

УДК 577.152.3
©Коллектив авторов

КОМПЬЮТЕРНЫЕ МЕТОДЫ ПРЕДСКАЗАНИЯ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

*А.В. Веселовский**, *Б.Н. Соболев*, *М.С. Жаркова*, *А.И. Арчаков*

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский
Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, Москва,
ул. Погодинская 10; тел.: 499-245-0768; факс: 499-245-0857;
эл. почта: veselov@ibmh.msk.su

Цитохромы P450 являются важными ферментами участвующими в метаболизме множества лекарств. От состава и активности этих ферментов во многом зависит распределение лекарств в организме, их фармакологический и токсический эффект. Поэтому предсказание судьбы соединений в организме является насущной задачей для разработки новых лекарственных препаратов уже на самых ранних их этапах. Разные изоформы цитохромы P450 могут окислять разнообразные химические соединения, причем их субстратная специфичность не коррелирует с таксономической классификацией данного суперсемейства. В работе рассмотрены основные методы предсказания субстратной специфичности цитохромов P450 *in silico*. Эти методы разделены в зависимости от первичной информации, используемой в анализе: предсказание на основе аминокислотных последовательностей, структур субстратов (фармакофорные, QSAR модели, экспертные системы) и пространственной структуры белка-мишени (метод молекулярного докинга, оценка энергии взаимодействия). Обсуждаются как общие причины сложности прогноза субстратной специфичности цитохромов P450 с использованием компьютерных методов, так и преимущества и ограничения описанных подходов.

Ключевые слова: цитохром P450, компьютерные методы, субстраты, селективность, прогноз.

Последние годы ознаменовались резким увеличением интереса и активности в изучении процесса метаболизма лекарственных препаратов и разработки подходов по предсказанию их метаболизма уже на самых ранних этапах разработки новых лекарств. Основными причинами прекращения разработки новых препаратов являются их безопасность, эффективность и стоимость [1]. Процессы метаболической трансформации лекарств вносят существенный вклад в первые две причины. С одной стороны, при метаболизме лекарства возможно его превращение в токсическое соединение, что может ограничить применение или

* - адресат для переписки

ПРЕДСКАЗАНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

даже заставить прекратить его использование [2]. Одновременный прием двух препаратов, один из которых является ингибитором фермента, разрушающий другое соединение, приведет к увеличению концентрации последнего, что так же может вызвать токсических эффект (drug-drug interaction) [3]. С другой стороны, быстрый метаболизм лекарства в организме может резко снизить его терапевтическую эффективность.

Метаболизм экзогенных соединений обычно принято делить на две фазы [4]. Во время первой фазы происходит модификация структуры молекул с увеличением их гидрофильности, что способствует их выведению из организма. Во второй фазе происходит дальнейшая модификация структуры ферментными системами, такими как глутатион-S-трансфераза, сульфотрансферазы, N-ацетилтрансферазы, уридиндифосфат-гликозилтрансферазы. В первой фазе трансформации экзогенных соединений основное участие принимают окислительные ферментные системы с участием цитохромов P450 [5].

Суперсемейство цитохромов P450 представляет собой гем-содержащие монооксигеназы, выполняющие в организме различные функции. Они распространены во всех организмах - от бактерий до человека. Это семейство характеризуется очень консервативной пространственной укладкой белковой цепи, но при этом представители этого семейства могут иметь низкую гомологию аминокислотных последовательностей. Цитохромы P450 показывают очень широкую субстратную специфичность. С одной стороны они участвуют во множестве метаболических реакция синтеза физиологически активных соединений (антибиотиков, липидов, стероидов), с другой - эти ферменты активно метаболизируют разнообразные ксенобиотики. Ферменты, участвующие в метаболизме ксенобиотиков, показывают широкую субстратную специфичность, тогда как цитохромы P450, задействованные в биосинтетических путях, часто имеют высокую регио- и стереоспецифичность.

Цитохромы катализируют разнообразные окислительные реакции, такие как ароматическое и алифатическое гидроксילирование, N-деалкилирование, N-деметилование, O-деалкилирование, O-деметилование, гидролиз сложноэфирной связи, дегалогенирование и др. [6].

Предсказание субстратной специфичности цитохромов P450 представляет важную задачу при разработке лекарств уже на самых ранних этапах их создания. Это могут быть как этапы поиска новых базовых структур, так и последние этапы оптимизации фармакокинетических и фармакодинамических свойств прообраза лекарств. Кроме предсказания субстратной специфичности цитохромов большое внимание уделяется и предсказанию возможных мест модификации молекул и предсказанию продуктов метаболизма. В настоящее время имеется ряд программ, позволяющих предсказывать взаимодействия лигандов с цитохромами P450, такие как MetaSite [7], СОМРАСТ [8]. Однако точность этих систем остается низкой.

