

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С АЛЬБУМИНОМ НА ОСНОВЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИГАНДОВ

Пшенкина Н.Н.

ФГБОУ ВПО "Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова" МО РФ

194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Тел. (812) 542-35-07 E-mail: pshenkina@mail.ru

Резюме. В экспериментах *in vitro* были получены значения констант взаимодействия с альбумином для 50 лекарственных веществ, обладающих различным фармакологическим действием. Физико-химические свойства были рассчитаны с помощью методов компьютерной химии и послужили предикторами при разработке уравнений регрессии с целью прогнозирования константы связывания лигандов с альбумином. Разработанные уравнения регрессии позволили с достаточной долей вероятности спрогнозировать значения константы взаимодействия, и прошли валидацию с использованием независимой выборки лекарственных соединений.

Ключевые слова: альбумин, лекарственные вещества, связывание, физико-химические свойства, прогнозирование.

PREDICTION OF DRUG BINDING TO SERUM ALBUMIN ON THE BASE OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF LIGANDS

Pshenkina N.N.

Military Medical Academy named after S.M. Kirov,

Academic Lebedev str., 6, Saint Petersburg, 194044, Russia

Tel. +7 (812) 542-35-07 E-mail: pshenkina@mail.ru

Abstract. Drug – albumin binding constants for 50 substances have been received in *in vitro* experiments. Physical and chemical properties for these drugs have been calculated by means of methods of computer chemistry and have served as predictors in development of regression equations for prediction of binding constants. The developed equations have allowed with sufficient probability to predict values of interaction constants, and have been validated by means of independent drug set.

Key words: albumin, drugs, binding, physical and chemical properties, prediction.

Связывание лекарственных веществ с белками плазмы и, прежде всего, с сывороточным альбумином является одним из важных фармакокинетических параметров, определяющих распределение лекарств в организме. Комплекс лекарственных веществ с альбумином формирует в крови депо, благодаря которому лекарство дольше циркулирует в кровотоке, обеспечивается его защита от процессов метаболизма и элиминации. В результате лекарственные соединения могут более эффективно доставляться к органам-мишеням, не подвергаясь неспецифическому рассеянию [1-3]. Степень связывания оказывает существенное влияние на фармакокинетические, фармакодинамические и токсические свойства лекарственных веществ, длительность действия, концентрацию активного препарата в биологических жидкостях и на рецепторном участке, и, в конечном счете, на выраженность фармакологического и терапевтического эффектов [4-6]. В связи с этим, изучение механизмов взаимодействия лекарственных препаратов с сывороточным альбумином, а также изыскание возможности прогнозировать параметры лиганд-альбуминового связывания имеет фундаментальное значение для фармакокинетики и фармакодинамики.

Альбумин относится к одному из наиболее изученных белков человека и животных. Его молекулярная структура полностью расшифрована, идентифицированы центры связывания лигандов и жирных кислот [7-10]. Несмотря на изученность альбумина, интерес к исследованию механизмов связывания лигандов не ослабевает, а, напротив, предлагаются все новые подходы к анализу данного взаимодействия. В последние годы получили развитие предиктивные методологии, основанные на количественном анализе взаимосвязей между структурой, свойствами и активностью. Вместе с тем, модели, предназначенные для прогнозирования связывания лигандов с альбумином, немногочисленны. Предлагаются методы прогнозирования параметров связывания на основе фармакофорного сходства лигандов [11] или с использованием индексов электро-топологического состояния [12], однако данные модели достаточно сложны и трудоемки в реализации.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе зависимости параметров связывания лекарственных веществ и альбумина от физико-химических свойств лигандов, а также в разработке уравнений регрессии, позволяющих прогнозировать параметры лиганд-альбуминового взаимодействия на основе физико-химических свойств.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы 50 лекарственных соединений, принадлежащих к различным фармакологическим группам, и обладающих разнообразными физико-

