

Лаборатория структурно-функционального конструирования лекарств

Компьютерная оценка белков-мишеней лекарственных соединений, связанных с проявлением их гепатотоксичности

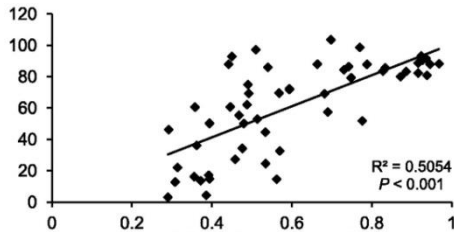
С.М. Иванов, М.И. Семин, А.А. Лагунин, Д.А. Филимонов, В.В. Поройков

Гепатотоксичность лекарств



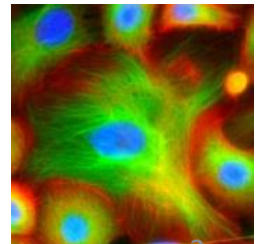
Гепатотоксичность (ГТ) лекарственных соединений (ЛС) является главной причиной развития острой печеночной недостаточности и одной из основных причин отзывов препаратов с рынка (Reuben A. et al., 2010; Hornberg J.J. et al., 2014).

Около 50% гепатотоксичных ЛС не удается выявить в экспериментах на животных (Olson H. et al., 2000).



Прогноз ГТ при помощи взаимосвязей структура-активность (SAR) демонстрируют невысокую точность. Кроме того, отсутствует механистическая интерпретация. (Chen, M., et al., 2014).

Для прогностических моделей, основанных на профилях индуцированной генной экспрессии, а также гибридных моделей с SAR требуется много экспериментов и они реализованы для сравнительно небольшого количества ЛС (Muller, C., et al., 2015).

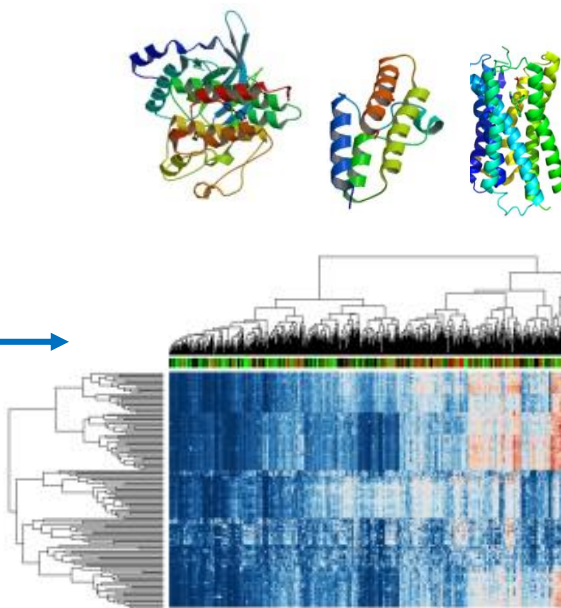
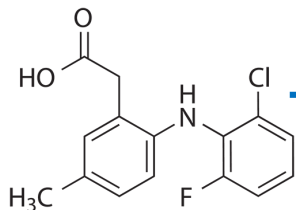


Белки-мишени, связанные с ГТ

Индукция большинства побочных эффектов может быть объяснена воздействием ЛС на белки человека, например блокада HERG ионных каналов в сердце приводит к аритмиям (Torsade de Pointes).

Взаимодействие с такими мишенями может быть измерено экспериментально или предсказано с помощью (Q)SAR или докинга.

Взаимодействие с
белками-мишенями



Повреждение печени

Может ли ГТ быть объяснена взаимодействием ЛС с белками человека?