Цитохромы P450, метаболизирующие ксенобиотики, относятся к ферментам с широкой перекрестной субстратной специфичностью, плохо согласующейся с их таксономической классификацией. Однако кроме этого следует отметить ещё ряд обстоятельств, затрудняющих разработку высокоэффективных систем. Во-первых, это отсутствие представительного набора соединений, для которых точно известно, что они не являются субстратами данной изоформы цитохрома (отрицательный контроль). Такая информация обычно не попадает в базы данных, резюме статей. Найти ее можно только по первоисточникам, причем она плохо формализуема, что не позволяет использовать системы автоматического поиска по литературе (text mining). Другой сложностью (неопределенностью) является то, что ряд субстратов цитохрома могут быть известны как его ингибиторы. Это типичная ситуация, особенно для высокоэффективного скрининга (HTS анализов), когда измеряется превращение известного субстрата в присутствии тестируемого соединения, при этом снижение скорости окисления известного субстрата трактуется как ингибирование, хотя возможна ситуация

конкуренции двух субстратов за активный центр. Так, например, в базе данных PubChem BioAssay (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pcassay>), имеется ряд данных по скринингу большого количества соединений на разных изоформах цитохрома P450. Но все они получены с использованием известного субстрата, и оценить какие из протестированных соединений являются ингибиторами, а какие субстратами не представляется возможным. Кроме того, неоднократно отмечалась плохая воспроизводимость результатов HTS анализов. Для ингибиторов многих цитохромов P450 из разных химических классов была показана низкая корреляция между величинами ингибирования, полученных методами HTS, и классическими биохимическими методами определения констант ингибирования [9].

Для предсказания субстратной специфичности используются разнообразные подходы, которые можно разделить в зависимости от первичной информации, используемой в анализе: предсказание на основе первичной структуры белка, на основе структур субстратов и на основе пространственной структуры белка-мишени.

Анализ признаков субстратной специфичности в аминокислотных последовательностях цитохрома p450.

Анализ аминокислотных последовательностей цитохрома P450 – один из основных методов изучения белков этого обширного надсемейства. Результаты парного и множественного выравнивания и последующего филогенетического анализа используются при классификации, трехмерном моделировании и функциональной аннотации белков [10]. Однако разнообразие субстратов, метаболизируемых разными цитохромами, весьма неоднозначно соотносится с их общепринятой классификацией [11], которая построена на гомологии аминокислотных последовательностей. Различия по субстратной специфичности обнаруживаются даже у таких ферментов как 2C9 и 2C19, последовательности которых идентичны на 91% [12]. Последовательности 2A13 и 2A6 сходны на 94%, однако активность этих ферментов в отношении ряда субстратов сильно различается [13].

У разных белков надсемейств цитохромов P450 отмечают большие различия по числу окисляемых субстратов. Группы субстратной специфичности пересекаются между собой и могут не совпадать с таксонами надсемейства. Так, кластеризация белков по сходству химической структуры их субстратов показала определенное соответствие с несколькими семействами P450, в то же время не удалось найти соответствия между обеими классификациями для ряда других семейств [14]. Ферменты надсемейства P450 представляют очень хороший пример того, что функциональная аннотация по гомологии далеко не всегда даёт удовлетворительные результаты [15].

Сайты распознавания субстратов (Substrate Recognition Sites, SRS) для белков семейства CYP2 были определены Gotoh [16] на основе выравнивания их последовательностей с последовательностями бактериальных цитохромов, для одного из которых на тот момент была установлена трехмерная структура. Поскольку степень сходства последовательностей двух групп была весьма незначительна, то был применен оригинальный метод профильного выравнивания “группа с группой”. Для более точного совмещения участков последовательностей привлекались данные по предсказанию вторичной структуры, индексы гидрофобности и т.п. На основе сопоставления с кристаллографическими данными было выделено шесть SRS. Анализ кодирующих нуклеотидных последовательностей выявил повышенную частоту несинонимических замен в участках, соответствующих SRS, что расценивалось как косвенное подтверждение их правильной локализации. Дальнейшие исследования подтвердили важную роль этих участков в определении субстратной специфичности.

Так Lee выявлял участки и позиции, ответственные за субстратную специфичность, определяя менее консервативные участки в выровненных последовательностях близких гомологов второго семейства цитохромов P450

ПРЕДСКАЗАНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

(CYP2). Это позволило выявить все шесть SRS-участков, а также предсказать остатки, определяющие специфичность в семействе CYP2 и в его отдельных подсемействах. Для локализации некоторых остатков найдено экспериментальное подтверждение [17].

