

Računarski modeli za predviđanje transporta lekova posredovanog P-glikoproteinom

Slavica Eric^{1,*}, Marko Kalinić¹

¹ Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

* autor za korespondenciju: seric@pharmacy.bg.ac.rs

telefon: +381 11 3951 355, fax: +381 11 3972 840

Kratak sadržaj

P-glikoprotein (Pgp) je transmembranski transporter koji, transportujući strukturno raznovrsne lekove iz unutrašnjosti ćelije u ekstracelularnu sredinu, može uticati na resorpciju, distribuciju i efikasnost većeg broja lekova. Prekomerna ekspresija Pgp-a u ćelijama predstavlja jedan od mehanizama razvoja rezistencije na lekove. Iz ovih razloga, potrebno je u ranoj fazi otkrića leka predvideti da li je potencijalni lek supstrat za Pgp, idealno i pre same sinteze. U tu svrhu, tokom poslednje decenije razvijen je veliki broj računarskih modela koji omogućavaju predviđanje transporta posredstvom Pgp-a samo na osnovu hemijske strukture. U ovom radu prikazan je pregled različitih pristupa koji su korišćeni u razvoju modela, razmotrene su njihove prednosti i nedostaci, kao i faktori koji u najvećoj meri utiču na pouzdanost predviđanja. Polispetsificnost ovog transportera predstavlja značajan izazov za većinu metoda računarske hemije. Ipak, dostignut nivo tačnosti modela koji su prikazani u literaturi ukazuje na činjenicu da oni mogu doprineti racionalizaciji procesa dizajniranja novih lekova. Šira dostupnost eksperimentalnih podataka, kao i kombinovanje različitih pristupa modelovanju transporta, mogu dodatno unaprediti postojeće modele.

Ključne reči: P-glikoprotein, računarski modeli, rezistencija, dizajn lekova.

1. Uvod

P-glikoprotein (Pgp) je transmembranski protein koji funkcionalno predstavlja efluksni transporter sposoban za prenos strukturno raznovrsnih supstrata kroz ćelijsku membranu, iz unutrašnjosti ćelije u ekstracelularnu sredinu. Pgp pripada filogenetski veoma staroj grupi ABC¹ transportera koji posreduju u aktivnom transmembranskom transportu supstrata, uz utrošak energije oslobođene hidrolizom adenzin-trifosfata (ATP) [1]. U humanom genomu identifikovano je 49 gena koji kodiraju ABC transportere [2], ali je najbolje proučen i funkcionalno najznačajniji predstavnik ove grupe P-glikoprotein.

Ključna karakteristika ovog transportera, koja je doprinela njegovom otkriću, karakterizaciji i imenovanju (P od permeabilnost), jeste sposobnost Pgp-a da utiče na prolazak lekova kroz ćelijske membrane [3]. Tokom prethodne četiri decenije istraživanja, utvrđeno je da Pgp transportuje veliki broj klinički važnih lekova i da značajno može uticati na njihovu farmakokinetiku i efikasnost. Visoki nivoi ekspresije Pgp-a u enterocitima, na kanalikularnim površinama hepatocita i kapilarnom endotelu krvno-moždane barijere, sugerišu da je Pgp važna komponenta odbrane tkiva od ksenobiotika. Ova fiziološka funkcija Pgp-a može biti odgovorna za nisku bioraspoloživost lekova, njihovu ograničenu distribuciju u određena tkiva, a može predstavljati i molekularnu osnovu interakcije između lekova [4–7]. Sa aspekta efikasnosti lekova, prekomerna ekspresija Pgp-a u maligno transformisanim ćelijama predstavlja jedan od značajnih mehanizama razvoja rezistencije na antitumorske lekove i formiranja multirezistentnog (engl. *multiple drug resistant*, MDR) fenotipa tumorskih ćelija [8–10].

Prepoznavanje uticaja Pgp-a na farmakokinetiku lekova i njegovog značaja u razvoju rezistencije na antineoplastike ukazalo je na neophodnost razmatranja transporta lekova-kandidata posredstvom Pgp-a već u ranim fazama otkrića i razvoja [11]. Regulatorne agencije u Americi i Evropi zahtevaju karakterizaciju interakcije novih lekova sa nizom membranskih transportera, kao i ispitivanje uticaja afiniteta za transportere na eventualne interakcije između lekova [12]. Podložnost transportu od strane Pgp-a posebno je značajno uzeti u obzir u okviru programa otkrića novih antitumorskih jedinjenja. Danas je dostupan veći broj racionalno dizajniranih, selektivnih inhibitora Pgp-a [13], za koje se očekivalo da će, u kombinovanoj terapiji, doprineti lečenju kancera sa MDR fenotipom kroz povećanje efikasnosti dostupnih antitumorskih lekova koji su supstrati za ovaj transporter. Međutim, u kliničkim ispitivanjima ovi lekovi se za sada nisu pokazali kao uspešni [14,15]. Stoga je, paralelno sa istraživanjem alternativnih pristupa prevazilaženju rezistencije [16], u okviru dizajna

1

Od engleskog *ATP-binding cassette* (ABC).

novih antitumorskih lekova potrebno težiti ka minimizaciji rizika da novi lek bude supstrat za Pgp [17].

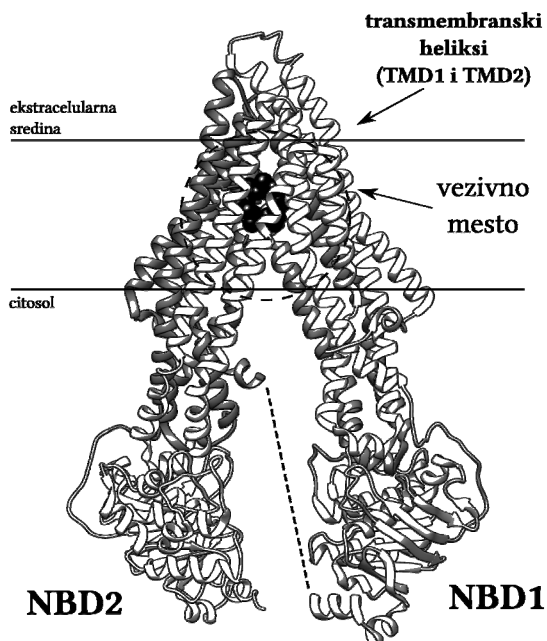
S obzirom da su strukturne modifikacije leka-kandidata u fazi razvoja leka materijalno i vremenski veoma skupe, određivanje mogućnosti interakcije sa Pgp-om treba izvršiti u ranim fazama otkrića potencijalnih kandidata [18]. Iako su razvijeni pristupi koji omogućavaju pouzdanu i brzu *in vitro* karakterizaciju interakcije novosintetisanih jedinjenja sa Pgp-om [19,20], računarski prediktivni modeli imaju tu prednost što ne zahtevaju dostupnost sintetisane supstance. Kao takvi, pouzdani računarski modeli za predviđanje transporta P-glikoproteinom mogu se efikasno integrisati u savremene protokole dizajniranja molekula primenom računarskih metoda [21]. Njihova predviđanja mogu doprineti eliminaciji delova kolekcije virtuelnih struktura i predstavljati osnovu za izbor određenih jedinjenja koja bi prioritarno bila biološki testirana u cilju evaluacije interakcije sa Pgp-om. Interpretacija uspostavljenih i validiranih modela takođe može pružiti racionalnu osnovu za modifikacije strukture u cilju smanjenja njihovog afiniteta za Pgp. Na taj način, komplementarno sa *in vitro* metodama testiranja, *in silico* modeli imaju značajan potencijal u racionalizaciji procesa otkrića novih lekova kroz brzu selekciju jedinjenja sa optimalnim karakteristikama [22–24].

Ovaj članak predstavlja pregled istraživanja u oblasti razvoja računarskih modela za predviđanje transporta Pgp-om, objavljenih u poslednjih 10 godina. Cilj ovog rada je da istakne najznačajnije faktore koji utiču na pouzdanost razvijenih modela i pruži osvrt na prednosti i nedostatke različitih pristupa modelovanju interakcije lekova i Pgp-a. U tom smislu, razmatrani su aspekti primenljivosti modela u racionalnom dizajniranju novih lekova, ograničenja postojećih modela i mogućnosti za dalje unapređenje njihove pouzdanosti.

