

УДК 541.69:541.572+615.781.6

© Коллектив авторов

ПОДХОД К ОТБОРУ ВЕЩЕСТВ С ЗАДАНЫМИ МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

А.А. Погребной¹, В.Е. Рябинин¹, Е.В. Барташевич², М.А. Гришина², В.А. Потемкин²

¹Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск
454092, ул. Воровского, 64; тел.:(3512) 34-02-33, эл. почта: alpha@vita.chel.su

²Челябинский государственный университет, г. Челябинск

Предложен подход, позволяющий осуществлять предварительный отбор веществ, обладающих заданными метаболическими свойствами. Подход основан на классификации веществ с использованием 3D-QSAR алгоритма BiS. В зависимости от потребностей пользователя может проводиться отбор веществ, как способных, так и неспособных являться субстратами отдельных изоформ цитохрома P450. Подобный отбор веществ может быть необходим для поиска перспективных лекарственных препаратов, обладающих в дополнение к основному фармакологическому эффекту заданными метаболическими свойствами.

Ключевые слова: P450, субстрат, отбор, 3D-QSAR, прогностическая модель.

ВВЕДЕНИЕ. Ферментные системы, содержащие в качестве терминального компонента цитохром P450, известны своим участием в окислительном метаболизме большого числа веществ эндогенного и экзогенного происхождения. В результате метаболизма могут образовываться вещества, характеризующиеся иной степенью биологической активности, а также иной скоростью выведения из организма. Вещества, попадающие в организм одновременно, могут влиять на интенсивность метаболизма друг друга путём, например, конкурентного ингибирования, или активации отдельных изоформ цитохрома P450. Одними из важных экзогенных субстратов цитохрома P450 являются лекарственные вещества, и метаболизм с участием цитохрома P450 играет важную роль во взаимодействии совместно применяемых лекарств между собой, либо во взаимодействии лекарственных веществ с другими ксенобиотиками.

В силу изложенных причин важно учитывать роль цитохрома P450 в метаболизме лекарственных веществ при оценке их эффективности и безопасности. Например, при разработке новых лекарственных средств может возникнуть необходимость в поиске веществ, которые характеризовались бы не только определённым фармакологическим эффектом, но и обладали заданными метаболическими свойствами относительно отдельных изоформ цитохрома P450. Такими метаболическими свойствами могут быть в зависимости от потребностей пользователя либо способность являться субстратом определённой изоформы цитохрома P450, либо, напротив, неспособность подвергаться метаболизму с участием конкретной изоформы.

Известно, что для поиска веществ с заданным фармакологическим эффектом могут быть применены различные методы компьютерного моделирования. Однако зависимость биологической активности веществ от их структуры обычно имеет весьма сложный характер, и во многих случаях изменения биологической активности, связанные с незначительной модификацией структуры, зачастую не воспроизводятся компьютерными методами [1]. Следовательно, даже наиболее совершенные из подобных методов не могут дать абсолютной гарантии соответствия прогнозируемых результатов экспериментальным. Тем не менее, такие методы могут применяться в качестве дополняющих классический путь создания лекарственных средств, что предполагает использование данных методов для предварительного отбора кандидатов на роль лекарства с последующим экспериментальным уточнением требуемых свойств [2].

Очевидно, что такой же предварительный отбор может быть выполнен и для выявления веществ с заданными метаболическими свойствами относительно отдельных изоформ цитохрома P450.

Компьютерное моделирование субстратной специфичности изоформ цитохрома P450 является достаточно сложной задачей. Сложности моделирования связаны с большим разнообразием химических структур субстратов изоформ цитохрома P450. Поэтому разработка компьютерной модели, способной прогнозировать с высокой точностью все возможные субстраты одной изоформы, может занять достаточно много времени.

С другой стороны, если при разработке лекарственного препарата требуется наличие определённых метаболических свойств вещества, то поиск вещества с такими свойствами может быть выполнен с использованием более простой прогностической модели. Подход к построению такой модели предлагается в настоящей работе.