Исследовалось также и влияние участков, локализованных вне активного сайта, на распознавание и связывание субстратов. В выровненных последовательностях CYP2 найдено 20 мотивов, замены в которых удалось связать с литературными свидетельствами об изменении ферментативных характеристик [18].

Сравнительный анализ последовательностей P450 позволяет выявить участки и позиции, связанные с субстратной специфичностью ферментов. Однако эти результаты не могут быть использованы непосредственно для выявления тех химических соединений, которые могли бы метаболизироваться данным белком. Это объясняется функциональными различиями, которые найдены даже у очень сходных белков.

Попытка оценить специфичность белков P450 с помощью машинного обучения была проведена с использованием обучающей выборки аминокислотных последовательностей. Они были классифицированы по субстратам соответствующих ферментов, так что классы специфичности сильно пересекались между собой. Использование оценок локального сходства последовательностей в качестве входных данных Байесовского классификатора показало, что оценки точности предсказания групп лигандной специфичности дают большой разброс при небольшом размере этих групп [19], но с увеличением размера группы оценки точности стабилизируются на достаточно высоком уровне (около 80%).

Анализ последовательностей, и прежде всего выравнивание, часто используется в комплексе с трехмерным моделированием [20], направленным мутагенезом [21] и другими методами.

Предсказание селективности на основе структур субстратов.

Эти методы основаны на предположении, что вся основная информация, необходимая для предсказания взаимодействия с белком, заключена в структуре лигандов. Основными методами являются фармакофорные модели, модели взаимосвязи структура-активность, экспертные системы. В ряде работ для предсказания места окисления субстрата использовались квантохимические расчеты [22, 23]. Однако они часто не позволяют получить удовлетворительные результаты, поскольку не учитывают структуру активного центра цитохрома.

Фармакофорная модель представляет собой набор точек в пространстве с определёнными свойствами (гидрофобность, способность образовывать водородные связи, парциальный заряд атома), которые могут определять узнавание и взаимодействие белка и лиганда. Модель строится путем ручного или автоматического наложения друг на друга трёхмерных структур лигандов в разных конформациях и выявления совпадающих в пространстве фармакофорных точек. Полученная таким образом модель позволяет выявлять наиболее важные для связывания лигандов элементы в их структурах.

Для ряда цитохромов P450 (2C9, 2D6, 3A4) были построены фармакофорные модели на основе наборов субстратов и ингибиторов [24-26]. Так для цитохрома 2C9 первоначальная фармакофорная модель субстратов включала только одну фармакофорную точку, анионную группировку, расположенную на расстоянии 7 ангстрем от места гидроксирования [27]. Впоследствии эта модель была уточнена путем включения гидрофобного места между анионным центром и местом гидроксирования [28]. На рисунке представлена структура активного центра цитохрома P450 2C9 в комплексе с флорбипрофеном. Видно, что карбоксильная группа субстрата (анионная фармакофорная группа) и центральное ароматическое кольцо лиганда (гидрофобная фармакофорная точка) взаимодействует с Arg108 и Phe114, соответственно. Т.е. фармакофорные модели могут правильно отражать основные взаимодействия между белком и лигандом.

