

Конформационные изменения ВИЧ-1 протеазы в области «флэпов»: изучение методом молекулярной динамики в пико- и наносекундном временных интервалах

Д. Б. Ковальский, А. И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

E-mail: kornelyuk@imbg.org.ua

Изучена молекулярная динамика (МД) ВИЧ-1 протеазы в воде и вакууме в пико- и наносекундном временных интервалах. Получены конформации, обеспечивающие расстояние между двумя антипараллельными β -стрэндами («флэпами»), необходимое для вхождения субстрата в активный центр. Использование различных параметров для учета дальних электростатических взаимодействий при симуляции МД в воде свидетельствует о значительном их вкладе в стабилизацию пространственной структуры протеазы. Как в пико-, так и в наносекундном временных интервалах наблюдается формирование «динамического» кармана с объемом $\sim 0,85$ нм³. Карман образован, в основном, гидрофобными остатками аминокислот: Val32, Lys45, Ile47, Gly48, Gly49, Ile50, Gly51, Gly52, Ile54, Val56, Leu76, Gly78, Pro79, Thr80 и Pro81. «Динамический» структурный карман может являться мишенью при создании ингибиторов ВИЧ-1 протеазы нового поколения.

Введение. Аспартиловая протеаза, кодируемая ВИЧ (ВИЧ-1 протеаза), расщепляет полипротеины *gag* и *gag-pol* на восемь структурных белков [1]. Выяснение пространственной структуры ВИЧ-1 протеазы [2—4] (рис. 1), а также того факта, что при неполном процессинге этих предшественников (*gag* и *gag-pol*) происходит образование неактивных вирионов [5, 6], явилось толчком в поиске синтетических ингибиторов указанной протеазы [7, 8]. На данный момент в терапии СПИДа используют шесть ингибиторов ВИЧ-1 протеазы: саквинавир [9—11] («Roche», ФРГ), индинавир [12—13] («Merck», ФРГ), ритонавир [14] и лопинавир [15] («Abbott», США), ампренавир [16, 17] (фирмы «Vertex/Glaxo Wellcome», Англия) и нельфинавир [18, 19] (фирмы «Agougon», США). Однако следует отметить, что относительно быстро появляются штаммы вируса, содержащие мутации в структуре ВИЧ-1 протеазы, проявляющие устойчивость к ингибиторам фермента [20]. Эти резистентные проте-

азы имеют уменьшенную способность к связыванию с ингибиторами, но при этом сохраняют энзиматическую активность, достаточную для процессинга вирусных полипротеинов [21, 22]. В связи с этим необходим поиск новых подходов в создании ингибиторов ВИЧ-1 протеиназы с учетом возникающей резистентности.

В трехмерных структурах свободной ВИЧ-1 протеазы, определенных методом рентгеноструктурного анализа, два антипараллельных β -стрэнда, называемых «флэпами», находятся в незакрытом состоянии [2—4]. Такие конформации (полуоткрытые) все же не позволяют полипептиду попасть в активный центр (рис. 2). Данные конформации, хотя и реальны физически, но их роль в функции белка остается неясной. Существует предположение, что их появление может быть обусловлено эффектами кристаллической упаковки [23]. Для процессинга вирусных полипептидов необходимо, чтобы «флэпы» открыли доступ полипептиду к активному центру ВИЧ протеазы и, следовательно, должен существовать механизм открытия «флэ-

