ershov¹, T.V. Shkel², O.V. Gnedenko¹, N.V. Ivanchina³, N.V. Strushkevich², A.A. Kicha³, I.P. Grabovec², A.A. Gilep², S.A. Usanov², V.A. Stonik³, A.S. Ivanov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: la-kaluzhskiy@yandex.ru

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
5/2 Acad. Kuprevich str., Minsk, 220141 Belarus

³Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences,
159, 100 Let Vladivostoka ave., Vladivostok, 690022 Russia

The development of the integral platform "From Gene to Lead", consolidated computer methods, bioinformatics researches, and experimental approaches, significantly accelerated and optimized base structure search in the field of drug design. The necessity of the experimental verification of hundreds virtual structure hypothesis (results of molecular data base selections or *de novo* construction) requires demands the usage of the high-through out and sensitive methods for validation possible interaction between numerous of selected compounds and particular molecular targets and evaluation of affinity, kinetics and thermodynamics. Surface plasmon resonance (SPR) technology makes it possible to solve all these problems. In this article the methodical aspects of the optical SPR-biosensor usage in the field of drug prototypes selection are described using the human cytochrome P450(51) catalyzing one of the key step of cholesterol biosynthesis as an example.

Key words: surface plasmon resonance (SPR); screening; human cytochrome P450(51); drug prototypes

ACKNOWLEDGMENTS

This study were performed within the framework of Program of Basic Scientific Research of Russian National Science Academies for 2013-2020 years (0518-2018-003) using the equipment of "Human Proteome" Core Facility of the Institute of Biomedical Chemistry which is supported by The Ministry of Education and Science of the Russian Federation under agreements №14.621.21.0017 (project ID RFMEFI62117X0017). Protein expression, spectrophotometric titration and enzyme assay were performed within the framework of the Belarusian State Program "High technologies and equipment" for 2016-2020 years (sub-program 1, "Innovative Biotechnologies – 2020").