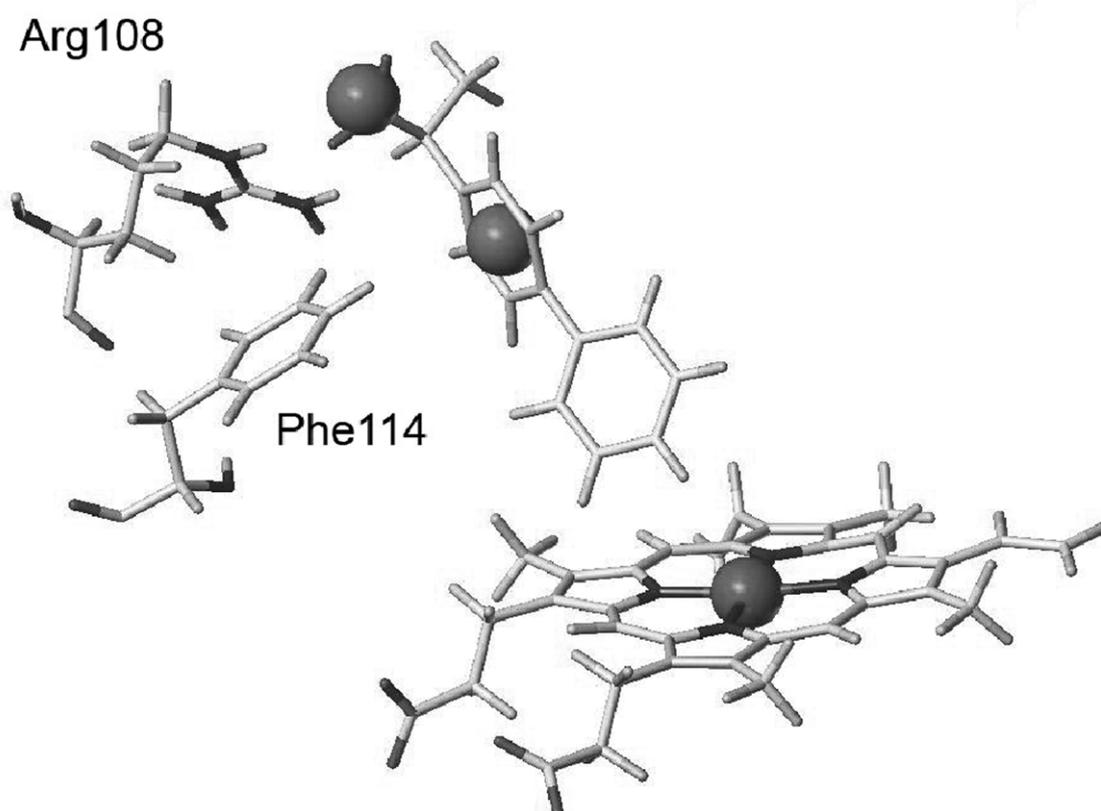


Рисунок.

Сопоставление аминокислотных остатков активного центра цитохрома P450 2C9 с его фармакофорной моделью. Фармакофорные точки отмечены кружками.

Однако необходимо отметить, что в зависимости от набора лигандов, которые используются в анализе, могут получаться различающиеся модели. Так, для того же цитохрома 2C9 известен ряд субстратов, которые не имеют анионную группировку [29]. В результате эти молекулы не будут предсказаны как субстраты данного цитохрома при проведении анализа на основе вышеописанной модели. В то же время использование этих молекул при моделировании приведет к фармакофорной модели без анионной фармакофорной точки. По-видимому, это может быть связано с двумя причинами. С одной стороны, в активном центре может быть два независимых участка для связывания низкомолекулярных соединений. Так, для цитохрома 2C9 была разрешена пространственная структура комплекса с варфарином, который располагается в другом участке активного центра, чем флюрбипрофен. Однако необходимо отметить, что этот участок расположен далеко от каталитического субсайта (расстояние примерно 10 ангстрем от атома железа), и в таком положении варфарин не может быть окислен. С другой стороны, можно предполагать, что в активном центре цитохромов P450 функциональных группировок может быть больше, чем требуется для узнавания субстрата. В этом случае структура молекулы субстрата не обязана содержать полный набор фармакофорных точек.

Фармакофорная модель описывает общие особенности структур лигандов необходимых для их связывания в активном центре, но этого часто бывает недостаточно, и необходимо учитывать такой параметр как размер полости активного центра и, соответственно, размеры лигандов. Этот параметр может быть

ПРЕДСКАЗАНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

задан разными способами: использовать параллельно известную структуру белка или его компьютерную модель (как в случае [26]), задать максимальные размеры лигандов или на основе этих же структур лигандов построить модель псевдоресептора [30].

Таким образом, построенная на основе репрезентативного набора субстратов фармакофорная модель должна отражать основные особенности в структуре лигандов и позволяет обоснованно предполагать какие функциональные группировки в активном центре фермента должны участвовать в связывании. При этом для разных цитохромов фармакофорные модели могут различаться как по набору фармакофорных точек, так и по расстоянию между ними. В этом случае набор таких фармакофорных моделей для разных цитохромов можно использовать для предсказания различий в субстратной специфичности между ними.

Более детальную информацию о структуре активного центра и возможность количественно предсказывать взаимодействие субстрата с ферментом дают QSAR модели. QSAR модели могут отличаться как по способу описания молекул (физико-химические свойства, топологические, пространственные дескрипторы), так и по статистическим методам, используемым при построении модели (множественная регрессия, метод частичных наименьших квадратов, нейронные сети, метод опорных векторов и др.). Различные способы описания молекул и статистические методы были использованы в разных работах построения QSAR моделей субстратов цитохромов P450.