2. Supstratna polispecifičnost Pgp-a kao izazov u uspostavljanju računarskih modela

Humani P-glikoprotein sadrži približno 1.280 aminokiselina, čija je strukturna organizacija slična svim transporterima ABC familije. Kristalna struktura humanog Pgp-a nije dostupna, ali je 2009. godine rešena kristalna struktura mišjeg Pgp-a [25,26], koja predstavlja prvu strukturu ABC transportera eukariota rezolucije ispod 4 Å. Kako humani i mišji Pgp odlikuje sličnost sekvenci od 87%, ova kristalna struktura pružila je jasan uvid u njegovu strukturnu organizaciju (Slika 1). Pgp je organizovan u 4 domena: svaki od dva transmembranska domena (TMD) čini 6 transmembranskih heliksa, dok se sa citoplazmatske strane nalaze dva nukleotid-vezujuća domena (engl. *nucleotide-binding domains*, NBD), koja vezuju ATP i igraju ključnu ulogu u prevođenju hemijske energije u pokrete proteina, neophodne za translokaciju supstrata. Supstrati se vezuju u prostranu unutrašnju šupljinu Pgp-a, koju formiraju dva TMD. Vezivna šupljina

locirana je u ravni lipidnog dvosloja i ima zapreminu od približno 6.000 \AA^3 . U zatvorenoj konformaciji proteina, vezivna šupljina otvorena je ka unutrašnjosti ćelije.



Slika 1. Struktura mišjeg P-glikoproteina (PDB ID: 4M2T), sa pretpostavljenim položajem u ćelijskoj membrani.

Figure 1. Structure of murine P-glycoprotein (PDB ID: 4M2T), with its putative localization in the cell membrane.

Pretpostavljeni mehanizam kojim Pgp transportuje supstrate obuhvata nekoliko koraka [27]. U prvom koraku neophodno je da supstrat pređe u unutrašnju stranu lipidnog dvosloja membrane, gde može doći do njegovog prepoznavanja od strane Pgp-a. U sledećem koraku, transporter preuzima supstrat nedovoljno definisanim putem, nakon čega se upostavljaju interakcije supstrata sa aminokiselinama unutrašnje šupljine Pgp-a. Važnu ulogu u prepoznavanju supstrata mogu imati i konstituenti ćelijske membrane, odnosno složene interakcije između lipida membrane, supstrata i transportera [28,29]. Da bi nakon vezivanja supstrata došlo do transporta, neophodno je da svaki NBD veže po jedan molekul ATP-a, što pokreće konformacionu promenu kojom Pgp prelazi iz konformacije otvorene ka unutrašnjosti ćelije u konformaciju u kojoj je unutrašnja šupljina otvorena ka ekstracelularnoj sredini i omogućava disocijaciju supstrata.

Iako Pgp može da transportuje strukturno raznovrsna jedinjenja, važno je naglasiti da interakcija supstrata i transportera nije nespecifična, već polispecifična, na šta ukazuju brojne studije u kojima su prikazane varijacije od nekoliko redova veličine u afinitetu različitih supstrata za Pgp [30]. Prostranost unutrašnje šupljine ukazuje na mogućnost postojanja većeg broja vezivnih mesta; postoje eksperimentalni dokazi da Pgp istovremeno može da veže dva različita supstrata [31]. Tačan broj vezivnih mesta na transporteru nije jasno definisan: u različitim studijama sugerisano je postojanje od 2 do 7 različitih vezivnih mesta, koja međusobno stupaju u složene alosterne interakcije [32–35]. Po savremenim tumačenjima, Pgp ne poseduje jasno definisana, prostorno razdvojena vezivna mesta, već jednu prilagodljivu vezivnu regiju sa oblastima za koje pojedini supstrati pokazuju izražen afinitet [36,37]. Novije biohemijske studije, kao i simulacije molekularne dinamike, ukazuju da u supstratnoj polispecifičnosti Pgp-a ključnu ulogu ima i izražena fleksibilnost transportera [38].

Analiza fizičko-hemijskih karakteristika poznatih Pgp supstrata ne ukazuje na postojanje jasnog profila tipičnog jedinjenja koje Pgp transportuje. Do danas okarakterisani supstrati su većinom relativno velike organske molekule, aromatičnog karaktera, sa baznim centrima i pozitivnim naelektrisanjem pri fiziološkoj pH. Ipak, u Pgp supstrate ubrajaju se i molekule čije mase variraju od 200 do 1.900 Da, koje imaju amfifilnu prirodu, acikličan karakter, alifatične molekule, kao i jedinjenja sa negativnim naelektrisanjem pri fiziološkoj pH, iako je njihov transport manje efikasan [39].

Skup saznanja o strukturi vezivnog mesta Pgp-a, pretpostavljenom mehanizmu transporta i raznovrsnosti supstrata ukazuju na nekoliko ključnih izazova koje je potrebno uzeti u obzir prilikom razvoja modela za predviđanje interakcije sa ovim transporterom. Prvo, transport ne zavisi samo od interakcije jedinjenja sa Pgp-om. Važna komponenta transporta jeste pasivna raspodela supstrata u lipidnom dvosloju: jedinjenja sa visokom pasivnom permeabilnošću mogu da prezasiće transportni kapacitet Pgp-a, dok jedinjenja koja se kratko zadržavaju u membrani imaju manju verovatnoću da budu preuzeta od strane transportera. Efektivno, to znači da izostanak transporta u *in vitro* testu ne znači nužno da dato jedinjenje ne može da stupa u interakciju sa Pgp-om na molekulskom nivou. Nadalje, za razliku od modeliranja odnosa strukture i aktivnosti jedinjenja koja se vezuju za isto vezivno mesto, Pgp ne poseduje jedno, već veći broj slabo definisanih vezivnih mesta. Konačno, visok stepen fleksibilnosti proteina, prilagodljivost različitim supstratima i alosterne komunikacije između vezivnih mesta uslovljavaju činjenicu da jedna, statična struktura Pgp-a ima ograničenu primenljivost u predviđanju interakcije različitih jedinjenja sa transporterom. U cilju prevazilaženja ovih izazova, korišćeni su različiti pristupi u procesu razvoja modela: uspostavljanje više modela koji se objedinjuju u ansambl, primena nelinearnih regresionih metoda, integrisanje fleksibilnosti proteina u predviđanje interakcije sa supstratima, i drugi pristupi koji će detaljnije biti opisani u odeljcima 4–6.

3. Priprema setova podataka u razvoju računarskih modela

Prvi korak u razvoju računarskih modela za predviđanje transporta Pgp-om jeste prikupljanje podataka o supstratima i nesupstratima ovog transportera. Različite metode eksperimentalne karakterizacije transporta, međutim, pružaju različitu prirodu informacije o tačnom vidu interakcije datog jedinjenja i Pgp-a. Testovi koji su najčešće opisani u literaturi mogu se podeliti u [40]: testove transcelularnog transporta, testove akumulacije ili efluksa, testove stimulacije ATP-azne aktivnosti i *in vivo* testove na *knockout* životinjama. Važno je imati u vidu da nijedan od ovih testova ponaosob ne pruža nedvosmislen dokaz aktivnog transporta jedinjenja od strane Pgp-a. Primera radi, u slučaju supstrata visoke pasivne permeabilnosti, test transcelularnog transporta može dati lažno negativan rezultat, posebno pri višim koncentracijama ispitivanog jedinjenja [41,42]. S druge strane, većina supstrata daće pozitivan rezultat testa stimulacije ATP-azne aktivnosti, ali pozitivan rezultat ovog testa daju i pojedini inhibitori Pgp-a [43], dok drugi supstrati u visokim koncentracijama inhibiraju ATP-aznu aktivnost [44]. Zbog toga je za definitivnu karakterizaciju interakcije jedinjenja sa Pgp-om najčešće neophodno upotrebiti više komplementarnih testova [45].

U kontekstu različite pouzdanosti klasifikacije jedinjenja u zavisnosti od tipa eksperimentalnih podataka, nekoliko autora predložilo je kriterijume koji omogućavaju uniformnu procenu nivoa dokaza koje dostupni podaci pružaju [19,40,46]. Usvajanje takvih kriterijuma prilikom prikupljanja eksperimentalnih podataka iz literature posebno je važno usled činjenice da postoji veliki broj primera jedinjenja koja su, primenom različitih testova, klasifikovana i kao supstrati i kao nesupstrati. U našim istraživanjima, usvajanje kriterijuma za procenu pouzdanosti dostupnih podataka omogućilo je formiranje setova visoke konzistentnosti [47]. Kao što je prikazano u Tabeli I, definisanjem hijerarhije pouzdanosti određenih testova moguće je izvršiti klasifikaciju jedinjenja na osnovu najvišeg dostupnog nivoa dokaza; u onim slučajevima kada su dostupni podaci suprotstavljeni, a odlikuje ih isti nivo pouzdanosti, dato jedinjenje se može isključiti iz seta u cilju izbegavanja eventualne greške. Takođe, u našem radu, samo nivo dokaza A i B (Tabela I) smatran je adekvatnim za klasifikaciju jedinjenja kao supstrata.

Tabela I Primer kriterijuma za klasifikaciju pouzdanosti eksperimentalnih podataka o transportu jedinjenja P-glikoproteinom, prilagođen iz reference [47].

Table I Example of criteria used in evaluating the reliability of P-glycoprotein transport assay data, adapted from reference [47].