МЕТОДИКА. Для построения прогностической модели использована выборка субстратов нескольких наиболее распространённых изоформ цитохрома P450 человека. Выборка состоит из 211 соединений и включает в себя субстраты изоформ, приведённых в таблице 1. Значительная часть выборки является субстратами нескольких изоформ одновременно. Субстраты подсемейств 2C и 3A включают в себя все субстраты изоформ, входящих в эти подсемейства.

Таблица 1. Количество субстратов различных изоформ цитохрома P450 в выборке

	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3A	3
	A2	A6	B6	C8	C9	C19	C	D6	E1	A4	5	A
Количество	60	12	10	16	46	26	67	61	42	112	15	125

Трёхмерная структура молекул из выборки субстратов, заданная в виде декартовых координат центров атомов молекул, была предварительно оптимизирована в силовом поле MM+ [3,4] и окончательно в полуэмпирическом квантово-химическом приближении PM3.

Прогностическая модель создавалась в рамках алгоритма BiS (Biological Substrate Search) [5-7], относящегося к классу методов 3D-QSAR. Метод BiS предполагает создание трёхмерной структуры модельного рецептора, состоящего из изолированных псевдоатомов, расположенных определённым образом в пространстве. Такой набор псевдоатомов моделирует фрагмент макромолекулы, с которым может осуществляться взаимодействие молекул рассматриваемых низкомолекулярных веществ. Создание модели осуществляется на основе трёхмерной структуры молекул низкомолекулярных веществ обучающей выборки и величин проявляемой ими биологической активности.

Псевдоатомная модель может быть использована для оценки возможности взаимодействия молекул низкомолекулярных веществ с макромолекулой. Рассчитанная при этом энергия взаимодействия псевдоатомной модели с молекулами веществ позволяет прогнозировать величину биологической активности рассматриваемых низкомолекулярных веществ. Таким образом, при создании прогностической модели субстратной специфичности описанный набор псевдоатомов будет моделировать активный сайт рассматриваемой изоформы цитохрома P450.

В настоящей работе прогностические модели разрабатывались отдельно для каждой рассматриваемой изоформы цитохрома P450. Для создания каждой прогностической модели выборку веществ разбивали на два класса, при этом в класс 1 относили вещества, являющиеся субстратами данной изоформы, а в класс 2 - вещества, не способные подвергаться метаболизму с участием этой изоформы. Разделенная таким образом выборка использовалась в качестве обучающей.

В данном случае метод BiS использован для создания прогностической модели, пригодной для отнесения веществ к одному из описанных классов, то есть для осуществления качественного прогноза субстратной специфичности.

Для решения поставленной задачи классификации величины биологической активности были определены следующим образом. Веществам класса 1, к которому были отнесены соединения, являющиеся субстратами рассматриваемой изоформы, была приписана величина активности, равная 1. Веществам класса 2, к которому были отнесены соединения, не способные подвергаться метаболизму с участием рассматриваемой изоформы, была приписана величина активности, равная 0.

По результатам расчётов с применением полученной модели для всех веществ выборки были вычислены величины предсказанной активности (РА). Рассчитанные величины оказались находящимися в интервале между 0 и 1, а также незначительно меньше 0, либо незначительно больше 1.

Полученные значения предсказанной активности использовались для проведения отбора веществ, относящихся к классу субстратов, либо к классу веществ, неспособных подвергаться метаболизму с участием рассматриваемой изоформы цитохрома P450.

Отбор веществ проводился отдельно для каждого класса. Для проведения отбора выбирали пороговое значение предсказанной активности. Вещества, характеризующиеся величинами предсказанной активности, превышающими пороговое значение для класса 1, относились к классу 1. Вещества, характеризующиеся величинами предсказанной активности, меньшими порогового значения для класса 2, относились к классу 2. При таком подходе к рассматриваемым классам относилась лишь некоторая часть веществ, потенциально способных принадлежать к соответствующим классам. Описанная ситуация иллюстрируется в таблице 2 на примере изоформы цитохрома P450 3A4.