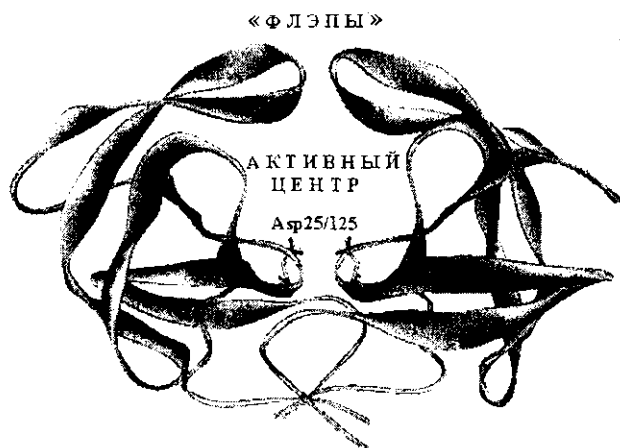


Рис. 1. Пространственная структура ВИЧ-1 протеазы

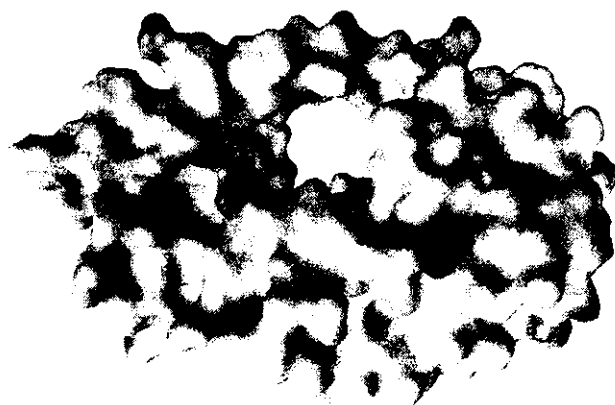


Рис. 2. Поверхность свободной ВИЧ-1 протеазы

пов». Предложенный ранее механизм образования комплекса субстрат/белок состоит из двух этапов: 1) образования слабого комплекса между субстратом и полуоткрытой конформацией белка; 2) перехода комплекса к более тесному взаимодействию при закрытии «флэпов» над активным центром [24]. Изучение с помощью метода ЯМР-спектроскопии конформационных движений белка в субнано- и милли/микросекундном временных интервалах предоставляет общую информацию о подвижности белка [25, 26]. В этих работах показано, что подвижность «флэпов» лежит в миллисекундном временном интервале, а конформации торцов «флэпов» изменяются в интервале 10 нс. Однако из экспериментальных данных нельзя получить четкой информации об изменениях атомных координат «флэпов» при их связывании с субстратом/ингибитором. Таким образом, информация о конформационных изменениях важна не только для понимания механизма связывания и узнавания субстратов, но и для выяснения, почему мутации вокруг активного центра вызывают резистентность к ингибиторам.

В данной работе для изучения динамики «флэпов» и динамических характеристик карманов связывания субстратов/ингибиторов проведено изучение динамики ВИЧ-1 протеазы в вакууме и воде в разных временных (пико- и наносекундных) интервалах методом молекулярной динамики (МД).

Материалы и методы. Первую симуляцию осуществляли при помощи программы NupcrChem 6 (trial) [27] с использованием силового поля OPLS [28]. Все симуляции выполнены в вакууме. Временной интервал составлял 10–100 пс. Вначале энергию исходной структуры гомодимера протеазы [29] (имя в базе данных 1hhp [30]) минимизиро-

вали, применяя алгоритм «сопряженного градиента» (conjugate gradient), до среднеквадратичного отклонения градиента $1 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{нм}^{-1}$. Затем для минимизированной структуры осуществляли симуляцию МД с помощью интеграционного алгоритма Верлета [31] в вакууме с шагом, равным 1 фс, при температуре 300 К. Данные записывали каждые 10 шагов симуляции. Проведены симуляции продолжительностью 10, 25, 50 и 100 пс.

Для симуляции динамики ВИЧ-1 протеазы в воде применена программа GROMACS 3.0 [32, 33]. Первая симуляция в воде (модель CPS) выполнена с использованием параметров, определенных по дефолту (файл demo), с небольшими изменениями, перечисленными ниже. Радиус отсечки составлял 1 нм. В качестве исходной использовали также структуру ВИЧ-1 протеазы (файл 1hhp), помещенную в прямоугольный бокс с водой (~6500 молекул воды) с условиями периодической границы. Энергию минимизировали с помощью алгоритма «сопряженного градиента», который переключался на 1 шаг алгоритмом «крутого спуска» (steepest descent) через каждые 10 шагов (среднеквадратичное отклонение градиента $< 100 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{нм}^{-1}$). Затем следовала симуляция динамики с позиционной привязкой в течение 10 пс, при этом начальные скорости генерировали из Максвелловского распределения. Полноценную симуляцию МД проводили в течение 5 нс. Во всех симуляциях использовали алгоритм SHAKE [34] для того, чтобы держать длины связей жесткими. Отсечку (cut-off) электростатических и Ван-де-Ваальсовых взаимодействий устанавливали на расстоянии 1 нм. Температуру и давление поддерживали постоянными (300 К и 1 атм соответственно) с помощью метода слабого соединения, предложенного Берендсенем [35].