Nivo dokaza	Dostupni eksperimentalni podaci
A (najviši)	<p><i>Konsenzus rezultata:</i></p> <p>(1) <i>in vitro</i> studija transcelularnog transporta sprovedenih na transficiranim ćelijskim linijama i <i>in vivo</i> studija distribucije u transgenim životinjama bez i sa funkcionalnim P-gp; <i>ili</i></p> <p>(2) tri studije: <i>in vitro</i> studije transcelularnog transporta, stimulacije ATP-azne aktivnosti i testa akumulacije sa kalcein-AM probom</p>
B	<p>(1) jedna ili više <i>in vitro</i> studija transcelularnog transporta sprovedena na transficiranim ćelijskim linijama, uz netransfektovane ćelije kao kontrolu; <i>ili</i></p> <p>(2) konsenzus rezultata dve studije iz kategorije C, koje ne daju nivo dokaza A (npr. transport kroz Caco-2 ćelije i studija na transgenim miševima); <i>ili</i></p> <p>(3) konsenzus rezultata dva <i>in vitro</i> testa iz kategorije A-2</p>
C	<p>(1) polarizovan transport kroz ćelijske linije koje prekomerno ekspimiraju P-gp, ali i druge transportere (npr. Caco-2); <i>ili</i></p> <p>(2) stimulacija P-gp ATP-azne aktivnosti; <i>ili</i></p> <p>(3) <i>in vivo</i> studija distribucije u transgenim životinjama bez i sa funkcionalnim P-gp; <i>ili</i></p> <p>(4) studije akumulacije ili efluksa sprovedene korišćenjem membranskih vezikula sa ekspimiranim P-gp; <i>ili</i></p> <p>(5) studije rezistencije na citotoksične efekte na ćelijskim linijama MDR fenotipa.</p>
D (najniži)	<p>Podaci iz preglednih i stručnih radova, gde originalne studije nisu navedene ili dostupne.</p>

Dodatni faktori koje je potrebno uzeti u obzir prilikom formiranja seta podataka jesu hemijska raznovrsnost jedinjenja i relativna zastupljenost supstrata i nesupstrata. Najveći setovi korišćeni za uspostavljanje transportnih modela posredstvom Pgp-a uglavnom sadrže oko 300 jedinjenja [48], što je relativno mali broj koji ne obezbeđuje

potpunu pokrivenost hemijskog prostora od značaja za medicinsku hemiju. Kvalitet eksperimentalnih podataka i veličina seta često su suprotstavljeni faktori prilikom formiranja seta podataka; prvi faktor odlučujuće utiče na pouzdanost, ali je drugi faktor presudan za domen primenjivosti modela. Šire prihvatanje današnjih kriterijuma za potpunu karakterizaciju interakcije sa Pgp-om započelo je tek početkom ovog veka, pa je i literaturna dostupnost kvalitetnih podataka ograničena. U tom smislu, jedan od pristupa može biti i uspostavljanje modela koji su primenjivi u ograničenom delu hemijskog prostora (lokalni modeli) ali koji u okviru svog domena primenjivosti pokazuju značajnu pouzdanost [22].

Konačno, u literaturi su daleko prisutnije publikacije koje opisuju identifikaciju supstrata za Pgp, nego one koje dokumentuju karakterizaciju nesupstrata. Ova činjenica otežava formiranje setova u kojima je broj supstrata i nesupstrata uravnotežen, što je važan aspekt u razvoju klasifikacionih modela, jer setovi u kojima svaka od klasa nije približno jednako zastupljena mogu dovesti do razvoja modela sa lošim prediktivnim karakteristikama [49].

4. Modeli zasnovani na molekulskim deskriptorima

Najveći broj u literaturi dostupnih modela za predviđanje transporta Pgp-om pripada grupi binarnih klasifikacionih modela, koji su uspostavljeni primenom molekulskih deskriptora i nelinearnih regresionih metoda. Kao što je prikazano u Tabeli II, ne postoje velika odstupanja u prosečnoj tačnosti predviđanja različitih modela, koja je u proseku 80-85%. Iako su pojedini autori pokazali da se različitim kombinacijama deskriptora i regresionih metoda uspostavljaju modeli značajno različitih performansi [50], retrospektivna analiza literaturnih modela ukazuje na to da se većinom prikazanih metodologija može postići slična tačnost predviđanja. Izuzetak jesu linearni modeli, koji se u slučaju klasifikacije Pgp supstrata veoma retko koriste.

Tabela II Pregled odabranih modela za predviđanje transporta P-glikoproteinom, uspostavljenih korišćenjem molekulskih deskriptora i različitim regresionim metodama.

Table II Overview of selected models for predicting transport by P-glycoprotein, based on the use of molecular descriptors and various regression methods.

Autori	Veličina seta^a	Deskriptori finalnog modela	Regresioni metod^b	Performanse na setu za testiranje^c	Ref.
Xue et al. (2004)	116 S 85 NS	22 elektrotopološka deskriptora	<u>SVM</u> k-NN ANN DT	Se = 81,2% Sp = 79,2% Acc = 79,4%	[51]
de Cerqueira Lima et al. (2006)	108 S 87 NS	173 deskriptora atomskih parova	<u>SVM</u> k-NN DT binarni QSAR	Se = 78% Sp = 84% Acc = 81%	[52]
Cabrera et al. (2006)	113 S 90 NS	6 deskriptora topoloških podstruktura	MLR	Se = 82,73% Sp = 77,77% Acc = 80,5%	[53]
Huang et al. (2007)	113 S 90 NS	7 molekulskih deskriptora	<u>PS-SVM</u> MLR	Se = 100% Sp = 86% Acc = 93%	[54]
Demel et al. (2010)	343 S 1534 NS	11 molekulskih deskriptora	RuleFit model	Se = 81% Sp = 98%	[55]
Wang et al. (2011)	206 S 126 NS	23 molekulska deskriptora	<u>SVM</u>	Se = 96% Sp = 73% Acc = 88%	[56]
Broccatelli (2012)	110 S 77 NS	3 molekulska deskriptora	<u>GA-RF</u> k-NN SVM NB	Se = 80% Sp = 86% Acc = 84%	[57]
Levatić et al. (2013)	448 S 486 NS	183 2D deskriptora	SVM	Acc = 86%	[58]
Li et al. (2014)	423 S 399 NS	13 fizičko-hemijskih, 43 topološka deskriptora i ECFC_10 molekulski otisak prsta	NB	Se = 89,9% Sp = 74,7% Acc = 83,5%	[59]
Erić et al. (2014)	159 S 151 NS	24 molekulska deskriptora	<u>ANN ansambl</u> <u>SVM ansambl</u>	Se = 82% Sp = 82% Acc = 82%	[47]

a Korišćene skraćenice: S – supstrati, NS – nesupstrati;

b Ukoliko je u radu poređeno nekoliko regresionih metoda, podvučena je metoda koja je dala najbolje rezultate. Korišćene skraćenice: SVM – *support vector machines*, k-NN – metod najbližih suseda, ANN – veštačke neuronske mreže, DT – drva odluke, MLR – multipla linearna regresija; PS – algoritam jata čestica (engl. *particle swarm*), GA – genetski algoritam, RF – *random forest*, NB – naivni Bejesov klasifikator; **c** Statistički parametri predviđanja modela: Se – senzitivnost, Sp – specifičnost, Acc – tačnost.

Najuočljivije razlike između novijih i starijih modela jesu setovi korišćeni u njihovom razvoju. U tom kontekstu, primetan je trend u novijim publikacijama da se poseban akcenat stavlja na veličinu i raznovrsnost seta za uspostavljanje modela, kao i na konzistentnost eksperimentalnih podataka. U nekoliko skorijih publikacija opisani su setovi značajne veličine i raznovrsnosti. Demel i saradnici [55] iskoristili su podatke o citotoksičnosti eksperimentalnih jedinjenja jedne farmaceutske kompanije na ćelijskoj liniji koja prekomerno eksprimira Pgp, za kreiranje seta od 1877 jedinjenja. Levatić i saradnici [58] opisali su sličan pristup, korišćenjem podataka o citotoksičnosti na 60 različitih ćelijskih linija (NCI60) koje uniformno prikuplja američki Nacionalni institut za kancer, u okviru svog Programa razvoja lekova [60]. Obe grupe autora su pretpostavile da u slučaju Pgp supstrata postoji inverzan odnos između osetljivosti ćelija na citotoksične efekte jedinjenja i nivoa ekspresije Pgp-a u datoj ćelijskoj liniji. Važan aspekt ovih setova jeste činjenica da pokazuju minimalno preklapanje sa postojećim setovima podataka i time doprinose istraživanju afiniteta jedinjenja za Pgp u okviru novog hemijskog prostora. Ipak, na konzistentnost seta uspostavljenog korišćenjem isključivo podataka o citotoksičnosti, u velikoj meri utiču pasivna permeabilnost jedinjenja, kao i potencijalno zanemareni drugi mehanizmi rezistencije na citotoksične efekte. Li i saradnici [59] primenili su drugi pristup, prikupljanjem podataka iz 517 publikacija za 822 jedinjenja; za razliku od kriterijuma pouzdanosti koje smo prethodno opisali u odeljku 3, koji podrazumeva i isključivanje jedinjenja sa suprotstavljenim podacima, autori su koristili konsenzus klasifikaciju, svrstavajući dato jedinjenje u klasu prema najvećem broju rezultata, nezavisno od njihove pouzdanosti.