Таблица 2. Пример отбора веществ по величинам предсказанной активности

Вещество	Класс фактически	Предсказанная активность	Прогноз
Sulfamethoxazole	2	-0,0653	Класс 2 по прогнозу
Hexobarbital	2	-0,0183	
Enflurane	2	0,0890	
58C80	2	0,0955	
Пороговое значение предсказанной активности — 0,1			
Perphenazine	2	0,1034	Вещества вне области применимости
Chlortoluron	1	0,1278	
Carteolol	2	0,1398	
Theobromine	2	0,1677	
Linoleic Acid	1	0,8548	Вещества вне области применимости
Pregnenolone	2	0,8630	
Propafenone	1	0,8644	
Finasteride	1	0,8916	
Пороговое значение предсказанной активности — 0,9			
Celecoxib	1	0,9234	Класс 1 по прогнозу
Azelastine	1	0,9842	
Cisapride	1	0,9956	
Zopiclone	1	1,0516	
Pranidipine	1	1,0580	

В настоящей работе изначально не ставилась задача получения прогноза субстратной специфичности для любого произвольно взятого вещества. Также разрабатываемые прогностические модели не предназначались для поиска всех возможных субстратов изоформ цитохрома P450, либо всех веществ, неспособных являться такими субстратами.

Задача настоящей работы состояла в разработке прогностической модели, пригодной для предварительного отбора веществ, специфичных по отношению к определенным изоформам цитохрома P450. При этом предполагается, что дальнейшее уточнение прогнозируемых метаболических свойств может производиться экспериментально, либо с использованием более совершенной прогностической модели. Следовательно, роль разрабатываемой прогностической модели будет состоять в сокращении объема исходной выборки веществ-кандидатов.

В связи с определённой таким образом задачей для характеристики полученной прогностической модели было введено понятие области применимости прогностической модели. Принадлежность прогнозируемых веществ к области применимости определялась по пороговому значению предсказанной активности. В примере, приведённом в таблице 2, к области применимости относятся вещества, характеризующиеся величинами предсказанной активности, большими порогового значения для класса 1, и меньшими порогового значения для класса 2. Остальная часть веществ считается находящейся вне области применимости и получение прогноза субстратной специфичности для этой части веществ считается невозможным.

Качество прогноза при проведении отбора веществ оценивалось с использованием двух количественных показателей, которые вычислялись на основании соответствия фактической и прогнозируемой принадлежности веществ к соответствующим классам. Данные количественные показатели вычислялись отдельно для каждой изоформы цитохрома P450 и для каждого класса.

Одним из количественных показателей прогноза являлось качество распознавания, которое определялось как отношение числа объектов, верно отнесённых к рассматриваемому классу, к общему числу объектов, отнесённых к этому классу.

Другим количественным показателем являлся охват выборки, который определялся как отношение числа объектов, верно отнесённых по прогнозу к рассматриваемому классу, к общему числу объектов, фактически принадлежащих этому классу.

Смысл количественных показателей прогноза иллюстрируется на рисунке 1.



Рисунок 1.

Количественные показатели прогноза субстратной специфичности.

I - область, соответствующая веществам, отнесённым по прогнозу к числу веществ данного класса.

II - область, соответствующая веществам, фактически принадлежащим к числу веществ данного класса.

III - область, соответствующая веществам, отнесённым по прогнозу и фактически принадлежащим к числу веществ данного класса.

С использованием рисунка 1 количественные показатели прогноза могут быть определены следующим образом.

$$Q = \frac{\text{область III}}{\text{область I}}, \quad (1)$$

$$C = \frac{\text{область III}}{\text{область II}}, \quad (2),$$

где Q - качество распознавания, C - охват выборки, области I, II и III определены на рисунке 1. Очевидно, что данные показатели аналогичны понятиям ошибок первого и второго рода в математической статистике.

Качество распознавания имеет большее значение как показатель прогноза, поскольку именно он характеризует то, насколько отобранные вещества будут соответствовать предъявляемым к ним требованиям.

Охват выборки характеризует область применимости прогностической модели и показывает, какая часть из всех потенциально возможных веществ может быть отобрана на основании конкретного прогноза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. С использованием одной и той же прогностической модели может быть выполнено несколько вариантов отбора веществ. При этом количественные показатели прогноза, на основании которого производится отбор, могут изменяться в зависимости от выбора порогового значения предсказанной активности. Обычно направления изменений показателей прогноза являются противоположными, то есть, при увеличении охвата выборки качество распознавания снижается и наоборот.