химическими свойствами. Для всех 50 лигандов были получены следующие физико-химические параметры: молекулярная масса MW , число доноров Don и акцепторов Acc водорода при образовании водородной связи, число вращающихся связей в молекуле лекарственного вещества Rot , площадь топологической полярной поверхности молекулы $TPSA$, липофильность $LogP$ (логарифм распределения в системе октанол/вода) и молекулярный объем Vol . Перечисленные свойства были получены расчетными методами *in silico* с помощью молекулярного web-калькулятора Molinspiration [13]. Кроме того, с использованием оригинального программного обеспечения, разработанного компанией Quantum Pharmaceuticals (Москва) [14], и при участии специалистов компании были проведены расчеты констант ионизации pK_a , а также растворимости лекарственных соединений в воде $LogS_{H_2O}$ и в неполярном растворителе диметилсульфоксиде $LogS_{DMSO}$. Из электронной базы данных DrugBank были почерпнуты сведения о температуре плавления $t_{пл}$ исследуемых лекарственных соединений [15].

Параметры взаимодействия лекарственных веществ с альбумином получали в экспериментах *in vitro* при анализе концентрационного тушения флуоресценции белка при связывании с лигандом [16]. В работе использовали бычий сывороточный альбумин (BSA, фирмы Sigma, USA) лиофилизированный, фракция IV по Кону, свободный от жирных кислот. Альбумин использовали в одной концентрации – 10 мкМ в растворе 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,4. Лекарственные вещества брали в постоянных концентрациях: 2,5 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 мкМ. Интенсивность флуоресценции измеряли при $\lambda_{возб} = 290$ нм, $\lambda_{эмисс} = 340$ нм на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4. Расчет константы взаимодействия лигандов с белком проводили в соответствие с уравнением Штерна-Фольмера [16].

При анализе результатов исследования и разработке уравнений регрессии использовали прикладной пакет для статистической обработки данных SPSS v.17.

Результаты исследования

На основе молекулярной структуры 50 препаратов, взятых для исследования, были рассчитаны 11 физико-химических и структурных параметров. Полученные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические свойства лекарственных веществ

	LogP	MW	TPSA	Don	Acc	Rot	pK_a	LogS H ₂ O	LogS DMSO	$t_{пл}$	Vol
Амикацин	-6,65	586	332	13	17	10	8,4	-0,9	-2,6	203	510
Амитриптилин	4,80	277	3	0	1	3	9,8	-4,6	-0,4	196	285
Ампициллин	-0,33	349	113	3	5	4	2,8	-3,1	-0,3	208	299