Pored seta podataka koji je značajan faktor za preciznost predviđanja, složenost i interpretabilnost finalnih modela važne su karakteristike po kojima se dostupni modeli razlikuju. Uključivanjem većeg broja deskriptora u model moguće je, do određene granice, poboljšati njegove prediktivne karakteristike, ali korišćenje modela sa velikim brojem deskriptora otežava identifikaciju najznačajnijih strukturnih karakteristika, čija bi modifikacija mogla da doprinese smanjenju afiniteta jedinjenja za Pgp. Postoji nekoliko pristupa kojima se može poboljšati interpretabilnost modela razvijenih nelinearnim metodama. U našim ranijim istraživanjima pokazano je da implementacije inovativnih algoritama omogućavaju uvid u relativnu značajnost i prirodu uticaja odabranih molekulskih deskriptora na fenomen koji se modeluje [61]. Ovaj i slični

pristupi [62,63] značajno povećavaju primenljivost modela, jer pružaju medicinskom hemičaru smernice o najefektivnijim putevima modifikacije strukture.

Pregled deskriptora koji su korišćeni u dostupnim računarskim modelima za predviđanje transporta Pgp-om ukazuje na složenost odnosa između strukture supstrata i njihovog afiniteta za Pgp. Primetno je da su u većini modela značajni deskriptori veličine, lipofilnosti i oblika molekule. Primera radi, od 7 molekulskih deskriptora u modelu Huang-a i saradnika [54], 4 opisuju upravo ove karakteristike: molekularnu težinu (MW), izračunati particioni koeficijent oktanol-voda (ClogP), broj prstenova u strukturi (NR) i ukupnu polarnu površinu jedinjenja (TPSA). Drugu važnu grupu deskriptora koji su značajni u dostupnim modelima čine deskriptori koji opisuju brojnost i raspored donora i akceptora vodoničnih veza, kao i njihovu jačinu. Od preko 10 modela u radu Broccattelli-ja [57], u većini su najznačajniji bili DRDRDO i DRACDO deskriptori, koji opisuju dimenzije najvećeg trougla koji definišu dve hidrofobne farmakoforne tačke i jedan donor vodonične veze, odnosno jedna hidrofobna tačka, jedan donor i jedan akceptor vodonične veze. Ove činjenice ukazuju da model za predviđanje interakcije sa Pgp-om istovremeno mora da sadrži deskriptore koji opisuju sposobnost molekule da se preraspodeli i ostane u lipidnom dvosloju, kao i deskriptore koji opisuju postojanje i raspored delova strukture koji mogu da stupe u specifične interakcije sa vezivnim mestima na transporteru.

Kao alternativu računarskim modelima sa većim brojem molekulskih deskriptora, nekoliko autora predložilo je jednostavna pravila, koja omogućavaju identifikaciju jedinjenja koja imaju visoku verovatnoću da budu supstrati za Pgp. Predložena pravila zbirno su prikazana u Tabeli III. Jasna prednost ovog pristupa je u činjenici da, nalik na slična empirijska pravila kao što je „pravilo petice“ Lipinskog [64], ovakva pravila je lako inkorporirati u proces otkrića novih lekova. Ipak, većina objavljenih pravila nije validirana na eksternim podacima, a njihova jednostavnost za posledicu ima i nižu tačnost predviđanja. Primera radi, Li i saradnici primenili su pravila Didziapetrisa na njihov set podataka i ustanovili da je ovim pravilima moguće identifikovati samo 145 od 423 supstrata za Pgp [59]. Iako je njihova jednostavnost značajna prednost, korišćenje isključivo ovog pristupa u predviđanju interakcije sa Pgp-om nosi sa sobom rizik od brojnih lažno negativnih rezultata.

Tabela III Pregled predloženih pravila za jednostavnu identifikaciju potencijalnih supstrata P-gp.**Table III** Overview of simple rule-based models for identifying potential P-gp substrates.

Autori	Pravilo	Performanse	Ref.
Didziapetris et al. (2003)	P-gp supstrati: (a) suma broj atoma azota i kiseonika ≥ 8 (b) molekulska masa > 400 (c) pKa najkiselije grupe > 4 P-gp nesupstrati: 1. suma broj atoma azota i kiseonika ≤ 4 2. molekulska masa < 400 3. pKa najbaznije grupe < 8	?	[46]
Gombar et al. (2004)	P-gp supstrati: <ul style="list-style-type: none"> vrednost molekulskog elektrotopološkog stanja: MolES > 110 P-gp nesupstrati: <ul style="list-style-type: none"> MolES < 48 	Acc = 86,2%	[65]
Gleeson (2008)	P-gp supstrati: <ul style="list-style-type: none"> molekulska masa > 400 izračunati logP > 4 bazno ili neutralno jedinjenje 	?	[66]
Levatić et al. (2013)	P-gp supstrati: <ul style="list-style-type: none"> broj atoma > 35 specifična zapremina $< 7,3 \text{ \AA}^3/\text{atomu}$ 	Acc = 74,3%	[58]

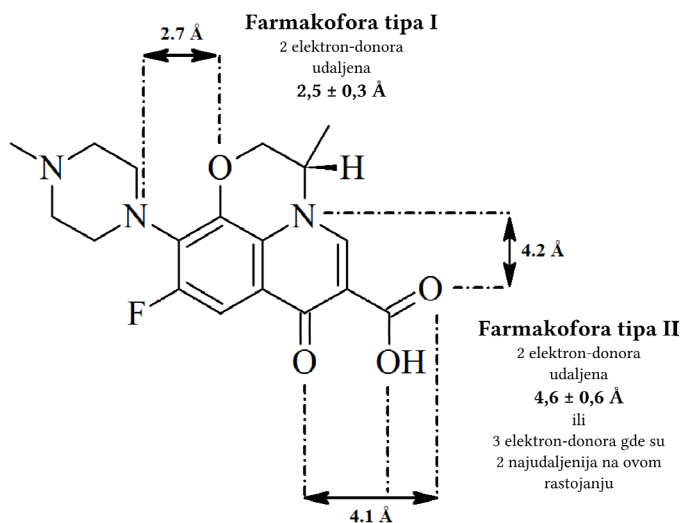
5. Modeli zasnovani na farmakofornim hipotezama

Molekulska struktura jedinjenja može se predstaviti kao niz apstraktnih tačaka, sa definisanim rasporedom u prostoru, koje karakteriše mogućnost specifičnog učešća u intermolekulskim interakcijama. Taj skup tačaka najčešće čine hidrofobni i aromatični centri, donori i akceptori vodoničnih veza, i centri pozitivnog i negativnog naelektrisanja. Zajedno sa njihovim rasporedom u prostoru, ovaj skup tačaka predstavlja farmakoforni prikaz molekule. Superponiranjem niza farmakofora, izvedenih iz bioaktivnih konformacija aktivnih molekula, moguće je formulisati farmakofornu hipotezu o najvećem zajedničkom skupu strukturnih elemenata i njihovom prostornom odnosu, koji je neophodan za upostavljanje interakcije sa datim ciljnim mestom dejstva [67].

Uspostavljanje farmakofornog modela supstrata za Pgp znatno otežava više faktora. Kao što je opisano u odeljku 2, Pgp nema jasno definisano vezivno mesto za sve supstrate koje transportuje, tako da je validnost uspostavljanja jednog farmakofornog modela diskutabilna. Za najveći broj Pgp supstrata nije poznata

bioaktivna konformacija, niti su šire dostupni podaci o kompeticiji u vezivanju sa drugim jedinjenjima koji bi ukazali na vezivanje za istu regiju vezivne šupljine Pgp-a. Nadalje, formulisanje farmakoforne hipoteze zahteva superponiranje (preklapanje) farmakofora većeg broja aktivnih jedinjenja. Uspešnost ovog koraka u razvoju modela zahteva visok stepen hemijske sličnosti razmatranih struktura, tako da rezultujuće modele najčešće odlikuje primenljivost u ograničenom delu hemijskog prostora. Konačno, činjenica da dato jedinjenje zadovoljava farmakofornu hipotezu ne znači nužno i da će efikasno biti transportovano posredstvom Pgp-a; farmakoforni modeli zanemaruju uticaj permeabilnosti jedinjenja na transport i isključivo odslikavaju mogućnost interakcije sa vezivnim mestima Pgp-a.