Пороговое значение предсказанной активности может быть выбрано, например, таким образом, что качество распознавания составит 100%. В настоящей работе такой выбор оказался возможным для всех прогностических моделей, полученных для изоформ цитохрома P450.

В таблице 3 приведены количественные показатели прогноза субстратной специфичности изоформ цитохрома P450 с качеством распознавания, равным 100%. Под объемом исходной выборки в таблице 3 понимается количество объектов, фактически принадлежащих к соответствующим классам веществ.

Результаты, приведённые в таблице 3, показывают, что для всех рассмотренных изоформ цитохрома P450 возможно получение прогноза с качеством распознавания, равным 100%. Однако при прогнозировании субстратов изоформ 1A2, 2A6, 2C19 и веществ, не являющихся субстратами подсемейства 2C, к соответствующим классам по прогнозу было отнесено не более трёх объектов. Такое количество прогнозируемых объектов не позволяет говорить о достоверности полученных в этих случаях количественных показателей прогноза.

Таблица 3. Количественные показатели прогноза субстратной специфичности изоформ цитохрома P450 с качеством распознавания, равным 100%

Изоформа P450	Класс 1			Класс 2		
	Объём исходной выборки	Охват выборки, %	Объём прогнозируемой выборки	Объём исходной выборки	Охват выборки, %	Объём прогнозируемой выборки
1A2	60	5	3	151	11	17
2A6	12	8	1	199	31	62
2B6	10	40	4	201	57	115
2C8	16	44	7	195	34	66
2C9	46	22	10	165	15	25
2C19	26	8	2	185	29	54
2C	67	6	4	144	1	2
2D6	61	18	11	150	37	56
2E1	42	45	19	169	66	112
3A4	112	18	20	99	11	11
3A5	15	33	5	196	35	69
3A	125	26	32	86	19	16

С другой стороны, для ряда изоформ цитохрома P450 количество объектов, верно отнесённых по прогнозу к классу субстратов, оказалось достаточным для вывода о достоверности количественных показателей прогноза. Например, к классу субстратов изоформы 2B6 было верно отнесено по прогнозу 4 объекта. В то же время в рассматриваемый класс по прогнозу не было отнесено ни одного постороннего объекта, о чём говорит качество распознавания, равное 100%. В этом случае вероятность случайного отнесения 4 объектов одновременно к одному из двух классов составит $(1/2)^4 = 0,0625$. Очевидно, что в аналогичных случаях вероятность случайного отнесения по прогнозу большего числа объектов составит ещё меньшую величину.

Таким образом, результаты, полученные для изоформ 2B6, 2C8 и 3A5, позволяют говорить о том, что обучающая выборка, содержащая от 10 до 16 объектов, может быть достаточна для построения прогностической модели, пригодной для определения субстратов изоформ цитохрома P450.

Следует ещё раз отметить, что данные прогностические модели изначально не предназначены для поиска всех возможных субстратов рассматриваемых изоформ. С использованием таких прогностических моделей выделяется лишь некоторая часть всех потенциальных субстратов изоформ. Качество распознавания, равное 100%, свидетельствует в этом случае только о том, что все вещества, отнесённые к числу субстратов по прогнозу, действительно являются субстратами. В то же время прогностическая модель не сможет выделить субстраты изоформы, существенно отличающиеся по своей структуре от веществ обучающей выборки, и такие субстраты окажутся вне области применимости модели.

Разработанный подход к предварительному отбору веществ допускает возможность другого выбора порогового значения предсказанной активности. Изменение порогового значения может позволить в случае необходимости увеличить охват выборки при проведении отбора веществ. При этом произойдет некоторое ухудшение качества распознавания, но поскольку прогностические модели предназначены только для предварительного отбора веществ, то это представляется вполне допустимым.

В таблице 4 приведены количественные показатели прогноза субстратной специфичности изоформ цитохрома P450, полученные при другом выборе порогового значения предсказанной активности. Для каждой прогностической модели выбор порогового значения осуществлялся таким образом, чтобы добиться максимального увеличения охвата выборки при снижении качества распознавания в пределах до 80-90%.