Атенолол	0,70	266	85	3	4	8	9,7	-4,0	-0,3	146	261
Бендазол	4,10	208	29	1	2	2	5,5	-4,0	-0,5	90	197
Бензилпенициллин	1,60	334	87	2	4	4	2,3	-1,4	-0,1	214	288
Варфарин	3,27	308	64	1	4	4	5,2	-4,0	-0,1	161	277
Верапамил	5,02	455	64	0	6	13	9,1	-5,9	-0,9	25	454
Винпоцетин	4,40	350	35	0	4	4	6,6	-5,3	-0,7	180	333
Галантамин	1,70	287	42	1	4	1	8,1	-3,4	-0,4	269	268
Гентамицин	-2,95	478	214	8	12	6	8,6	-1,7	-1,9	230	416
Дексаметазон	1,60	392	95	3	6	2	6,5	-3,8	-0,2	262	358
Диклофенак	4,41	296	49	2	3	4	4,1	-4,6	0,3	283	239
Диоксидин	0,70	222	87	2	5	2	6,5	-4,1	-0,5	80	1891
Дифенгидрамин	3,39	255	13	0	2	6	9,2	-3,7	-0,2	166	261
Дротаверин	5,15	397	49	1	5	9	6,5	-5,5	-0,5	150	387
Ибупрофен	3,64	206	37	1	2	4	4,7	-3,6	0,6	75	211
Имипрамин	4,18	280	6	0	2	4	9,4	-4,1	-0,7	174	287
Кетопрофен	3,40	254	54	1	3	4	4,2	-3,7	0,4	94	235
Кеторолак	2,39	255	59	1	4	3	3,6	-3,1	0,2	165	226
Клемастин	5,23	344	12	0	2	6	10,5	-5,6	-0,3	178	330
Кофеин	-0,50	194	58	0	4	0	10,5	-1,4	-0,5	238	168
Лидокаин	2,06	234	32	1	2	5	8,1	-2,6	-0,2	69	245
Метамизол	0,58	333	84	0	6	3	2,1	-3,4	-0,5	170	261
Метоклопрамид	1,82	300	68	2	4	7	9,1	-3,1	-0,4	147	279
Метопролол	1,79	267	51	2	4	9	9,3	-2,9	-0,1	120	273
Метронидазол	-0,10	171	81	1	5	2	2,1	-1,6	-0,1	160	147
Нимодипин	3,11	418	117	1	8	9	4,8	-4,7	0,1	125	379
Офлоксацин	1,01	361	73	1	8	2	5,9	-2,6	-0,5	253	311
Папаверин	3,57	339	50	0	5	6	6,2	-4,4	-0,3	160	314
Пентоксифиллин	0,23	278	76	0	5	5	6,5	-2,3	-0,6	105	253
Пирацетам	-0,80	142	63	1	2	2	6,5	-0,8	0,4	80	131
Пирензепин	0,83	351	69	1	5	2	2,1	-3,0	-1,5	160	319
Пирлиндол	3,50	226	17	1	2	0	8,0	-3,5	-0,5	110	222
Прокаин	1,90	236	56	1	4	7	7,9	-1,9	-0,2	61	236
Прометазин	4,43	284	6	0	2	3	9,5	-4,5	-0,5	60	272
Пропранолол	2,90	259	42	2	3	6	9,1	-3,6	-0,3	163	258
Ранитидин	0,92	314	84	2	6	9	2,6	-3,7	-0,5	69	289
Теофиллин	-0,63	180	69	1	4	0	8,9	-1,4	-0,4	272	151
Фенилбутазон	3,03	285	33	0	2	1	3,3	-4,2	-0,4	125	246
Фторурацил	-0,74	130	58	2	3	0	8,0	-1,3	0,5	281	97
Фуросемид	1,82	330,7	123	3	7	5	4,4	-3,7	0,1	206	250
Хлорамфеникол	0,98	323	113	3	5	2	10,8	-2,8	0,3	151	249
Хлоропирамин	3,47	290	19	0	3	6	8,7	-3,5	-0,8	60	274

Цефазолин	-0,65	455	156	2	10	7	2,6	-4,0	-2,1	220	344
Цефотаксим	-0,63	456	176	2	10	7	2,3	-3,9	-0,9	220	356
Ципрофлоксацин	0,31	331	73	2	7	3	6,3	-2,4	-0,5	256	286
Эмоксипин	2,30	137	33	1	2	1	4,9	-2,7	0,1	70	138
Эналаприл	1,24	376	96	2	6	10	5,3	-3,5	-0,1	144	357
Этамзилат	0,40	263	107	4	6	3	7,4	-3,2	-0,1	100	140

В экспериментах *in vitro* был проведен анализ связывания 50 лекарственных веществ с сывороточным альбумином и на основании полученных данных были рассчитаны значения констант взаимодействия. Полученные величины констант находились в широком диапазоне значений и составляли от $2,5 \cdot 10^0 \text{ M}^{-1}$ в случае амикацина до $7,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ в случае дротаверина. Столь большие колебания значений исследуемого параметра весьма затрудняют статистический анализ данных. Действительно, при вариации значений параметра связывания с альбумином от нескольких единиц до сотен тысяч вариации физико-химических параметров представляются ничтожными. В частности, корреляционный анализ таких данных практически не имеет смысла. В связи с этим, значения констант взаимодействия были приведены к логарифмическому виду, что часто используется для представления такого рода данных. Полученные значения приведены в таблице 2 в первой колонке цифр.

Таблица 2 – Параметры взаимодействия лекарственных веществ с сывороточным альбумином в опытах *in vitro*