Najraniji opšti farmakoforni model supstrata P-glikoproteina predložila je Anna Seelig 1998. godine [68]. Model je uspostavljen analizom trodimenzionalnih struktura 75 supstrata, 18 induktora i 7 nesupstrata Pgp-a. Prema ovom modelu, ilustrovanom na Slici 2, najveću verovatnoću da budu supstrati za Pgp imaju jedinjenja koja sadrže jednu „farmakofornu jedinicu“ tipa I ili jednu jedinicu tipa II, pri čemu verovatnoća raste sa jačinom i brojnošću donora elektrona koji čine farmakoforu. Iako je ovaj model razvijen korišćenjem relativno malog broja struktura, naš rad na razvoju modela za transport Pgp-om ukazao je da trodimenzionalni deskriptori izvedeni iz predloženih farmakofora mogu značajno unaprediti predviđanja globalnih modela [47].



Slika 2. Ilustracija farmakofora P-gp supstrata, predloženih u referenci [68]. Kao primer supstrata ilustrovan je levofloksacin.

Figure 2. A schematic representation of the pharmacophoric patterns of P-gp substrates, proposed in [68]. Levofloxacin is shown as an example substrate.

Većina drugih farmakofornih modela u literaturi predložena je za specifična, pretpostavljena vezivna mesta Pgp-a [69–71]. Do sada predloženi globalno primenjivi farmakoforni modeli zasnivaju se na pristupu korišćenja skupa (ansambla) velikog broja pojedinačnih farmakofora. Penzotti i saradnici [72] analizirali su set od 76 supstrata i 68 nesupstrata, mapirajući za svako jedinjenje više farmakofora od po 2 do 4 farmakoforne tačke. Statističkom analizom autori su identifikovali 100 najinformativnijih farmakofora, pri čemu je preko polovine činila kombinacija jednog donora i jednog akceptora vodonične veze, sa jednim ili dva hidrofobna centra. Supstratima su smatrane one strukture koje se podudaraju sa najmanje 20 od 100 farmakofora ansambla, pri čemu je ovaj vid klasifikacije ispravno predvideo transport 63% jedinjenja iz seta za testiranje.

Li i saradnici [73] su sličnim pristupom razvili drvo odluke (engl. *decision tree*), bazirajući svako grananje u ovom modelu na podudarnosti sa jednom od 9 farmakofora. Set koji je korišćen za uspostavljanje modela sastojao se od 91 supstrata i 72 nesupstrata. Ovakvim integrisanjem više farmakofornih modela, postignuta je ukupna tačnost predviđanja od 87,6% na eksternom setu za testiranje, koji je sadržao 97 jedinjenja.

Opisani su i pristupi koji podrazumevaju kombinovanje fizičko-hemijskih sa farmakofornim deskriptorima koji se ne zasnivaju na preklapanju struktura, već na kvantifikaciji rasprostranjenosti oblasti koje odgovaraju određenom tipu farmakoforne tačke [74].

Domen primenjivosti i tačnost predviđanja većine objavljenih farmakofornih modela značajno je niži od modela zasnovanih na molekulskim deskriptorima. Farmakoforne hipoteze predložene u okviru ovih modela karakterišu značajne razlike, čije postojanje sprečava formulisanje globalno validne farmakofore i još jednom upućuje na polispecifičnost Pgp-a [22,75]. Upravo ova karakteristika Pgp-a ograničava mogućnost primene farmakofornog modeliranja, što je jedan od verovatnih uzroka relativno slabe zastupljenosti ove grupe modela u novijoj literaturi.

6. Modeli zasnovani na strukturi Pgp-a

U periodu do 2009. godine, interesovanje za strukturu P-glikoproteina u atomskoj rezoluciji dovelo je do razvoja većeg broja molekulskih modela zasnovanih na sličnosti sekvenci između humanog Pgp-a i bakterijskih ABC transportera, čije su kristalne strukture bile dostupne [76–79]. Usled relativno niske identičnosti sekvenci, međutim, ovi modeli nisu mogli biti pouzdano primenjeni u predviđanju interakcije malih organskih molekula i Pgp-a [80]. Značajan pomak u ovom smislu omogućilo je rešavanje kristalne strukture mišjeg Pgp-a, u apo obliku i kompleksu sa dva

stereoizomera makrocikličnog inhibitora QZ59S [25]². Iako su objavljene strukture relativno niske rezolucije (3,80—4,40 Å), visok stepen sličnosti sekvenci humanog i mišjeg Pgp-a omogućio je razvoj preciznijih modela zasnovanih na homologiji, što je uticalo na povećano interesovanje za primenu metoda molekuskog dokinga u proučavanju interakcije Pgp-a i njegovih supstrata [81].

Dostupnost ovih struktura i modela doprinelo je racionalizaciji strukturne osnove različitih eksperimentalnih zapažanja. Više autora primenilo je molekulski doking u predviđanju strukture kompleksa Pgp-a i jedinjenja koja se za transporter vezuju [82–87]. Dobra ilustracija ovog pristupa jeste kombinovana studija mutageneze i molekuskog dokinga koju su predstavili Chufan i saradnici [88]. Na osnovu položaja QZ59S-SSS u kristalnoj strukturi Pgp-a, molekuskog dokinga tarikvidara, valinomicina i ciklosporina A, kao i uzimanjem u obzir dostupnih eksperimentalnih podataka, autori su odabrali nekoliko aminokiselina u strukturi Pgp-a koje su podvrgli mutagenezi. Na osnovu vezivanja izabranih struktura za mutirane forme, autori su pokazali da gubitak afiniteta za prvobitno mesto vezivanja ne dovodi do izostanka vezivanja izabranih jedinjenja za Pgp, već da se ona u mutiranim formama transportera vezuju za sekundarna mesta. Time je potvrđena hipoteza o postojanju više potencijalnih vezivnih mesta na transporteru. Autori su takođe zaključili da, iako dokingom nije moguće tačno predvideti mesto vezivanja supstrata, različiti mogući položaji liganda u vezivnoj šupljini, dobijeni dokingom, mogu biti korisni u daljim studijama.

Više autora opisalo je primenu simulacija molekulske dinamike (MD) u izučavanju interakcije supstrata i modulatora sa P-glikoproteinom. Ferreira i saradnici [89] rafinirali su model humanog Pgp-a, zasnovanog na strukturi mišjeg, primenom relativno dugih simulacija MD (100 ns). Autori su ustanovili da je modeliranje nedostajućeg segmenta između NBD1 i TMD2, kao i adekvatno simuliranje lipidnog okruženja transportera od velikog značaja za izučavanje dinamike Pgp-a. Poređenjem dinamike supstrata i modulatora u kompleksu sa transporterom, autori su zaključili da u proseku modulatori ostvaruju brojnije interakcije sa vezivnim mestima od supstrata. U drugoj studiji, Prajapati i saradnici [90] su, analizirajući rezultate MD simulacija i proračuna slobodne energije, utvrdili da hidrofobne interakcije daju značajno veći doprinos energiji vezivanja u poređenju sa elektrostatskim, kao i da rigidne molekule pokazuju manju sklonost prilagođavanju šupljinama transportera, što ih čini lošijim supstratima za Pgp.

Iako simulacije MD pružaju jedinstven uvid u interakcije sa Pgp-om na atomskom nivou i u vremenskoj rezoluciji femtosekunde, njihova računarska zahtevnost čini ih nepraktičnim za rutinska predviđanja u dizajnu novih lekova. Molekulski doking je

2 Prvobitno objavljene strukture iz 2009. godine korigovane su od strane autora 2014. godine [26].

računarski značajno pristupačniji, pa je više autora istraživalo mogućnost predviđanja transporta Pgp-om pomoću ove metode. Dolghih i saradnici [91] izvršili su doking 126 jedinjenja u strukturu mišjeg Pgp-a i poredili rezultate dobijene pristupom u kome je protein bio rigidan sa pristupom gde su bočni lanci aminokiselina vezivnog mesta tretirani kao fleksibilni. Autori su ustanovili da je fleksibilnost od ključnog značaja za uspeh predviđanja kao i da se ovom metodom dobija kvalitativno slaganje između stepena transporta jedinjenja i energije vezivanja izračunate dokingom. Autori su takođe zaključili da su fizičko-hemijske karakteristike supstrata od većeg značaja za energiju vezivanja od interakcije sa specifičnim aminokiselinama. Do sličnih zaključaka u pogledu važnosti fleksibilnog dokinga došli su i drugi autori [92].