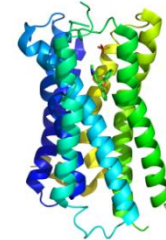
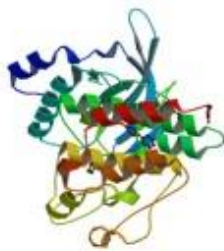
Схема исследования

ЛС с выраженной ГТ

ЛС с умеренной ГТ

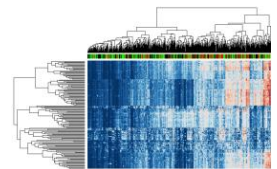
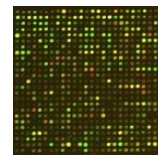
Негепатотоксичные
ЛС

Прогноз взаимодействия с белками человека (SAR)



Статистически значимые корреляции с ГТ

Анализ сигнальных путей и генной
экспрессии, кластеризация, тепловая карта



Наиболее вероятные мишени

Выборки ЛС с информацией о ГТ



<http://sideeffects.embl.de/>

Опубликованные выборки:

Zhu X. and Kruhlak N.L., 2014

Greene N. et al., 2010

Aronson J. K., 2006

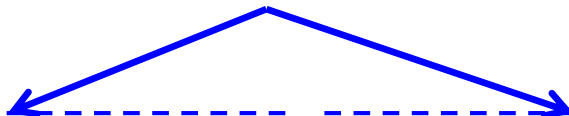


<http://livertox.nih.gov/>

ЛС гепатотоксично хотя бы в двух
выборках



Острая печеночная недостаточность?



Выраженная ГТ (178 ЛС)

Умеренная ГТ (310 ЛС)

ЛС негепатотоксично во всех
выборках



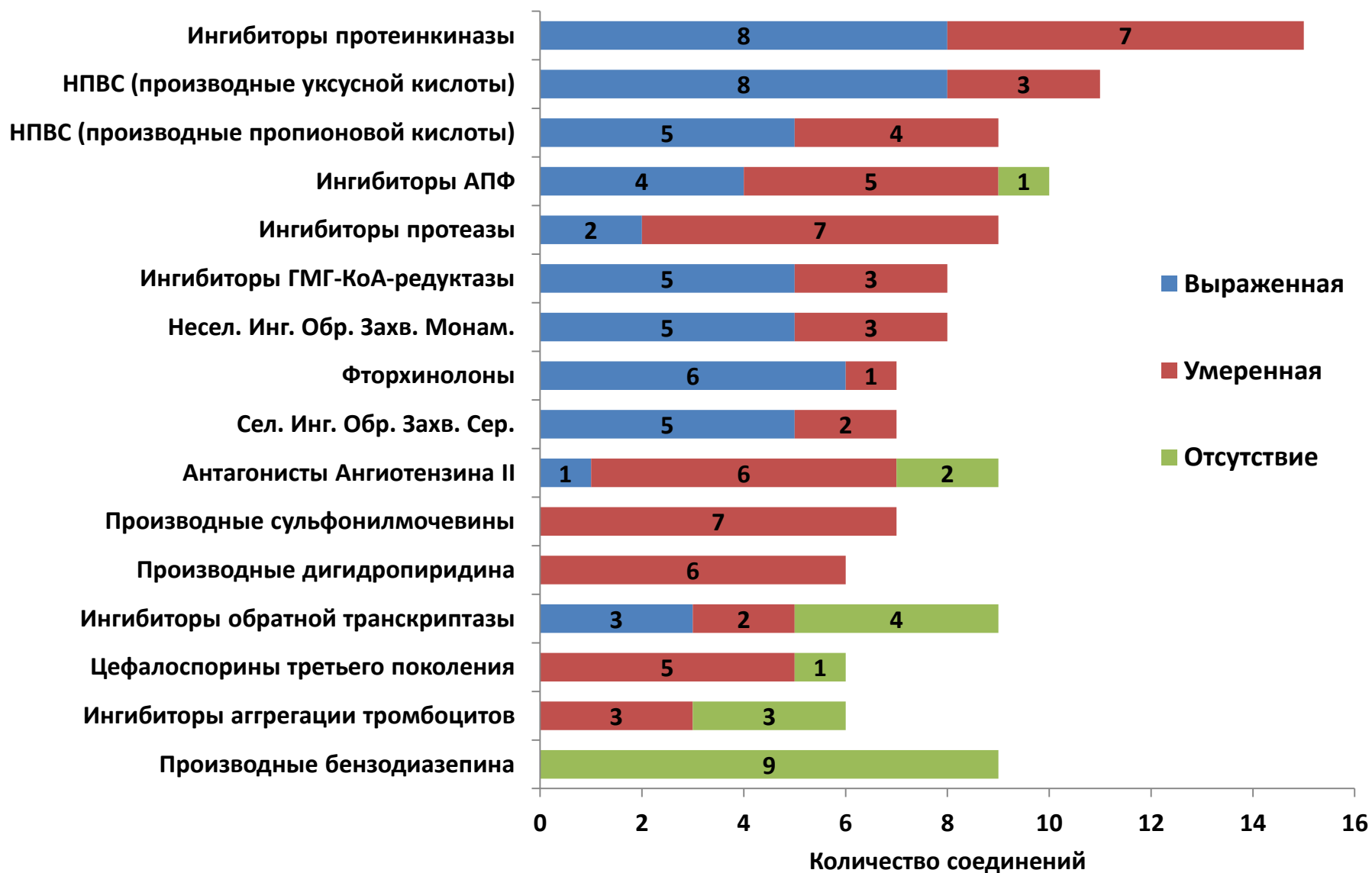
Отсутствие ГТ (211 ЛС)