Во второй симуляции в воде молекулу ВИЧ-1 протеазы помещали в усеченный октаэдр с водой. Расстояние от протеазы до стенки октаэдра составляло 0,5 нм, также применяли условие периодической границы. Для минимизации энергии применен алгоритм «крутого спуска» (steepest descent) — 1000 шагов. После этого осуществляли симуляцию динамики (500 пс) молекул растворителя с гармоничной привязкой позиций атомов протеазы к ее рентгеноструктурным координатам. Скорости генерировали из Максвелловского распределения. Данные записывали каждую 1 пс, полная симуляция выполнена в течение 5 нс. Для учета дальних электростатических взаимодействий использовали обобщенное реакционное силовое поле (generalized reaction force field) [36]. Для невалентных взаимодействий установлен двойной попарный список 0,8 и 1,4 нм, обновляемый каждые 10 фс. Температуру и давление поддерживали такими же, как в предыдущей симуляции.

Вычисления с использованием программы GROMACS проводили на базе кластера компьютеров Targa, Violet, Green (TVG), работающего в операционной системе Linux RedHat 7.1, созданного в нашей лаборатории. Violet и Green используют процессоры архитектуры AMD (Athlon, 850 МГц), а Targa работает на базе процессора Intel (Pentium 3, 600 МГц).

Результаты и обсуждение. Ранее дизайн ингибиторов ВИЧ-1 протеазы, мишени, проводили только для закрытой конформации белка [3–14]. При этом не учитывали внутримолекулярной динамики белка.

В экспериментальной работе [26] с помощью метода ЯМР показано, что остатки 48–55 свободной ВИЧ-1 протеазы совершают значительные движения в 100 мкс временном диапазоне. Аминокислотные остатки, образующие торцы «флэпов» (Gly49, Ile50, Gly51, Gly52), меняют конформацию во временном диапазоне 10 нс [26]. Высокая подвижность торцевых аминокислот также подтверждается структурой кристалла протеазы из вируса иммунодефицита обезьяны (ВИО). У этой протеазы координаты 3D остатков 48–52 не определены из-за неупорядоченности этих аминокислот в структуре кристалла [37]. Ранее проведенные симуляции в воде и в кристаллическом окружении [38] не дают информации о механизме открытия «флэпов», а механизм, представленный в работе [39], не вполне соответствует экспериментальным данным. В этой связи мы выполнили несколько симуляций МД в различных условиях с тем, чтобы показать возможный конформационный переход из нативного полуоткрытого состояния в полностью

открытое, а также возможное формирование «динамических» карманов связывания.

Симуляции в вакууме показали высокую подвижность «флэпов». Коллективное движение атомов, образующих «флэпы», становится существенным во временном интервале 5 пс и продолжается в течение всей симуляции. Тенденции к открытию «флэпов» проявляются на 15-й пс, причем отличным от описанного ранее [39] способом, а именно — через разрушение вторичной структуры «флэпов» (рис. 3). Стабилизацию кристаллической структуры в полуоткрытом состоянии свободной протеазы можно объяснить формированием маленькой расщелины между бензольным кольцом Phe53 и Gly49, в которую встраивается боковой радикал Ile50 противоположного мономера и наоборот. О разрушении вторичной структуры при конформационном переходе из полуоткрытого состояния в закрытое упоминалось ранее в работе [40]. Разрушением вторичной структуры объясняются большие значения N^{15} R (разница между скоростями поперечного обмена), экспериментально наблюдаемые для «флэповых» амидных азотов Gly49, Gly51, Gly52 и Ile54 в работе [26]. Полученные нами траектории и конформации также позволяют объяснить тот факт, что, кроме Ile50, еще и метильные группы Ile54 имеют большую подвижность в субнаносекундном временном интервале у свободной протеазы [41]. Это происходит вследствие того, что при движении в воде боковая цепь Ile50 остается частично экспонированной, а боковая цепь Ile54 становится доступной растворителю и соответственно приобретает определенную степень свободы. Объясняется это следующим образом: из-за шарнирного вращения «флэпа» на Ile46 и Ile54 остатках («флэповый» шарнир) Ile46 погружается в гидрофобное окружение 76, 32 и 84 остатков, а Ile54, наоборот, частично выходит на поверхность белка.