Ferreira i saradnici upotreбили su prethodno opisani rafinisani model Pgp-a u doking studiji, u okviru koje su proučavali razlike u predviđenom načinu i energiji vezivanja supstrata, nesupstrata i modulatora Pgp-a [93]. Koristeći AutoDock Vina softver, autori su predložili kriterijum po kome jedinjenja čija je doking energija veća od -7 kcal/mol najverovatnije predstavljaju nesupstrate Pgp-a. Poredeći položaje supstrata i modulatora Pgp-a, dobijene dokingom, autori su zaključili da se supstrati većinom lokalizuju u oblasti H- i R- vezivnih mesta [32], dok modulatori pokazuju veći afinitet ka dubljoj lokalizaciji u predelu preseka dva transmembranska domena. U sličnoj studiji, Zeino i saradnici [94] uporedili su rezultate dokinga 22 supstrata, 26 modulatora i 15 nesupstrata na modelu humanog i na kristalnoj strukturi mišjeg Pgp-a. Autori su pokazali da postoje statistički značajne razlike u energijama vezivanja supstrata, nesupstrata i modulatora, ali samo ukoliko se koristi model humanog Pgp-a.

Relativno mali broj jedinjenja koja su korišćena u doking studijama, nedostatak opsežnije validacije, niža tačnost predviđanja kao i veći računarski zahtevi čine modele zasnovane na strukturi Pgp-a manje pouzdanim i primenjivim od modela koji su zasnovani na molekulskim deskriptorima. Usled ove činjenice, dostupnost kristalne strukture mišjeg Pgp-a nije značajno doprinela uspešnosti računarskih predviđanja transporta P-glikoproteinom [48,81]. Ipak, metode bazirane na strukturi Pgp-a komplementarne su sa predviđanjima modela zasnovanim na molekulskim deskriptorima. Primer koji ilustruje ovu činjenicu je internet server za predviđanje interakcije sa Pgp-om, koji su razvili Bikadi i saradnici [95]. U predloženoj metodi koriste se vrednosti molekulskih deskriptora i prethodno uspostavljen SVM model da bi se predvideo transport priloženog jedinjenja, a zatim generiše moguća struktura kompleksa sa Pgp-om, primenom molekulskog dokinga.

Mešoviti pristupi u okviru kojih je moguće kombinovati predviđanja različitih metoda do danas nisu široko primenjivani u predviđanju transporta P-glikoproteinom. Ovakvi pristupi integrisanja različitih predviđanja pokazali su uspešnost u drugim poljima računarske hemije, kao što su virtuelni skrining [96] i inverzni virtuelni skrining [97], tako da je moguće da njihova primena u slučaju transporta Pgp-om doprinese

pouzdanosti postojećih modela. Bez obzira na nižu pouzdanost predviđanja, upotreba strukture Pgp-a može da pruži dodatan uvid u mehanizam transporta i interakcije datog jedinjenja i transporterera. Takav uvid može pružiti racionalnu strukturnu osnovu za modifikaciju strukture u cilju smanjenja njenog afiniteta za Pgp [98].

7. Zaključak

Pravovremeno predviđanje transporta posredovanog P-glikoproteinom ima veliki značaj u racionalnom otkriću novih lekova. Tačnost predviđanja literaturnih modela zasnovanih na raznovrsnim molekulskim deskriptorima dostigla je stepen koji omogućava relativno pouzdanu identifikaciju jedinjenja koja imaju veliku verovatnoću da predstavljaju supstrate za Pgp. Uspešnost razvoja novih modela u najvećoj meri zavisi od prikupljanja uniformnih eksperimentalnih podataka i dovoljne hemijske raznovrsnosti kreiranog seta, što može da obezbedi primenjivost modela u odgovarajućem delu hemijskog prostora. Farmakoforni modeli i novije studije koje koriste strukturu P-glikoproteina nemaju uporedivu tačnost predviđanja, ali omogućavaju ostvarivanje uvida u molekularnu osnovu interakcije supstrata sa vezivnim mestima na transporteru.

Analiza uspostavljenih modela sugerise da uspešnost predviđanja transporta P-glikoproteinom zavisi od adekvatnog modelovanja sposobnosti molekule da pređe u lipidni dvosloj i postojanja karakterističnih strukturnih elemenata koji omogućavaju interakciju sa vezivnom šupljinom transporterera. Čini se izvesnim da fizičko-hemijske karakteristike, pre nego postojanje specifične farmakofore, suštinski utiču na mogućnost transporta. To u velikoj meri otežava racionalno dizajniranje strukture koja neće biti supstrat P-glikoproteina, pa je predloženo da povećanje pasivne permeabilnosti za sada predstavlja najefikasniji način smanjenja podložnosti leka uticaju P-glikoproteina [99]. Ipak, razvoj metoda koje bi omogućile pouzdano predviđanje mesta za koje se supstrati vezuju za Pgp moglo bi da doprinese racionalnoj modifikaciji hemijskih struktura.

Unapređenje pouzdanosti postojećih modela biće moguće sa povećanom dostupnošću eksperimentalnih podataka visokog kvaliteta. Integrisanje *in silico* i *in vitro* metoda u objedinjene protokole omogućilo bi stalno unapređenje predviđanja računarskih modela, a istovremeno bi ograničilo broj neophodnih *in vitro* testova kroz prioritarno testiranje onih jedinjenja za koje se računarskim modelima predviđa da su najverovatniji (ne)supstrati [100]. Takođe, kombinovanje predviđanja različitih metoda ima potencijal da unapredi računarsku karakterizaciju interakcije sa Pgp-om i doprinese sticanju boljeg uvida u strukturnu osnovu transporta.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na finansijskoj podršci projekta 172009.

Literatura

1. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:218–27. doi:10.1038/nrm2646.
2. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 2008;3:281. doi:10.1186/1479-7364-3-3-281.
3. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1976;455:152–62. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7.
4. Zhou S-F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008;38:802–32. doi:10.1080/00498250701867889.
5. Lin DJH, Yamazaki M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2012;42:59–98. doi:10.2165/00003088-200342010-00003.
6. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004;21:25–51. doi:10.1016/j.ejps.2003.07.003.
7. Thompson TN. The Clinical Significance of Drug Transporters in Drug Disposition and Drug Interactions. In: Bonate PL, Howard DR, editors. *Pharmacokinet. Drug Dev.*, Springer US; 2011, p. 285–313.
8. Baguley BC. Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer. *Mol Biotechnol* 2010;46:308–16. doi:10.1007/s12033-010-9321-2.
9. Dean M. ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;14:3–9. doi:10.1007/s10911-009-9109-9.
10. Eckford PDW, Sharom FJ. ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. *Chem Rev* 2009;109:2989–3011. doi:10.1021/cr9000226.
11. Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:215–36. doi:10.1038/nrd3028.
12. Maeda K, Sugiyama Y. Transporter biology in drug approval: Regulatory aspects. *Mol Aspects Med* 2013;34:711–8. doi:10.1016/j.mam.2012.10.012.

13. Erić S, Ilić K. Inhibitori P-glikoproteina kao modulatori rezistencije na antikancerogene lekove. *Arh Farm* 2010;60:271–84.
14. Coley HM. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Clinical Studies of P-Glycoprotein Inhibitors. In: Zhou J, editor. *Multi-Drug Resist. Cancer*, Totowa, NJ: Humana Press; 2010, p. 341–58.
15. Yu M, Ocana A, Tannock IF. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Rev* 2012;32:211–27. doi:10.1007/s10555-012-9402-8.
16. Callaghan R, Luk F, Bebawy M. Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy? *Drug Metab Dispos* 2014;42:623–31. doi:10.1124/dmd.113.056176.
17. Saraswathy M, Gong S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnol Adv* 2013;31:1397–407. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.06.004.
18. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of Drug Transporter Studies on Drug Discovery and Development. *Pharmacol Rev* 2003;55:425–61. doi:10.1124/pr.55.3.1.
19. Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO, et al. Rational Use of in Vitro P-glycoprotein Assays in Drug Discovery. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:620–8.
20. Chang C, Bahadduri PM, Polli JE, Swaan PW, Ekins S. Rapid Identification of P-glycoprotein Substrates and Inhibitors. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1976–84. doi:10.1124/dmd.106.012351.
21. Shimada J, Ekins S, Elkin C, Shakhnovich EI, Wery J-P. Integrating computer-based de novo drug design and multidimensional filtering for desirable drugs. *Targets* 2002;1:196–205. doi:10.1016/S1477-3627(02)02274-2.
22. Ecker GF, Stockner T, Chiba P. Computational models for prediction of interactions with ABC-transporters. *Drug Discov Today* 2008;13:311–7. doi:10.1016/j.drudis.2007.12.012.
23. Pinto M, Digles D, Ecker GF. Computational models for predicting the interaction with ABC transporters. *Drug Discov Today Technol* 2014;12:e69–77. doi:10.1016/j.ddtec.2014.03.007.
24. Ekins S. Predicting undesirable drug interactions with promiscuous proteins in silico. *Drug Discov Today* 2004;9:276–85. doi:10.1016/S1359-6446(03)03008-3.
25. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, et al. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 2009;323:1718–22. doi:10.1126/science.1168750.
26. Li J, Jaimes KF, Aller SG. Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci* 2014;23:34–46. doi:10.1002/pro.2387.
27. Hennessy M, Spiers JP. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res* 2007;55:1–15. doi:10.1016/j.phrs.2006.10.007.
28. Orłowski S, Martin S, Escargueil A. P-glycoprotein and “lipid rafts”: some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?). *Cell Mol Life Sci CMLS* 2006;63:1038–59. doi:10.1007/s00018-005-5554-9.