В целом выборка содержит 699 ЛС

Ограничения:

- ЛС используются системно, хорошая биодоступность
- ЛС присутствуют хотя бы в двух выборках, либо отозваны с рынка
- Структуры с мол. весом меньше 50 или выше 1250 Да, а также неорганические и заряженные структуры были удалены из выборки

Распределение ЛС выборки по классам АТХ



Предсказание белков-мишеней ЛС

PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances)

Дескрипторы:

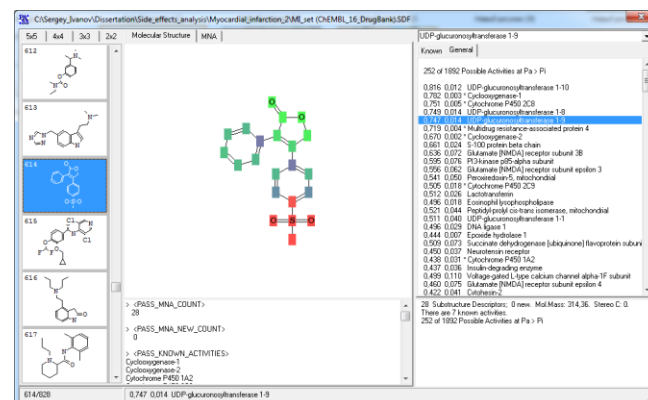
“Multilevel neighborhoods of atoms” (MNA)

Алгоритм:

Основан на наивном байесовском классификаторе

PASS Targets:

- Данные по взаимодействиям лиганд-белок из ChEMBL_19
- Прогноз взаимодействий с 1534 белками-мишенями человека
- Средняя точность (IAP, %) $\approx 97\%$ (на основе скользящего контроля с исключением по одному)
- Минимальная точность среди 1534 мишеней = 85%