Набор “классических” QSAR моделей для основных цитохромов, участвующих в метаболизме лекарств, были построены Левис с соавт. [31]. Для описания лигандов использовали в основном дескрипторы, описывающие физико-химические свойства, такие как липофильность, растворимость, количество доноров водородных связей, величины HOMO и LUMO, и ряд других. Корреляцию между ними и величинами K_d или K_m строили методом множественной линейной регрессии. Хотя для всех цитохромов были построены статистически значимые модели, они не были проверены на тестовых выборках, так что достоверность моделей осталась не до конца ясной.

В последние годы большой популярностью пользуются 3D-QSAR модели, в которых учитывается пространственное расположение свойств молекул. В методе 3D-QSAR с CoMFA пространственные дескрипторы рассчитываются в узлах решетки, построенной вокруг выравненных молекул, а сами дескрипторы представляют собой энергии взаимодействия тестирующего атома с молекулой лиганда. Поиск корреляций проводится методом частичных наименьших квадратов. 3D-QSAR модели были построены для ряда основных цитохромов P450 человека [32-34]. Они, по-видимому, с достаточной точностью могут предсказывать величины взаимодействия субстратов с белком, но в узком классе химических соединений, близком к обучающему набору. Общая проблема QSAR метода, заключающаяся в плохой предсказательной способности для соединений, близкие аналоги которых не участвовали в построении данной модели, во многом актуальна и для 3D-QSAR методов.

В последние годы появились работы, в которых авторы для предсказания специфичности цитохромов используют нелинейные модели [35-38]. Так, используя метод опорных векторов (PM-CSVM и PP-CSVM), была разработана система для предсказания субстратов цитохромов 3A4, 2D6 и 2C9 [36]. Для описания лигандов использовались дескрипторы, отражающие топологические и физико-химические свойства, такие как молекулярный вес, электроотрицательность, поляризуемость, длина связей, типы колец, планарные и непланарные системы, типы атомов, а также дескрипторы, описывающие электростатические и гидрофобные взаимодействия, количество доноров и акцепторов водородных связей, размер и форму лигандов. Созданная модель предсказывает субстраты для этих цитохромов с точностью выше 90%. Но подобные системы хорошо работают обычно только на небольших выборках тщательно подобранных известных

субстратов. Кроме того, для них так же актуальна проблема четкого разграничения субстратов/несубстратов, поскольку значительное число лигандов конкретных изоформ цитохромов P450 являются их субстратами и ингибиторами.

Ещё одним подходом для предсказания субстратной специфичности являются экспертные системы, которые на основании внутренних правил выводят оценку вероятности способности соединений быть окисленными различными изоформами цитохрома P450. Так в Институте биомедицинской химии РАМН недавно была разработана система для предсказания специфичности и селективности для субстратов, ингибиторов и индукторов пяти цитохромов P450 человека (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4) и возможных мест гидроксирования [39]. Для своей работы система использует алгоритм программы PASS. Среди других экспертных систем надо отметить программы TIMES [40], METEOR [41], META [42].

Предсказание селективности на основе структуры белка.

Несмотря на то, что цитохромы P450 распространены во всех царствах, имеется существенное отличие бактериальных цитохромов и цитохромов млекопитающих. Бактериальные цитохромы являются водорастворимыми белками, тогда как цитохромы из высших царств — мембраносвязанными. Вполне естественно, что первыми были кристаллизованы и определены пространственные структуры бактериальных цитохромов. Потребовалось более 14 лет, чтобы научиться кристаллизовать мембраносвязанные цитохромы, причем для получения первых кристаллов млекопитающих для повышения растворимости белка генетическими методами удаляли мембраносвязывающий N-конец фермента и дополнительно мутировали ряд аминокислотных остатков. Поэтому долгое время для анализа структурных особенностей цитохромов P450 человека использовали компьютерные модели, построенные по методу гомологии с использованием в качестве шаблона (template) структуры бактериальных цитохромов. Хотя гомология между бактериальными и человеческими цитохромами достаточно низкая, построенные модели давали представление о структуре белка и порой успешно использовались для предсказания лигандов.

За последнее десятилетие были определены пространственные структуры 13 цитохромов P450 человека, последним был CYP51 летом 2009 года. Таким образом, из 5 цитохромов человека, которые в основном участвуют в окислении ксенобиотиков, в том числе и лекарств, пространственные структуры известны для четырёх из них (исключение 2C19).

Пространственные структуры позволили получить детальное представление о строении активных центров цитохромов и использовать их для предсказания субстратной специфичности компьютерными методами, основанными на структуре мишени. Однако цитохромы P450 являются сложными объектами для применения этих методов. Это связано как со структурными особенностями белков, их лигандов, так и их взаимодействий. К ним можно отнести наличие простетической группы, высокую конформационную подвижность белка, большой активный центр (обычно он значительно больше, чем его субстраты), и, как следствие, широкую субстратную специфичность цитохромов, множество мест окисления субстратов.