Лекарственные вещества	Значения $\log K_{alb}$		Лекарственные вещества	Значения $\log K_{alb}$	
	Эксперим.	Прогнозир.		Эксперим.	Прогнозир.
Амикацин	0,94	0,99	Метопролол	1,80	2,71
Амитриптилин	4,66	4,81	Метронидазол	2,65	2,87
Ампициллин	2,32	3,32	Нимодипин	4,17	5,24
Атенолол	2,86	3,06	Офлоксацин	2,85	3,51
Бендазол	4,02	5,04	Папаверин	4,66	4,67
Бензилпенициллин	3,62	3,76	Пентоксифиллин	1,93	2,64
Варфарин	5,90	5,03	Пирацетам	1,76	1,71
Верапамил	4,48	4,71	Пирензепин	2,33	3,25
Винпоцетин	4,13	5,35	Пирлиндол	4,29	4,50
Галантамин	3,86	3,73	Прокаин	2,44	2,99
Гентамицин	2,96	2,41	Прометазин	4,48	4,67
Дексаметазон	4,47	4,63	Пропранолол	4,61	3,90
Диклофенак	5,11	5,67	Ранитидин	2,29	2,89
Диоксидин	4,57	3,95	Теofilлин	2,43	2,40
Дифенгидрамин	4,65	3,63	Фенилбутазон	5,24	4,69

Дротаверин	5,89	5,35	Фторурацил	1,83	2,27
Ибупрофен	5,40	4,78	Фуросемид	5,56	4,92
Имипрамин	4,17	4,22	Хлорамфеникол	3,66	4,44
Кетопрофен	5,13	4,95	Хлоропирамин	2,31	3,67
Кеторолак	5,32	4,33	Цефазолин	3,68	3,25
Клемастин	4,17	5,22	Цефотаксим	4,71	3,86
Кофеин	2,87	2,29	Ципрофлоксацин	3,58	2,88
Лидокаин	3,01	3,14	Эмоксипин	3,62	3,92
Метамизол Na	3,59	3,55	Эналаприл	2,26	3,13
Метоклопрамид	2,48	3,40	Этамзилат	3,37	3,84

В результате корреляционного анализа связей между параметром взаимодействия с альбумином и физико-химическими свойствами лигандов была установлена умеренная положительная связь $\log K_{alb}$ с липофильностью $LogP$ ($r = 0,61$). Столь же выраженная, но отрицательная корреляция выявлена между $\log K_{alb}$ и растворимостью лекарственных веществ в воде $LogS_{H_2O}$ ($r = - 0,62$). Менее отчетливая, но статистически значимая отрицательная корреляция отмечена между $\log K_{alb}$ и полярными свойствами лигандов (площадь полярной поверхности $TPSA$ ($r = - 0,31$) и число доноров водорода Don ($r = -0,32$)).

На следующем этапе исследования был проведен множественный линейный регрессионный анализ, в ходе которого зависимой (прогнозируемой) переменной служил $\log K_{alb}$, а в качестве дескрипторов были использованы 11 переменных, характеризующих физико-химические свойства лигандов. Поскольку корреляционный анализ выявил довольно слабую линейную зависимость $\log K_{alb}$ от исследованных свойств, в набор дескрипторов были также включены параметры, полученные путем математических преобразований 11 переменных. Отбор переменных для уравнения регрессии проводили методом пошагового включения параметров, удовлетворяющих наперед заданным уровням значимости статистических критериев. Помимо автоматической селекции, прибегали к принудительному включению параметров, обнаруживающих корреляционные связи с зависимой переменной $\log K_{alb}$. Всего было сгенерировано свыше 30 уравнений регрессии, из которых были отобраны 3 уравнения, которые приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Уравнения регрессии для логарифма константы взаимодействия $\log K_{alb}$ лекарственных веществ с альбумином

Уравнения регрессии	R/R ²	F	
$\log K_{alb} = 1,25 + 0,9 \cdot \text{Log}P + 2,6 \cdot 10^{-2} \text{TPSA} - 0,2 \cdot \text{Rot}$	0,78 / 0,61	23,9	(1)
$\log K_{alb} = 3,4 \cdot 10^{-2} + \text{Log}P - 0,02 \cdot (\text{Rot})^2 + 0,02 \cdot (\text{TPSA} + \text{Rot}) + 0,5 \cdot \ln(\text{TPSA}/(\text{Don} + \text{Acc} + \text{Rot}))$	0,82 / 0,67	19,4	(2)
$\log K_{alb} = 1,6 - 0,7 \cdot \text{Log}S_{H_2O} + 0,6 \cdot \text{Log}S_{DMSO}$	0,67 / 0,46	19,6	(3)

Условные обозначения:

R – множественный коэффициент корреляции.