Как видно из результатов, представленных в таблице 4, такой выбор порогового значения предсказанной активности оказался возможным для многих изоформ цитохрома P450.

Таблица 4. Количественные показатели прогноза субстратной специфичности изоформ цитохрома P450 при увеличении охвата выборки

Изоформа P450	Класс 1		Класс 2	
	Качество распознавания, %	Охват выборки, %	Качество распознавания, %	Охват выборки, %
1A2	83	8	92	69
2A6	50	17	95	100
2B6	42	50	97	100
2C8	69	56	96	100
2C9	87	28	98	60
2C19	75	12	90	95
2C	89	24	94	45
2D6	90	31	93	70
2E1	93	64	92	99
3A4	92	41	97	30
3A5	88	47	93	100
3A	93	50	93	29

В то же время при прогнозировании субстратов таких изоформ, как 2A6, 2B6, 2C8 и 2C19 увеличение охвата выборки на один объект приводило к резкому падению качества распознавания. Прогностические модели для этих изоформ были построены с использованием обучающей выборки, содержащей малое количество субстратов. Видимо, именно этим объясняется невозможность расширения охвата выборки при изменении порогового значения предсказанной активности.

При прогнозировании веществ, не являющихся субстратами изоформ цитохрома P450, во всех случаях наблюдалось существенное увеличение охвата выборки при снижении качества распознавания до уровня не ниже 92%.

Описанное расширение охвата выборки проиллюстрировано на рисунках 2 и 3. На рисунке 2 показано расширение охвата выборки при прогнозировании субстратов изоформ цитохрома P450 только для тех изоформ, для которых такое расширение сопровождалось снижением качества распознавания до уровня не ниже 83%. На рисунке 3 показано расширение охвата выборки при прогнозировании веществ, не являющихся субстратами изоформ цитохрома P450.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В настоящей работе предложен подход, позволяющий осуществлять предварительный отбор веществ, обладающих заданными метаболическими свойствами.

Несмотря на то, что прогностические модели не позволяют выявлять все возможные вещества, способные обладать требуемыми метаболическими свойствами, в случае большинства изоформ область применимости, характеризуемая охватом выборки, может быть достаточной для проведения отбора.

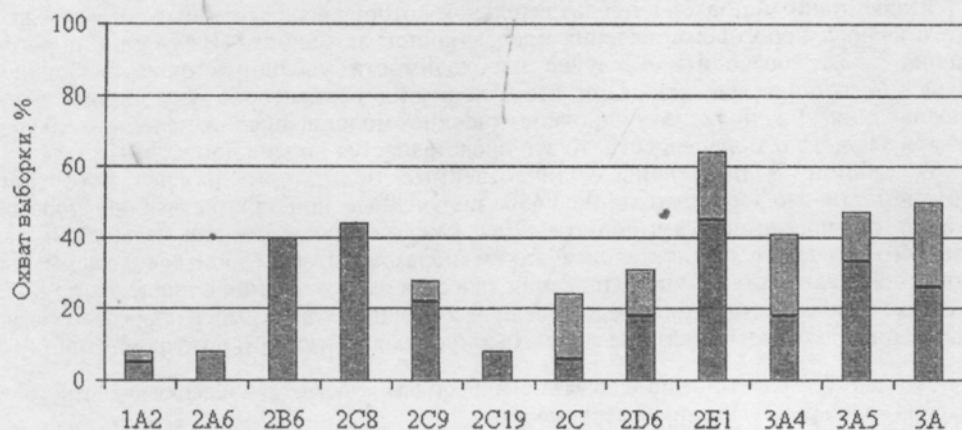


Рисунок 2.