В ходе симуляции в вакууме наблюдается формирование «динамического» кармана (рис. 4), представляющего собой полость, углубление, образуемое аминокислотными остатками интерфейса активного центра в комплексах с ингибиторами. Остатки, формирующие такой «динамический» карман, таковы: Val32, Lys45, Ile47, Gly48, Gly49, Ile50, Gly51, Gly52, Ile54, Val56, Leu76, Gly78, Pro79, Thr80 и Pro81. Как видно из этого состава, подавляющее большинство аминокислот имеют гидрофобный характер и принадлежат к области «флэпов». Практически все мутации, которые могут иметь место для данных остатков (при сохранении энзиматической активности), носят гидрофобный характер [42]. Вторая основная составляющая



Рис. 3. Суперпозиция конформаций одного из мономеров ВИЧ-1 протеазы, полученных с помощью молекулярной динамики

этого кармана — так называемая 80-петля протеазы, куда входят остатки 76, 79—81. Остатки Val82 и Ile84 специально не учитываются, поскольку они чаще всего мутируют с образованием резистентных форм ВИЧ-1 протеазы (на рис. 4 они приведены для того, чтобы показать их расположение на краю «динамического» кармана). Следует отметить, что движения кармана в вакууме имеют сильно экспонированный характер, т. е. после образования «динамического» кармана примерно на 20-й пс, происходит вращение шарнира Ile46 и Ile54: при этом карман открывается наружу, увеличивая гидрофобную поверхность. Это явление можно объяснить отсутствием молекул растворителя в системе.

Симуляция МД ВИЧ-1 протеазы в воде с использованием программы GROMACS показала такое же формирование «динамического» кармана и вращение «флэпового» шарнира, как и симуляция МД в вакууме. В симуляции с параметрами, выставленными по умолчанию в GROMACS, «флэпы» ВИЧ-1 протеазы в течение первых 2 нс переместились в полость активного центра, экранируя при этом много гидрофобных остатков, однако они не свернулись с образованием «динамических» карманов. Взаимодействие между «флэпами» не прерывается в ходе симуляции. Такая ситуация наблюдалась все 5 нс, в течение которых проходила симуляция. Мы интерпретировали эти данные таким

образом, что без должного учета дальних электростатических потенциалов (т. е. если не учитывать электростатических взаимодействий за пределами сферы радиусов отсечек) вклад невалентных взаимодействий в силовое поле, в котором движется белок, может привести к нереальным конформациям. В данной конфигурации гидрофобный активный центр практически полностью экранирован от воды и соответствует одному из локальных энергетических минимумов.

С помощью второй симуляции в воде с учетом дальних электростатических взаимодействий показано, что «флэпы» остаются высокоподвижными структурами и в воде. В течение первых 50 пс четко наблюдаются разрушение структуры торца β -шпильки и быстрые конформационные изменения торцов «флэпов» (Gly49, Ile50, Gly51 и Gly52), в то время как остальная часть «флэпа» не отклоняется значительно от кристаллической структуры. Эти конформации соответствуют таковым, полученным в работе [37]. К концу 10-й нс появляется тенденция к сворачиванию «флэпов» внутрь себя. В такой ситуации торцевые Ile50/Ile50B стремятся экранировать свои гидрофобные боковые группы в гидрофобном кармане связывания. При этом Ile47, Ile54 и Val56 уменьшают площадь взаимодействия с водой. К концу 2-й нс «динамические» карманы являются полностью сформированными (рис. 5). Точно так же, как в случае симуляций в вакууме,

K45
I47
G48
G49
I50
G51
G52
I54
V56
D30
T31
V32
L76
G78
P79
T80
P81
V82
I84

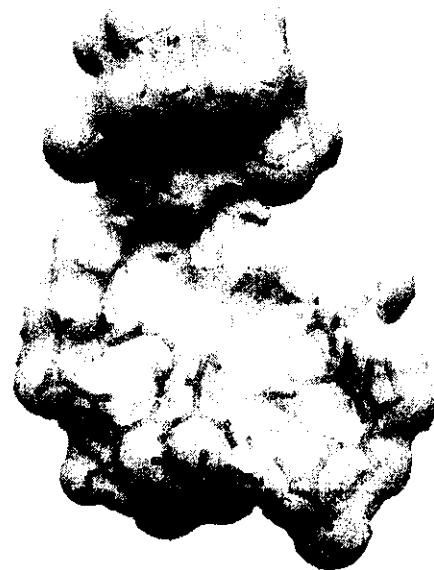


Рис. 4. Поверхность «динамического» кармана и образующие его аминокислотные остатки