R² – коэффициент детерминации, выраженный в процентах.

F – статистика Фишера оценки значимости регрессии.

Уравнение 1 составлено на основе физико-химических параметров, использованных в их линейном (изначальном) виде. В уравнение 2 введены дополнительные переменные, представляющие собой комбинации преобразованных параметров и их соотношения. Наконец, уравнение 3 использует исключительно параметры растворимости лигандов в воде и DMSO. Хотя уравнение 3 несколько уступает по статистическим параметрам уравнениям 1 и 2, представляется, что использование его должно способствовать объективизации конечных расчетов, поскольку оно использует параметры, отличные от первых двух уравнений.

Разработанные уравнения регрессии были применены для расчета значений $\log K_{alb}$ в отношении 50 препаратов с целью проверки соответствия экспериментальных и расчетных значений. Расчеты выполняли с использованием всех трех уравнений, а затем вычисляли среднее прогнозируемое значение. Полученные результаты приведены во второй колонке таблицы 2. Сопоставляя значения $\log K_{alb}$, представленные в 1 и 2 колонках таблицы, можно отметить достаточно хорошую сходимость наблюдаемых и расчетных величин.

Поскольку данные о связывании лекарственных веществ с альбумином достаточно широко представлены в литературе, для валидации разработанных уравнений регрессии представлялось важным сопоставить расчетные величины $\log K_{alb}$ с данными литературы. С этой целью значения $\log K_{alb}$ были рассчитаны для 60 лекарственных веществ, не исследованных в наших экспериментах. Физико-химические свойства для этих препаратов были рассчитаны аналогичным образом, как для экспериментальной выборки из 50 соединений. Сведения о связывании лекарственных веществ с альбумином были

почерпнуты из электронных баз данных Регистра лекарственных средств России и DrugBank [15, 17]. Поскольку в литературе данные о связывании приводятся в процентах, для приведения процентных величин к значениям $\log K_{alb}$ мы воспользовались формулой, предложенной N.A. Kratochwil et al. [11]:

$$\log K_{alb} = \log \frac{[f_b]}{1 - [f_b]} - \log[HSA], \text{ где}$$

f_b – фракция связанного альбумина, [HSA] – концентрация альбумина в крови, которую принимали, равной 0,6 мМ, что примерно соответствует 5%-ной концентрации белка.

Значения $\log K_{alb}$ для 60 препаратов из независимой выборки были рассчитаны в соответствии с 3 разработанными уравнениями регрессии с последующим вычислением среднего прогнозируемого значения. Соотношение прогнозируемых значений $\log K_{alb}$ и данных литературы наглядно иллюстрирует график на рисунке 1.

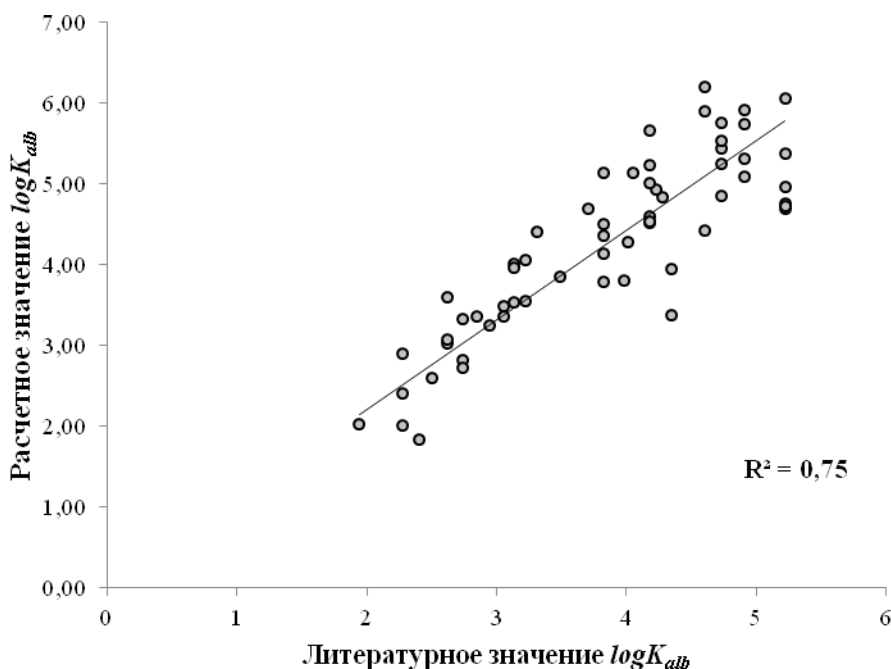


Рисунок 1 – Соответствие расчетных и литературных значений $\log K_{alb}$ для независимой выборки из 60 лекарственных веществ