Тем не менее, было проведено много исследований, в которых методом молекулярного докинга пытались определить положение субстратов в активных центрах цитохромов и оценить прочность связывания. Для этого использовали как экспериментально определенные структуры цитохромов, так и их компьютерные модели. Общий вывод, который вытекает из анализа подобных работ, заключается в том, что если положение субстрата в активном центре порой можно достаточно успешно предсказывать, то величины оценочных функций, используемых для оценки энергии связывания, для цитохромов P450 работают плохо [43, 44]. Причинами этого могут быть большой активный центр фермента, в результате чего существует проблема отбора положения и конформеров субстратов, лиганд-индуцированное изменение структуры активного центра, плохая

ПРЕДСКАЗАНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

параметризация оценочных функций в связи с присутствием гема в активном центре. В некоторых работах были предприняты попытки улучшить предсказания докинга. Величины оценочных функций совместно с набором параметров, описывающих структуру и свойства лигандов, были использованы при построении нейронной сети для предсказания связывания соединений с цитохромом 2D6 [45]. Соединения были разделены на высоко-, средне- и слабоактивные; аккуратность предсказаний построенной нейронной сети составила 85%. Для цитохрома P450cam было показано, что использование нескольких оценочных функций улучшает предсказание докинга [46]. Учет положения молекул воды в активном центре может способствовать нахождению более правдоподобных положений субстратов при докинге [47].

Другим направлением, которое может способствовать более точному предсказанию субстратной специфичности, является использование метода молекулярной динамики и связанные с ним более точные расчеты энергии взаимодействия белок-лиганд. Для цитохрома 2D6 было показано, что докирование субстратов в активный центр не дает хороших результатов, однако использование симуляции молекулярной динамики этих комплексов позволяет значительно улучшить результаты [48]. В ряде работ было показано, что использование сложных ресурсоемких методов расчета энергии связывания лигандов, таких как пертурбация свободной энергии (free energy perturbation, FEP) [49], MM-PBSA для оценки энергии сольватации и нормальных мод (normal mode) для учета конформационной энтропии [50] дает хорошие результаты для известных субстратов цитохромов.

Метод молекулярного докинга часто используется совместно с методами, основанными на анализе лигандов. Так, этот метод использовался для нахождения взаимоориентации лигандов при построении фармакофорной модели цитохрома 2C8 [51]. Для улучшения предсказания докинга использовали 3D-QSAR с CoMSIA модель для поиска новых лигандов цитохрома 1A2 [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Предсказание субстратной специфичности и ингибиторной селективности цитохромов P450 представляет актуальную задачу для разработки новых лекарственных препаратов. Являясь ведущей группой ферментов в метаболизме экзогенных веществ, цитохромы во многом определяют судьбу лекарственных препаратов, и ответ организма на эти лекарства. Возможность предсказывать судьбу разрабатываемых лекарств на самом раннем этапе их конструирования является насущной проблемой.

В этой статье мы основное внимание уделили компьютерным методам предсказания субстратной специфичности цитохромов P450 человека. Однако те же методы используются и для оценки ингибиторной способности лигандов.

Компьютерное предсказание субстратной специфичности цитохромов является сложной, многофакторной задачей. Причина этого кроется как в структуре самого белка, так и в его взаимодействии с субстратами: большой активный центр, наличие гема, участие воды в связывании субстратов, лиганд-индуцированное изменение структуры активного центра, широкая субстратная специфичность, множество мест окисления субстратов, возможность связывания нескольких лигандов в активном центре, гомотропная и гетеротропная кооперативность.

Для предсказания субстратной специфичности использовались различные методы и подходы: анализ аминокислотных последовательностей, структур лигандов, структур ферментов. Попытки научиться предсказывать субстраты по аминокислотной последовательности цитохромов оказались малоудачными. Причина, по-видимому, заключается в низкой гомологии цитохромов и перекрестной субстратной специфичности. Кроме того, эти методы не могут учесть большой конформационной подвижности активного центра фермента. Фармакофорные модели показали свою пригодность для предсказания возможных субстратов, однако для них остается проблема выбора набора лигандов,

по которым строится модель. Использование близких по химической структуре соединений, с одной стороны приведет к комплексной модели, но при этом будет высокий шанс не описать всю совокупность возможных субстратов. С другой стороны, в результате использования широкой группы соединений результатом будет вырожденная модель, под описание которой может попасть очень широкий набор химических структур. QSAR модели часто позволяют предсказывать величины связывания, но они не всегда хорошо работают для разделения соединений на активные и неактивные. Поэтому в последние годы в этом направлении наметилась тенденция использования для анализа и предсказания сложных статистических методов в надежде, что нелинейные модели могут лучше проводить данную селекцию [35-38]. Метод молекулярного докинга опирается только на знание структуры мишени, для его работы не требуются знания об известных лигандах для этого белка. Однако его широкое применение сдерживает низкая предсказательная способность оценочных функций для отбора лигандов. В литературе известна одна работа, в которой метод докинга использовался для поиска новых субстратов цитохрома P450cam в молекулярных базах данных [46].