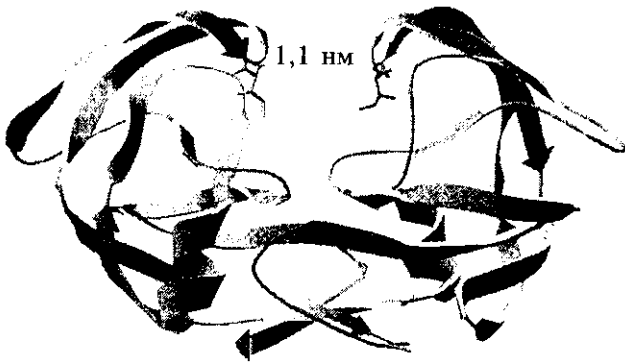


Рис. 5. Открытая конформация ВИЧ-1 протеазы. Расстояние между C α атомами Pe50/50B составляет 1,1 нм

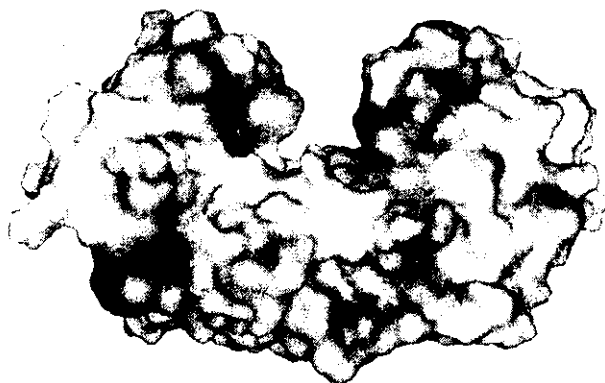


Рис. 6. Поверхность ВИЧ-1 протеазы после 3 нс симуляции молекулярной динамики в воде с учетом дальних электростатических взаимодействий

Pe47 смещается к Pe76 и Val32, образуя при этом плотную гидрофобную упаковку. Val56 становится более экранированным в растворителе, а Pe50, пытаясь экранировать свою боковую цепь, стремится вглубь «динамического» кармана, формируя тем самым верхнюю его стенку. Подобные конформационные изменения приводят к такой структуре ВИЧ-1 протеазы, у которой расстояние между «флэпами» становится достаточным для вхождения субстрата в активный центр (рис. 6). В данной симуляции МД карманы более свернуты (экранируя большую гидрофобную площадь), что естественно в условиях явного присутствия растворителя и более корректного учета электростатических взаимодействий. До конца симуляции «динамический» карман остается пространственно определенным и структурно выраженным, хотя и проявляет высокую гибкость. Суммарные движения можно четко разделить на процесс открытия—закрытия «флэпов», движения «флэповой» части кармана парал-

лельно плоскости димеризационного интерфейса (на «флэповом» шарнире), а также гибкие движения торцов «флэпов».

Таким образом, в данной работе нами показано возможное формирование дополнительного «динамического» кармана связывания субстратов в активном центре ВИЧ-1 протеазы.

Показано также открытие «флэпов», закрывающих активный центр протеазы. «Динамический» карман формируется в течение 2 нс и является стабильным в 5 нс временном диапазоне.

Структура дополнительного кармана ВИЧ-1 протеазы может служить основой для дизайна новых ингибиторов ВИЧ-1 протеазы, «заполняющих» данный карман и блокирующих направленные конформационные движения протеазы, сопровождающие протеолитический процессинг полипротеинов.

На наш взгляд, создание ингибиторов «динамического» кармана может быть примером учета динамики ВИЧ-1 протеазы. Существенно то, что большинство аминокислотных остатков, формирующих «динамический» карман, при мутациях с образованием резистентных форм становятся, как правило, гидрофобными.