29. Aänismaa P, Gatlik-Landwojtowicz E, Seelig A. P-glycoprotein senses its substrates and the lateral membrane packing density: consequences for the catalytic cycle. *Biochemistry (Mosc)* 2008;47:10197–207. doi:10.1021/bi800209h.
30. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2007;9:105–27. doi:10.2217/14622416.9.1.105.
31. Lugo MR, Sharom FJ. Interaction of LDS-751 and Rhodamine 123 with P-Glycoprotein: Evidence for Simultaneous Binding of Both Drugs†. *Biochemistry (Mosc)* 2005;44:14020–9. doi:10.1021/bi0511179.
32. Shapiro AB, Ling V. Positively Cooperative Sites for Drug Transport by P-Glycoprotein with Distinct Drug Specificities. *Eur J Biochem* 1997;250:130–7. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00130.x.
33. Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. *Eur J Biochem* 1999;259:841–50. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00098.x.
34. Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P, Callaghan R. Communication between Multiple Drug Binding Sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2000;58:624–32. doi:10.1124/mol.58.3.624.
35. Safa AR. Identification and Characterization of the Binding Sites of P-Glycoprotein for Multidrug Resistance-Related Drugs and Modulators. *Curr Med Chem -Anti-Cancer Agents* 2004;4:1–17. doi:10.2174/1568011043482142.
36. Ernst R, Kueppers P, Stindt J, Kuchler K, Schmitt L. Multidrug efflux pumps: Substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps – first come, first served? *FEBS J* 2010;277:540–9. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07485.x.
37. Wong K, Ma J, Rothnie A, Biggin PC, Kerr ID. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem Sci* 2014;39:8–16. doi:10.1016/j.tibs.2013.11.002.
38. Chufan EE, Sim H-M, Ambudkar SV. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies. In: Ishikawa JDS and T, editor. *Adv. Cancer Res.*, vol. 125, Academic Press; 2015, p. 71–96.
39. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:3–29. doi:10.1016/S0169-409X(02)00169-2.
40. Zhang Y, Bachmeier C, Miller DW. In vitro and in vivo models for assessing drug efflux transporter activity. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:31–51. doi:10.1016/S0169-409X(02)00170-9.
41. Varma MVS, Sateesh K, Panchagnula R. Functional Role of P-Glycoprotein in Limiting Intestinal Absorption of Drugs: Contribution of Passive Permeability to P-Glycoprotein Mediated Efflux Transport. *Mol Pharm* 2005;2:12–21. doi:10.1021/mp0499196.
42. Balimane PV, Han Y-H, Chong S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS J* 2006;8:E1–13. doi:10.1208/aapsj080101.

43. Litman T, Zeuthen T, Skovsgaard T, Stein WD. Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1997;1361:169–76. doi:10.1016/S0925-4439(97)00027-6.
44. Adachi Y, Suzuki H, Sugiyama Y. Comparative Studies on in Vitro Methods for Evaluating in Vivo Function of MDR1 P-Glycoprotein. *Pharm Res* 2001;18:1660–8. doi:10.1023/A:1013358126640.
45. Schwab D, Fischer H, Tabatabaei A, Poli S, Huwyler J. Comparison of in Vitro P-Glycoprotein Screening Assays: Recommendations for Their Use in Drug Discovery. *J Med Chem* 2003;46:1716–25. doi:10.1021/jm021012t.
46. Didziapetris R, Japertas P, Avdeef A, Petrauskas A. Classification Analysis of P-Glycoprotein Substrate Specificity. *J Drug Target* 2003;11:391–406. doi:10.1080/10611860310001648248.
47. Erić S, Kalinić M, Ilić K, Zloh M. Computational classification models for predicting the interaction of drugs with P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *SAR QSAR Environ Res* 2014;25:939–66. doi:10.1080/1062936X.2014.976265.
48. Chen L, Li Y, Yu H, Zhang L, Hou T. Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Discov Today* 2012;17:343–51. doi:10.1016/j.drudis.2011.11.003.
49. He H, Garcia EA. Learning from Imbalanced Data. *IEEE Trans Knowl Data Eng* 2009;21:1263–84. doi:10.1109/TKDE.2008.239.
50. Schwaha R, Ecker GF. Similarity Based Descriptors – Useful for Classification of Substrates of the Human Multidrug Transporter P-Glycoprotein? *QSAR Comb Sci* 2009;28:834–9. doi:10.1002/qsar.200960051.
51. Xue Y, Yap CW, Sun LZ, Cao ZW, Wang JF, Chen YZ. Prediction of P-Glycoprotein Substrates by a Support Vector Machine Approach. *J Chem Inf Comput Sci* 2004;44:1497–505. doi:10.1021/ci049971e.
52. De Cerqueira Lima P, Golbraikh A, Oloff S, Xiao Y, Tropsha A. Combinatorial QSAR Modeling of P-Glycoprotein Substrates. *J Chem Inf Model* 2006;46:1245–54. doi:10.1021/ci0504317.
53. Cabrera MA, González I, Fernández C, Navarro C, Bermejo M. A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates. *J Pharm Sci* 2006;95:589–606. doi:10.1002/jps.20449.
54. Huang J, Ma G, Muhammad I, Cheng Y. Identifying P-Glycoprotein Substrates Using a Support Vector Machine Optimized by a Particle Swarm. *J Chem Inf Model* 2007;47:1638–47. doi:10.1021/ci700083n.
55. Demel MA, Kraemer O, Ettmayer P, Haaksma E, Ecker GF. Ensemble Rule-Based Classification of Substrates of the Human ABC-Transporter ABCB1 Using Simple Physicochemical Descriptors. *Mol Inform* 2010;29:233–42. doi:10.1002/minf.200900079.
56. Wang Z, Chen Y, Liang H, Bender A, Glen RC, Yan A. P-glycoprotein Substrate Models Using Support Vector Machines Based on a Comprehensive Data set. *J Chem Inf Model* 2011;51:1447–56. doi:10.1021/ci2001583.

57. Broccatelli F. QSAR Models for P-Glycoprotein Transport Based on a Highly Consistent Data Set. *J Chem Inf Model* 2012;52:2462–70. doi:10.1021/ci3002809.
58. Levatić J, Ćurak J, Kralj M, Šmuc T, Osmak M, Supek F. Accurate Models for P-gp Drug Recognition Induced from a Cancer Cell Line Cytotoxicity Screen. *J Med Chem* 2013;56:5691–708. doi:10.1021/jm400328s.
59. Li D, Chen L, Li Y, Tian S, Sun H, Hou T. ADMET Evaluation in Drug Discovery. 13. Development of in Silico Prediction Models for P-Glycoprotein Substrates. *Mol Pharm* 2014;11:716–26. doi:10.1021/mp400450m.
60. Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 2006;6:813–23. doi:10.1038/nrc1951.
61. Erić S, Kalinić M, Popović A, Zloh M, Kuzmanovski I. Prediction of aqueous solubility of drug-like molecules using a novel algorithm for automatic adjustment of relative importance of descriptors implemented in counter-propagation artificial neural networks. *Int J Pharm* 2012;437:232–41. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.022.
62. Guha R, Jurs PC. Interpreting Computational Neural Network QSAR Models: A Measure of Descriptor Importance. *J Chem Inf Model* 2005;45:800–6. doi:10.1021/ci050022a.
63. Fraczkiewicz R, Zhuang D, Zhang J, Miller D, Woltosz W. Busting the Black Box Myth: Designing Out Unwanted ADMET Properties with Machine Learning Approaches. *CICSJ Bull* 2009;27:96–96. doi:10.11546/cicsj.27.96.
64. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:3–26.
65. Gombar VK, Polli JW, Humphreys JE, Wring SA, Serabjit-Singh CS. Predicting P-glycoprotein substrates by a quantitative structure–activity relationship model. *J Pharm Sci* 2004;93:957–68. doi:10.1002/jps.20035.
66. Gleeson MP. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. *J Med Chem* 2008;51:817–34. doi:10.1021/jm701122q.
67. Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl Chem* 1998;70:1129–43.
68. Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 1998;251:252–61. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2510252.x.
69. Pajeva IK, Wiese M. Pharmacophore Model of Drugs Involved in P-Glycoprotein Multidrug Resistance: Explanation of Structural Variety (Hypothesis). *J Med Chem* 2002;45:5671–86. doi:10.1021/jm020941h.
70. Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferté J, Garrigos M, André F, et al. Characterization of Two Pharmacophores on the Multidrug Transporter P-Glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2002;62:1288–98. doi:10.1124/mol.62.6.1288.
71. Resistance P-Glycoprotein. *J Med Chem* 2004;47:2523–33. doi:10.1021/jm031009p.