Другой закономерностью для работ, посвященных этой проблеме, является одновременное использование нескольких методов. Так, часто совместно с построением фармакофорной модели используется пространственная структура цитохрома или его компьютерная модель [51], результаты докинга уточняются с использованием статистических методов [34, 45] или молекулярной динамики [48]. По-видимому, в настоящее время это является наиболее рациональным подходом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ruiz-Garcia A., Bermejo M., Moss A., Casabo V.G. (2008) *J. Pharm. Sci.*, **97**, 654-690.
2. van de Waterbeemd H., Gifford E. (2003) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 192-204.
3. Zhengyin Y., Caldwell G.W. (2001) *Curr. Top. Med. Chem.*, **1**, 403-425.
4. Iyanagi T. (2007) *Int. Rev. Cytol.*, **260**, 35-112.
5. Guengerich F.P. (2003) *Mol. Interv.*, **3**, 194-204.
6. Guengerich F.P. (2001) *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 611-650.
7. Cruciani G., Carosati E., De Boeck B., Ethirajulu K., Mackie C., Howe T., Vianello R. (2005) *J. Med. Chem.*, **48**, 6970-6979.
8. Lewis D.V.F. (2001) *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **76**, 237-244.
9. Cohen L.H., Remley M.J., Raunig D., Vaz A.D. (2003) *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 1005-1015.
10. Lisitsa A., Archakov A., Lewi P., Janssen P. (2003) *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **25**, 733-745.
11. Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. (1996) *Pharmacogenetics*, **6**, 1-42.
12. Wada Y., Mitsuda M., Ishihara Y., Watanabe M., Iwasaki M., Asahi S. (2008) *J. Biochem.*, **144**, 323-333.
13. DeVore N.M., Smith B.D., Wang J.L., Lushington G.H., Scott E.E. (2009) *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 1319-1327.
14. Borodina Yu., Lisitsa A., Poroikov V., Filimonov D., Sobolev B., Archakov A. (2003) *Nova Acta Leopoldina*, **87**, 47-55.
15. Petrey D., Honig B. (2009) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 363-368.
16. Gotoh O. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 83-90.
17. Lee T.S. (2008) *Evol. Bioinform. Online*, **4**, 7-16.
18. Oezguen N., Kumar S., Hindupur A., Braun W., Muralidhara B.K., Halpert J.R. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 21808-21816.
19. Alexandrov K., Sobolev B., Filimonov D., Poroikov V. (2008) *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **6**, 709-725.

ПРЕДСКАЗАНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450

20. *Kirton S.B., Baxter C.A., Sutcliffe M.J.* (2002) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 385-406.
21. *Domanski T.L., Halpert J.R.* (2001) *Curr. Drug Metab.*, **2**, 117-137.
22. *Jung J., Kim N.D., Kim S.Y., Choi I., Cho K.H., Oh W.S., Kim D.N., No K.T.* (2008) *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 1074-1080.
23. *Singh S.B., Shen L.Q., Walker M.J., Sheridan R.P.* (2003) *J. Med. Chem.*, **46**, 1330-1336.
24. *de Groot M.J., Alex A.A., Jones B.C.* (2002) *J. Med. Chem.*, **45**, 1983-1993.
25. *Islam S.A., Wolf C.R., Lennard M.S., Sternberg M.J.* (1991) *Carcinogenesis*, **12**, 2211-2219.
26. *Oh W.S., Kim D.N., Jung J., Cho K.H., No K.T.* (2008) *J. Chem. Inf. Model.*, **48**, 591-601
27. *Jones J.P., He M.X., Trager W.F., Rettie A.E.* (1996) *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 1-6.
28. *Mancy A., Dijols S., Poli S., Guengerich P., Mansuy D.* (1996) *Biochemistry*, **35**, 16205-16212.
29. *Locuson C.W., Rock D.A., Jones J.P.* (2004) *Biochemistry*, **43**, 6948-6958.
30. *Веселовский А.В., Медведев А.Е., Тихонова О.В., Скворцов В.С., Иванов А.С.* (2000) *Биохимия*, **65**, 1072-1079.
31. *Lewis D.F.V., Modi S., Dickins M.* (2002) *Drug Metab. Rev.*, **34**, 69-82.
32. *Rao S., Aoyama R., Schrag M., Trager W.F., Rettie A., Jones J.P.* (2000) *J. Med. Chem.*, **43**, 2789-2796.
33. *Haji-Momenian S., Rieger J.M., Macdonald T.L., Brown M.L.* (2003) *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 5545-5554.
34. *Белкина Н.В., Скворцов В.С., Иванов А.С., Арчаков А.И.* (1998) *Вопр. мед. химии*, **44**, 464-473.
35. *Gleeson M.P., Davis A.M., Chohan K.K., Paine S.W., Boyer S., Gavaghan C.L., Arnby C.H., Kankkonen C., Albertson N.* (2007) *J. Comp.-Aided Mol. Des.*, **21**, 559-573.
36. *Yap C.W., Chen Y.Z.* (2005) *J. Chem. Inf. Model.*, **45**, 982-992.
37. *Fukunishi Y., Hojo S., Nakamura H.* (2006) *J. Chem. Inf. Model.*, **46**, 2610-2622.
38. *Terfloth L., Bienfait B., Gasteiger J.* (2007) *J. Chem. Inf. Model.*, **47**, 1688-1701.
39. *Дмитриев А.В.* (2009) Прогноз взаимодействия ксенобиотиков с цитохромами P450 человека. Автореф. дисс. канд. наук, ИБМХ РАМН, Москва.
40. *Mekenyan O.G., Dimitrov S.D., Pavlov T.S., Veith G.D.* (2004) *Curr. Pharm. Des.*, **10**, 1273-1293.
41. *Greene N., Judson P.N., Langowski J.J., Marchant C.A.* (1999) *SAR QSAR Environ. Res.*, **10**, 299-313.
42. *Klopman G., Dimayuga M., Talafous J.* (1994) *J. Chem. Inform. Comp. Sci.*, **34**, 1320-1325.
43. *de Graaf C., Vermeulen N.P.E., Feenstra A.K.* (2005) *J. Med. Chem.*, **48**, 2725-2755.
44. *Ahlstrom M.M., Ridderstrom M., Zamora I.* (2007) *J. Med. Chem.*, **50**, 5382-5391.
45. *Bazeley P.S., Prithivi S., Struble C.A., Povinelli R.J., Sem D.S.* (2006) *J. Chem. Inf. Model.*, **46**, 2698-2708.
46. *Keseru G.M.* (2001) *J. Comp.-Aided Mol. Des.*, **15**, 649-657.
47. *de Graaf C., Oostenbrink C., Keizers P.H.J., van der Wijst T., Jongejan A., Vermeulen N.P.E.* (2006) *J. Med. Chem.*, **49**, 2417-2430.
48. *Keizers P.H., de Graaf C., de Kanter F.J., Oostenbrink C., Feenstra K.A., Commandeur J.N., Vermeulen N.P.* (2005) *J. Med. Chem.*, **48**, 6117-6127.
49. *Helms V.; Wade R.C.* (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2710-2713.
50. *Harris D.L., Park J.Y., Gruenke, L., Waskell L.* (2004) *Proteins*, **55**, 895-914.
51. *Tanaka T., Kamiguchi N., Okuda T., Yamamoto Y.* (2004) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **52**, 836-841.

Поступила: 22. 04. 2009.

COMPUTER-BASED SUBSTRATE SPECIFICITY PREDICTION FOR CYTOCHROME P450

A.V. Veselovsky, B.N. Sobolev, M.S. Zharkova, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya str., 10, Moscow, 119121 Russia;
tel.: 7- 499-245-0768; fax: 7-499-245-0857; e-mail: veselov@ibmh.msk.su

Cytochrome P450 is important class of enzymes metabolizing numerous drugs. The composition and activity of these enzymes are determined the drug distribution in organism, its pharmacological and toxic effect. Thus the prediction of the behaviour of compounds in organism is essential for discovery and development of new drugs in the early stages of this process. The different isoforms of cytochrome P450 can oxidized wide range of chemical compounds and their substrate specificity do not correlate with their taxonomical classification. The main methods of cytochrome P450 substrate specificity prediction is reviewed. These methods divided based on primary informations that used: prediction based on amino acid sequences, ligand-based (pharmacophore and QSAR models) and structure-based (molecular docking, affinity prediction) methods. The common problem of cytochrome P450 substrate prediction and advantage and disadvantages of these methods are discussed.

Key words: cytochrome P450, computer methods, substrate, selectivity, prediction.