Расширение охвата выборки при прогнозировании субстратов изоформ цитохрома P450

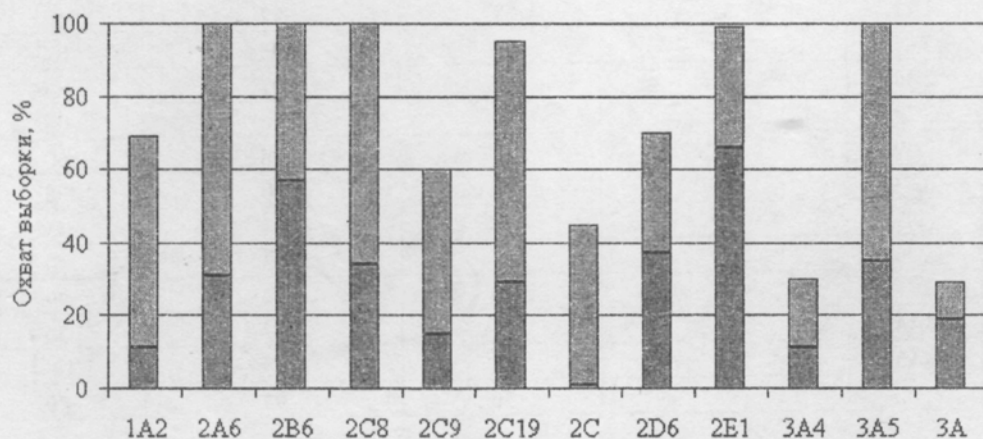


Рисунок 3.

Расширение охвата выборки при прогнозировании веществ, не являющихся субстратами изоформ цитохрома P450

Выявление требуемых веществ с использованием данной модели может оказаться эффективным даже при достаточно низких значениях охвата выборки. Это возможно для тех изоформ, которые могут иметь значительное число потенциальных субстратов.

С другой стороны, как было показано, при изменении порогового значения предсказанной активности оказывается возможным некоторое увеличение охвата выборки, сопровождающееся, однако, снижением качества распознавания. Возможность изменения области применимости прогностических моделей может быть использована для оптимизации процесса отбора веществ с требуемыми свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Челябинской области. Грант № урчел_04-04-96094.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wermuth C.G.* (2000) in: Rational Approaches to Drug Design. Proceedings of the 13th European Symp. on Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR 2000. Heinrich-Heine-Universitat, Dusseldorf, Germany, 27 August - 1 September, 2000, Prous Science Publishers, Barcelona, pp. 3-20.
2. *Иванов А.С., Люлькин Ю.А., Скворцов В.С., Румянцев А.Б.* (1995) Вестник РАМН, №12, 51-56.
3. *Буркерт У., Эллинджер Н.Л.* (1986) Молекулярная механика, Мир, М.
4. *Кларк Т.* (1990) Компьютерная химия. Мир, М.
5. *Potemkin V. A., Bartashevich E. V., Grishina M. A., Guccione S.* (2001) in: Rational Approaches to Drug Design. Proceedings of the 13th European Symp. on Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR 2000 (H.-D. Holtje and W. Sippl eds.) Prous Science Publishers, Barcelona, pp. 349-353.
6. *Grishina M. A., Potemkin V. A., Rusinov G.L., Bartashevich E. V., Guccione S., Perspicace S., Chupakhin O.N.* (2002) in: From Genes to Drugs via Crystallography, 33rd Crystallographic Course at the E. Majorana Centre, Erice, Italy, 23 May - 2 June 2002. Book of Abstracts. Poster Abstracts, p. 48.
7. *Mikuchina K., Potemkin V., Grishina M., Laufer S.* (2002) Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem., **335**(1), C74.

AN APPROACH FOR SELECTION OF SUBSTANCES WITH SPECIFIED METABOLIC PROPERTIES

A.A. Pogrebnoy¹, V.E. Ryabinin¹, E.V. Bartashevich², M.A. Grishina², V.A. Potemkin²

¹Chelyabinsk State Medical Academy, Vorovsky Str., 64, Chelyabinsk, 454092, Russia; e-mail: alpha@vita.chel.su
²Chelyabinsk State University, Br.Kashirinych Str., 129, Chelyabinsk, 454021, Russia

An approach allowing to perform the preliminary selection of substances with specified metabolic properties has been developed. The approach includes classification of substances using 3D-QSAR algorithm BiS. It allows to fulfil the selection of substances being and not being P450 isoforms substrates depending on requirements. The same selection of substances can be required for the search of the drug candidates with specified metabolic properties in addition to the main pharmacological effect.

Keywords: P450, substrate, selection, 3D-QSAR, predicting model.