72. Penzotti JE, Lamb ML, Evensen E, Grootenhuis PDJ. A Computational Ensemble Pharmacophore Model for Identifying Substrates of P-Glycoprotein. *J Med Chem* 2002;45:1737–40. doi:10.1021/jm0255062.
73. Li W-X, Li L, Eksterowicz J, Ling XB, Cardozo M. Significance Analysis and Multiple Pharmacophore Models for Differentiating P-Glycoprotein Substrates. *J Chem Inf Model* 2007;47:2429–38. doi:10.1021/ci700284p.
74. Cianchetta G, Singleton RW, Zhang M, Wildgoose M, Giesing D, Fravolini A, et al. A Pharmacophore Hypothesis for P-Glycoprotein Substrate Recognition Using GRIND-Based 3D-QSAR. *J Med Chem* 2005;48:2927–35. doi:10.1021/jm0491851.
75. Ha SN, Hochman J, Sheridan RP. Mini Review on Molecular Modeling of P-Glycoprotein (Pgp). *Curr Top Med Chem* 2007;7:1525–9. doi:10.2174/156802607782194806.
76. O'Mara ML, Tieleman DP. P-glycoprotein models of the apo and ATP-bound states based on homology with Sav1866 and MalK. *FEBS Lett* 2007;581:4217–22. doi:10.1016/j.febslet.2007.07.069.
77. Globisch C, Pajeva IK, Wiese M. Identification of Putative Binding Sites of P-glycoprotein Based on its Homology Model. *ChemMedChem* 2008;3:280–95. doi:10.1002/cmdc.200700249.
78. Becker J-P, Depret G, Bambeke FV, Tulkens PM, Prévost M. Molecular models of human P-glycoprotein in two different catalytic states. *BMC Struct Biol* 2009;9:3. doi:10.1186/1472-6807-9-3.
79. Stockner T, de Vries SJ, Bonvin AMJJ, Ecker GF, Chiba P. Data-driven homology modelling of P-glycoprotein in the ATP-bound state indicates flexibility of the transmembrane domains. *FEBS J* 2009;276:964–72. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06832.x.
80. Kerr ID, Jones PM, George AM. Multidrug efflux pumps: The structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. *FEBS J* 2010;277:550–63. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07486.x.
81. Klepsch F, Ecker GF. Impact of the Recent Mouse P-Glycoprotein Structure for Structure-Based Ligand Design. *Mol Inform* 2010;29:276–86. doi:10.1002/minf.201000017.
82. Pajeva IK, Globisch C, Wiese M. Comparison of the inward- and outward-open homology models and ligand binding of human P-glycoprotein. *FEBS J* 2009;276:7016–26. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07415.x.
83. Pajeva IK, Globisch C, Wiese M. Combined Pharmacophore Modeling, Docking, and 3D QSAR Studies of ABCB1 and ABCC1 Transporter Inhibitors. *ChemMedChem* 2009;4:1883–96. doi:10.1002/cmdc.200900282.
84. Klepsch F, Chiba P, Ecker GF. Exhaustive Sampling of Docking Poses Reveals Binding Hypotheses for Propafenone Type Inhibitors of P-Glycoprotein. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1002036. doi:10.1371/journal.pcbi.1002036.
85. Jabeen I, Wetwitayaklung P, Klepsch F, Parveen Z, Chiba P, Ecker GF. Probing the stereoselectivity of P-glycoprotein—synthesis, biological activity and ligand docking studies of a

- set of enantiopure benzopyrano[3,4-b][1,4]oxazines. *Chem Commun* 2011;47:2586–8. doi:10.1039/C0CC03075A.
86. Abraham I, Jain S, Wu C-P, Khanfar MA, Kuang Y, Dai C-L, et al. Marine sponge-derived sipholane triterpenoids reverse P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1497–506. doi:10.1016/j.bcp.2010.08.001.
 87. Ding P-R, Tiwari AK, Ohnuma S, Lee JWKK, An X, Dai C-L, et al. The Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Is a Potent Inhibitor of ABCB1/P-Glycoprotein Transporter. *PLoS ONE* 2011;6:e19329. doi:10.1371/journal.pone.0019329.
 88. Chufan EE, Kapoor K, Sim H-M, Singh S, Talele TT, Durell SR, et al. Multiple Transport-Active Binding Sites Are Available for a Single Substrate on Human P-Glycoprotein (ABCB1). *PLoS ONE* 2013;8:e82463. doi:10.1371/journal.pone.0082463.
 89. Ferreira RJ, Ferreira M-JU, dos Santos DJVA. Insights on P-Glycoprotein's Efflux Mechanism Obtained by Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput* 2012;8:1853–64. doi:10.1021/ct300083m.
 90. Prajapati R, Singh U, Patil A, Khomane KS, Bagul P, Bansal AK, et al. In silico model for P-glycoprotein substrate prediction: insights from molecular dynamics and in vitro studies. *J Comput Aided Mol Des* 2013;27:347–63. doi:10.1007/s10822-013-9650-x.
 91. Dolgih E, Bryant C, Renslo AR, Jacobson MP. Predicting Binding to P-Glycoprotein by Flexible Receptor Docking. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1002083. doi:10.1371/journal.pcbi.1002083.
 92. Palestro PH, Gavernet L, Estiu GL, Bruno Blanch LE. Docking Applied to the Prediction of the Affinity of Compounds to P-Glycoprotein. *BioMed Res Int* 2014;2014:e358425. doi:10.1155/2014/358425.
 93. Ferreira RJ, Ferreira M-JU, dos Santos DJVA. Molecular Docking Characterizes Substrate-Binding Sites and Efflux Modulation Mechanisms within P-Glycoprotein. *J Chem Inf Model* 2013;53:1747–60. doi:10.1021/ci400195v.
 94. Zeino M, Saeed MEM, Kadioglu O, Efferth T. The ability of molecular docking to unravel the controversy and challenges related to P-glycoprotein—a well-known, yet poorly understood drug transporter. *Invest New Drugs* 2014;32:618–25. doi:10.1007/s10637-014-0098-1.
 95. Bikadi Z, Hazai I, Malik D, Jemnitz K, Veres Z, Hari P, et al. Predicting P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport Based On Support Vector Machine and Three-Dimensional Crystal Structure of P-glycoprotein. *PLoS ONE* 2011;6:e25815. doi:10.1371/journal.pone.0025815.
 96. Swann SL, Brown SP, Muchmore SW, Patel H, Merta P, Locklear J, et al. A Unified, Probabilistic Framework for Structure- and Ligand-Based Virtual Screening. *J Med Chem* 2011;54:1223–32. doi:10.1021/jm1013677.
 97. Li G-B, Yang L-L, Xu Y, Wang W-J, Li L-L, Yang S-Y. A combined molecular docking-based and pharmacophore-based target prediction strategy with a probabilistic fusion method for target ranking. *J Mol Graph Model* 2013;44:278–85. doi:10.1016/j.jmgm.2013.07.005.

98. Moroy G, Martiny VY, Vayer P, Villoutreix BO, Miteva MA. Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. *Drug Discov Today* 2012;17:44–55. doi:10.1016/j.drudis.2011.10.023.
99. Raub TJ. P-Glycoprotein Recognition of Substrates and Circumvention through Rational Drug Design. *Mol Pharm* 2006;3:3–25. doi:10.1021/mp0500871.
100. Bahaduri PM, Polli JE, Swaan PW, Ekins S. Targeting Drug Transporters – Combining In Silico and In Vitro Approaches to Predict In Vivo. In: Yan Q, editor. *Membr. Transp. Drug Discov. Dev.*, Humana Press; 2010.

Computational models for predicting drug transport mediated by P-glycoprotein

Slavica Eric^{1,*}, Marko Kalinić¹

¹ University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia

* corresponding author: seric@pharmacy.bg.ac.rs

phone: +381 11 3951 355, fax: +381 11 3972 840

Summary

P-glycoprotein (Pgp) is a transmembrane transporter which can, by transporting structurally diverse compounds, influence the absorption, distribution and efficacy of a number of drugs. Pgp overexpression in cells is a major contributing factor to the development of drug resistance. For these reasons, potential for compound efflux by Pgp should be assessed early on in the drug discovery process, preferably even prior to compound synthesis. To meet this demand, numerous computational models have been developed during the past decade, capable of predicting Pgp-mediated transport based solely on chemical structures. This paper summarizes the various approaches that have been used for model development, discusses their advantages and disadvantages and focuses on key factors that influence model reliability. The promiscuous nature of the transport can be seen as a major challenge for most computational chemistry methods. Nevertheless, the attained level of accuracy of literature models suggests that they can be useful in the drug discovery setting. Greater availability of experimental data and integration of predictions made by different modeling methods has the potential to further improve the reliability of computational predictions.

Keywords: P-glycoprotein, computational models, drug resistance, drug design.