D. B. Kovalsky, A. I. Kornelyuk

Conformational changes in HIV-1 protease: molecular dynamic simulation study in picosecond and nanosecond timescales

Summary

HIV-1 protease is one of the most important drug design targets in AIDS therapy. A two β -strands covering active site play central role in its function. To permit substrate entrance into active site they must open. Despite great knowledge of HIV-1 protease structure a flap opening mechanism is still unclear. Here we perform molecular dynamic simulation of HIV-1 protease in vacuum and in solution, in picosecond and nanosecond timescales. Structural «dynamic» binding pocket formation is observed like as in vacuum simulation as in solution. The most part of residues forming the binding pocket are hydrophobic. These residues are: Val32, Lys45, Ile47, Gly48, Gly49, Ile50, Gly51, Gly52, Ile54, Val56, Leu76, Gly78, Pro79, Thr80, Pro81. In spite of great its flexibility it remains well-defined during the simulation. We assume that the pocket could be used in drug design.

Д. Б. Ковальський, А. І. Корнелюк

Конформаційні зміни в структурі ВІЛ-1 протеази: дослідження методом молекулярної динаміки в піко- та наносекундному часових проміжках

Резюме

ВІЛ-1 протеаза є однією з найпривабливіших моделей для дизайну лікарських засобів у терапії СНІДу. Для потрапляння субстрату до активного центра протеази необхідно, щоб дві β -ципильки («флэпи»), які його покривають, відкрилися на достатню для цього відстань. Саме тому «флэпи» відіграють ключову роль у функціонуванні ВІЛ-1 протеази. Незважаючи на