Представленная диаграмма рассеяния демонстрирует высокую сходимость расчетных и литературных данных с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,75$. Учитывая, что данные литературы имеют некоторые вариации в зависимости от методов оценки, а также тот факт, что в справочной литературе зачастую приводятся цифры в диапазоне значений, можно считать, что разработанные уравнения вполне удовлетворительно

позволяют прогнозировать степень связывания лекарственных веществ с альбумином крови на основе физико-химических свойств лигандов.

Заключение

Проведенные исследования показали, что степень связывания лигандов с альбумином может быть с достаточной долей вероятности спрогнозирована на основе физико-химических свойств лигандов, таких как липофильность, водорастворимость, площадь полярной поверхности молекул, число доноров и акцепторов водорода и число вращающихся связей в структуре лиганда. Перечисленные параметры могут быть почерпнуты из электронных баз данных либо рассчитаны с помощью молекулярных калькуляторов на основе структурной формулы соединения. Это делает возможным использование предлагаемого подхода для прогнозирования сродства к альбумину практически любого химического вещества, для которого известна структурная формула.

Литература

1. Kamal J.K.A., Zhao L., Zewail A.H. Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: Human serum albumin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. - 2004. - Vol.101. - №37. - P.13411-13416.
2. Peters T., Jr. All about albumin: biochemistry, genetics and medical application. San Diego: Academic Press. - 1996.
3. [Seedher N.](#), [Bhatia S.](#) Mechanism of interaction of the non-steroidal antiinflammatory drugs meloxicam and nimesulide with serum albumin // [J. Pharm. Biomed. Anal.](#) - 2005. - Vol.39. - №1-2. - P.257-262.
4. [Aarons L.](#) Kinetics of drug–drug interactions // *Pharmacol. Ther.* - 1981. - Vol.14. - №3. - P.321-344.
5. [Perucca E.](#), [Richens A.](#) Interpretation of drug levels: relevance of plasma protein binding // *Ciba Found. Symp.* - 1979. - Vol.74. - P.51-68.
6. [Seydel J.K.](#), [Schaper K.J.](#) Quantitative structure-pharmacokinetic relationships and drug design // *Pharmacol. Ther.* - 1981. - Vol.15. - №2. - P.131-182.
7. [Carter D.C.](#), [Ho J.X.](#) Structure of serum albumin // [Adv. Protein. Chem.](#) - 1994. - Vol.45. - P.153-203.
8. [Ferrer M.L.](#), [Duchowicz R.](#), [Carrasco B.](#), [de la Torre J.G.](#), [Acuna A.U.](#) The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization - hydrodynamic modeling study // [Biophys. J.](#) - 2001. - Vol.80. - №5. - P.2422-2430.
9. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin // *Pharmacol. Rev.* - 1981. - Vol.33. - №1. - P.17-53.

10. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. Cristal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution // Prot. Engineering. - 1999. - Vol.12. - №6. - P.439-446.
11. Kratochwil N.A., Huber W., Müller F., Kansy M., Gerber P.R. Predicting plasma protein binding of drugs: A new approach // Biochem. Pharmacol. – 2002. - Vol. 64, № 9. – P. 1355-1374.
12. Hall L.M., Hall L.H., Kier L.B. Modeling drug albumin binding affinity with e-state topological structure representation // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 2003. – Vol.43. – P.2120-2128.
13. Molinspiration. Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. URL: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
14. Quantum Pharmaceuticals. URL: <http://q-pharm.com>
15. DrugBank database. URL: <http://www.drugbank.ca>
16. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир. 1986. 485с.
17. Регистр лекарственных средств России. Справочник по лекарственным препаратам и их производителям. URL: <http://www.rlsnet.ru>