грунтовні знання структури цього ферменту, до теперішнього часу немає даних стосовно механізму відкриття «флепів». Саме тому здійснено симуляцію молекулярної динаміки ВІЛ-1 протеази у вакуумі та водному розчині в піко- та наносекундному часових проміжках. Спостерігалось фомування структурного «динамічного» сайту зв'язування як у нс-так і в пс-часових проміжках. «Динамічний» карман утворюється, в основному, з гідрофобних амінокислотних залишків, а саме: Val32, Lys45, Ile47, Gly48, Gly49, Ile50, Gly51, Gly52, Ile54, Val56, Leu76, Gly78, Pro79, Thr80, Pro81. Він залишається добре визначеним впродовж усього періоду симуляції. Пропонується використання цього карману для дизайну лікарських засобів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Robins T., Plattner J. HIV protease inhibitors: their anti-HIV activity and potential role in treatment // *J. Acquired Immune Defic. Syndr.*—1993.—6.—P. 162—170.
- Navia M. A., Fitzgerald P. M., McKeever B. M., Leu C. T., Heimbach J. C., Herber W. K., Sigal I. S., Darke P. L., Springer J. P. Three-dimensional structure of asparagil protease from HIV-1 // *Nature.*—1989.—337.—P. 615—620.
- Wlodawer A., Miller M., Jaskolski M., Sathyanarayana B. K., Baldwin E., Weber I. T., Selk L. M., Clawson L., Schneider J., Kent S. B. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of synthetic HIV-1 protease // *Science.*—1988.—245.—P. 616—621.
- Lapatto R., Blundell T., Hemmings A., Overington J., Wilderspin A., Wood S., Merson J. R., Whittle P. J., Danley D. E., Geoghegan K. F. X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes // *Nature.*—1989.—342, N 6247.—P. 299—302.
- Kohl N. E., Emini E. A., Schleif W. A., Davis L. J., Heimbach J. C., Dixon R. A. F., Scolnick E. M., Sigal I. S. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.*—1988.—85D.—P. 4686—4690.
- Peng C., Ho B. K., Chang T. W., Chang N. T. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity // *J. Virol.*—1989.—63.—P. 2550—2556.
- Wlodawer A., Erickson J. W. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease // *Annu. Rev. Biochem.*—1993.—62.—P. 543—585.
- De Lucca G., Erickson-Viltanen S., Lam P. Y. S. Cyclic HIV protease inhibitors capable of displacing the active site structural water molecule // *Drug Discovery Today.*—1997.—2.—P. 6—18.
- Roberts N. A., Martin J. A., Kinchington D., Brouadhurst A. V., Craig J. C., Duncan I. B., Galpin S. A., Handa B. K., Kay J., Krohn A., Lambert R. W., Merrett J. H., Mills J. S., Parkes K. E. B., Redshaw S., Ritchie A. J., Taylor D. L., Thomas G. J., Machin P. J. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors // *Science.*—1990.—248.—P. 358—361.
- Craig J. C., Duncan I. B., Hockley D., Grief C., Roberts N. A., Mills J. S. Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase // *Antiviral Res.*—1991.—16, N 4.—P. 295—305.
- Krohn A., Redshaw S., Ritchie J. C., Graves B. J., Hatada M. H. Novel binding mode of highly potent HIV-proteinase inhibitors incorporating the (R)-hydroxyethylamine isostere // *J. Med. Chem.*—1991.—34.—P. 3340—3342.
- Dorsey B. D., Levin R. B., McDaniel S. L., Vacca J. P., Guare J. P., Darke P. L., Zugay J. A., Emini E. A., Schleif P. S., Huff J. R. L-735, 524: the design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor // *J. Med. Chem.*—1994.—37.—P. 3443—3451.
- Chen Z., Li Y., Chen E., Hall D. L., Darke P. L., Culbertson C., Shafer J. A., Kuo L. C. Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735, 524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases // *J. Biol. Chem.*—1994.—269.—P. 26344—26348.
- Kempf D. J., Marsh K. C., Denissen J. F., McDonald E. M., Vasavanodna S., Flentge C. A., Green B. E., Fino L., Park C. H., Kong X. P., Wideburg N. E., Saldivar A., Ruiz L., Kati W. M., Sham H. L., Robins T., Stewart K. D., Shu A., Plattner J. J., Leonard J. M., Norbeck D. W. ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92.—P. 2484—2488.
- Sham H. L., Kempf D. J., Molla A., Marsh K. C., Kumar G. N., Chen C. M., Kati W., Stewart K., Lal R., Hsu A., Betebenner D., Korneyeva M., Vasavanonda S., McDonald E., Saldivar A., Wideburg N., Chen X., Niu P., Park C., Jayanti V., Grabowski B., Granneman G. R., Sun E., Japour A. J., Norbeck D. W. ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease // *Antimicrob. Agents Chemother.*—1998.—42, N 12.—P. 3218—3224.
- Navia M. A., Sato V. L., Tung R. D. Design of VX-478, a potent inhibitor of HIV protease // *Int. Antiviral News.*—1995.—3, N 9.—P. 143—145.
- Kim E. E., Baker C. T., Dwyer M. D., Murcko M. A., Rao B. G., Tung R. D., Navia M. A. Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable of the enzyme // *J. Amer. Chem. Soc.*—1995.—117, N 3.—P. 1181—1182.
- Kaldor S. W., Kalish V. J., Davies J. F., Shetty B. V., Fritz J. E., Appelt K., Burgess J. A., Campanale K. M., Chirgadze N. Y., Clawson D. K., Dressman B. A., Hatch S. D., Khalil D. A., Kosa M. B., Lubbehusen P. P., Muesing M. A., Patick A. K., Reich S. H., Su K. S., Tatlock J. H. Viracept (Nelfinavir mesylate, AG1343): a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease // *J. Med. Chem.*—1997.—40.—P. 3979—3985.
- Kalish V., Kaldor S., Shetty B., Tatlock J., Davies J., Hammond M., Dressman B., Fritz J., Appelt K., Reich S., Musick L., Wu B., Su K. Iterative protein structure-based drug design and synthesis of HIV protease inhibitors // *Eur. J. Med. Chem.*—1995.—30.—P. 201—214.
- Condra J. H. Resistance to HIV protease inhibitors // *Haemophilia.*—1998.—4.—P. 610—615.
- Ridsky T., Leis J. Development of drug resistance to HIV-1 protease inhibitors // *J. Biol. Chem.*—1995.—270.—P. 29621—29623.
- Condra J. H., Schleif W. A., Blahy O. M., Gabryelski L. J., Graham D. J., Quintero J. C., Rhodes A., Robbins H. L., Roth E., Shivaprakash M. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors // *Nature.*—1995.—374.—P. 569—571.
- Lange-Savage G., Berchtold H., Liesum A., Budt K. H., Peyman A., Knolle J., Sedlacek J., Fabry M., Hilgenfeld R. Structure of HOE/BAY 793 complexed to human immunodeficiency virus (HIV-1) protease in two different crystal forms-structure/function relationship and influence of crystal packing // *Eur. J. Biochem.*—1997.—248.—P. 313—322.
- Furfine E. S., D'Souza E., Ingold K. J., Leban J. J., Spector T., Porter D. J. T. Two-step binding mechanism for HIV protease inhibitors // *Biochemistry.*—1992.—31.—P. 7886—7891.
- Ishima R., Torchia D. Using amide 1H and 15N transverse

- relaxation to detect millisecond time-scale motions in perdeuterated proteins: application to HIV-1 protease // *J. Amer. Chem. Soc.*—1998.—120.—P. 10534—10542.
26. *Ishima R., Freedberg D. I., Wang Y. X., Louis J. M., Torchia D. A.* Flap opening and dimer-interface flexibility in the free and inhibitor-bound HIV protease, and their implications for function // *Struct. Fold Des.*—1999.—7, N 9.—P. 1047—1055.
 27. *Froimowitz M.* HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling // *Biotechniques.*—1993.—14, N 6.—P. 1010—1013.
 28. *Jorgensen W. L., Tirado-Rives J.* The OPLS potential functions for proteins. Energy minimization for crystals of cyclic peptides and crambin // *J. Amer. Chem. Soc.*—1988.—110, N 13.—P. 1657—1662.
 29. *Spinelli S., Liu Q. Z., Alzari P. M., Hirel P. H., Poljak R. J.* The three-dimensional structure of the aspartyl protease from the HIV-1 isolate BRU // *Biochimie.*—1991.—73.—P. 1391—1396.
 30. *Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J., Meyer E. E., Jr., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M.* The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures // *J. Mol. Biol.*—1977.—80.—P. 535—542.
 31. *Van Gunsteren W. F., Berendsen H. J. C.* Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics // *Mol. Phys.*—1977.—34.—P. 1311—1327.
 32. *Lindahl E., Hess B., van der Spoel D.* GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis // *J. Mol. Model.*—2001.—7.—P. 306—317.
 33. *Berendsen H. J. C., van der Spoel D., van Drunen R.* GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation // *Comp. Phys. Commun.*—1995.—91.—P. 43—56.
 34. *Ryckaert J. P., Ciccotti G., Berendsen H. J. C.* Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints; Molecular dynamics of n-alkanes // *J. Comp. Phys.*—1977.—23.—P. 327—341.
 35. *Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., DiNola S., Haak J. R.* Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.*—1984.—81.—P. 3684—3690.
 36. *Tironi I. G., Sperb R., Smith P. E., van Gunsteren W. F.* Generalized reaction field method for molecular dynamics simulations // *J. Chem. Phys.*—1995.—102.—P. 5451—5459.
 37. *Rose R. B., Craik C. S., Stroud R. M.* Domain flexibility in retroviral proteases: structural implications for drug resistant mutations // *Biochemistry.*—1998.—37.—P. 2607—2612.
 38. *York D. M., Darden T. A., Pedersen L. G., Anderson M. W.* Molecular dynamics simulation of HIV-1 protease in a crystalline environment and in solution // *Biochemistry.*—1993.—32.—P. 1443—1453.
 39. *Collins J. R., Burt S. K., Erickson J. W.* Flap opening in HIV-1 protease simulated by activated molecular dynamics // *Adv. Exp. Med. Biol.*—1995.—362.—P. 455—460.
 40. *Rick S. W., Erickson J. W., Burt S. T.* Reaction path and free energy calculations of the transition between alternative conformations of HIV-1 protease // *Proteins.*—1998.—32.—P. 7—16.
 41. *Ishima R., Freedberg D. I., Wang Y. X., Louis J. M., Torchia D. A.* Characterization of two hydrophobic methyl clusters in HIV-1 protease by NMR spin relaxation in solution // *J. Mol. Biol.*—2001.—305.—P. 515—521.
 42. *Shao W., Everitt L., Manchester M., Loeb D. D., Hutchison C. A. III, Swanstrom R.* Sequence requirements of the HIV-1 protease flap region determined by saturation mutagenesis and kinetic analysis of flap mutants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 2243—2248.

УДК 577.322

Надійшла до редакції 28.02.02