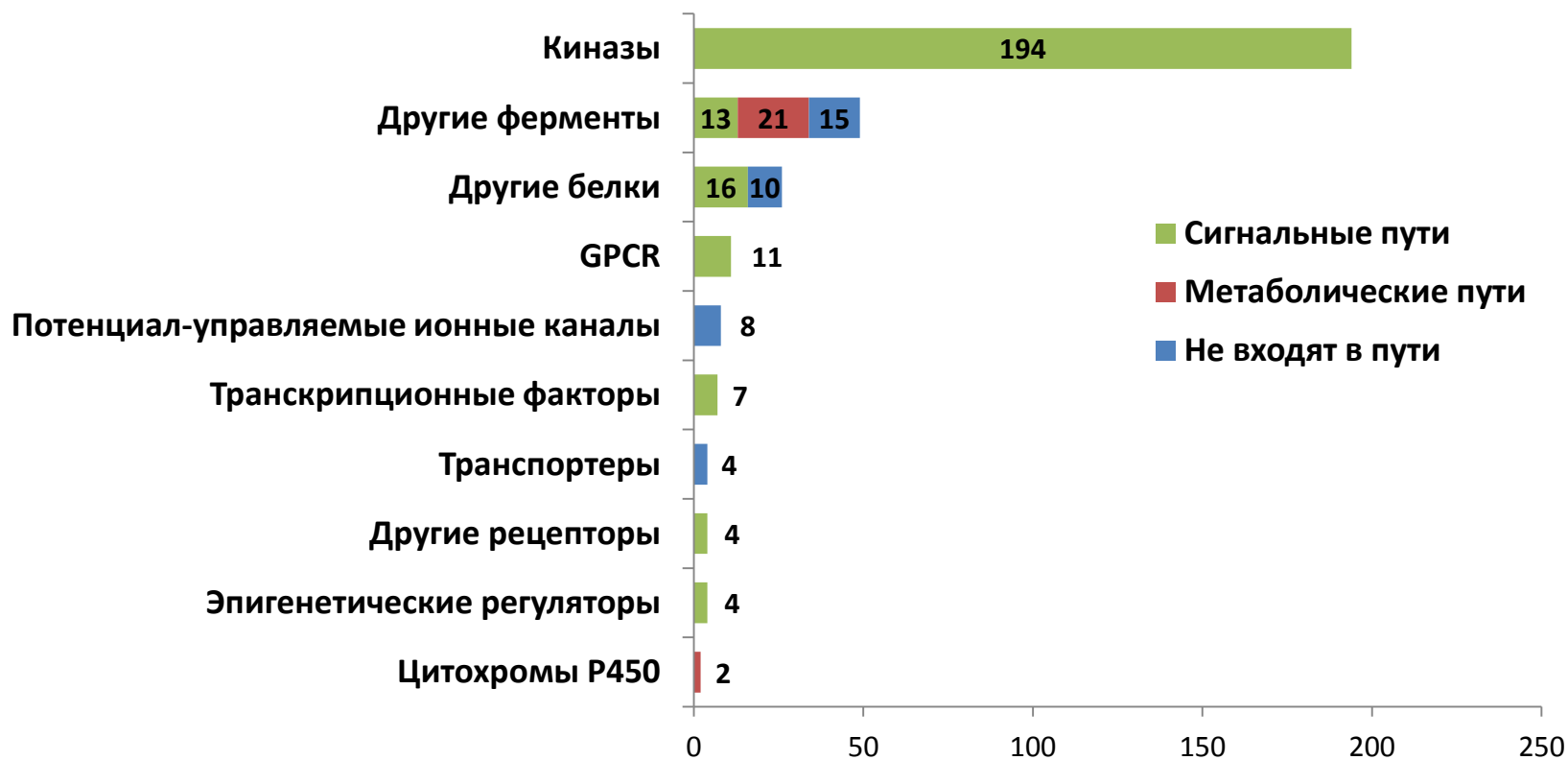
Идентификация ассоциаций между белками и ГТ

Корреляция Кендалла

Поправка Беньямини-Хохберга значений p

Отобраны белки-мишени со значением $p < 0.005$

309 белков-мишеней, предположительно ассоциированных с ГТ



Патологические процессы, связанные с ГТ

Анализ обогащения сигнальных/метаболических путей из KEGG и процессов Gene Ontology был выполнен с помощью веб-сервиса DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>). Полученные результаты могут быть сведены к 11 общим процессам.

Апоптоз

Митохондриальные
патологии

Фиброз

Блокада аутофагии

Метаболизм
ксенобиотиков

Билиарные
патологии

Воспаление и аутоиммунные
реакции

Нарушение
метаболизма
липидов

Нарушение регенерации
печени

Нарушение
метаболизма
глюкозы

Инсулинорезистентность



Большинство процессов ассоциировано с тканью печени

Экспрессия генов и белков в печени

Источники данных

- Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) – взаимодействия с моноклональными антителами
- Multi-Omics Profiling Expression Database (<http://moped.proteinspire.org>) – данные по масс-спектрометрии (3 независимых эксперимента)
- Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) – RNA-seq (5 независимых экспериментов)

Пороговые значения по экспрессии

- Белки, идентифицированные с помощью антител должны иметь уровень значимости “Supportive”
- Белки, идентифицированные не менее чем в двух экспериментах по масс-спектрометрии с False Discovery Rate < 0.01
- Медиана значений FPKM по 5 RNA-seq экспериментам > 1

184 из 309 белков экспрессируются в печени

Идентификация причинно-следственных ассоциаций с ГТ

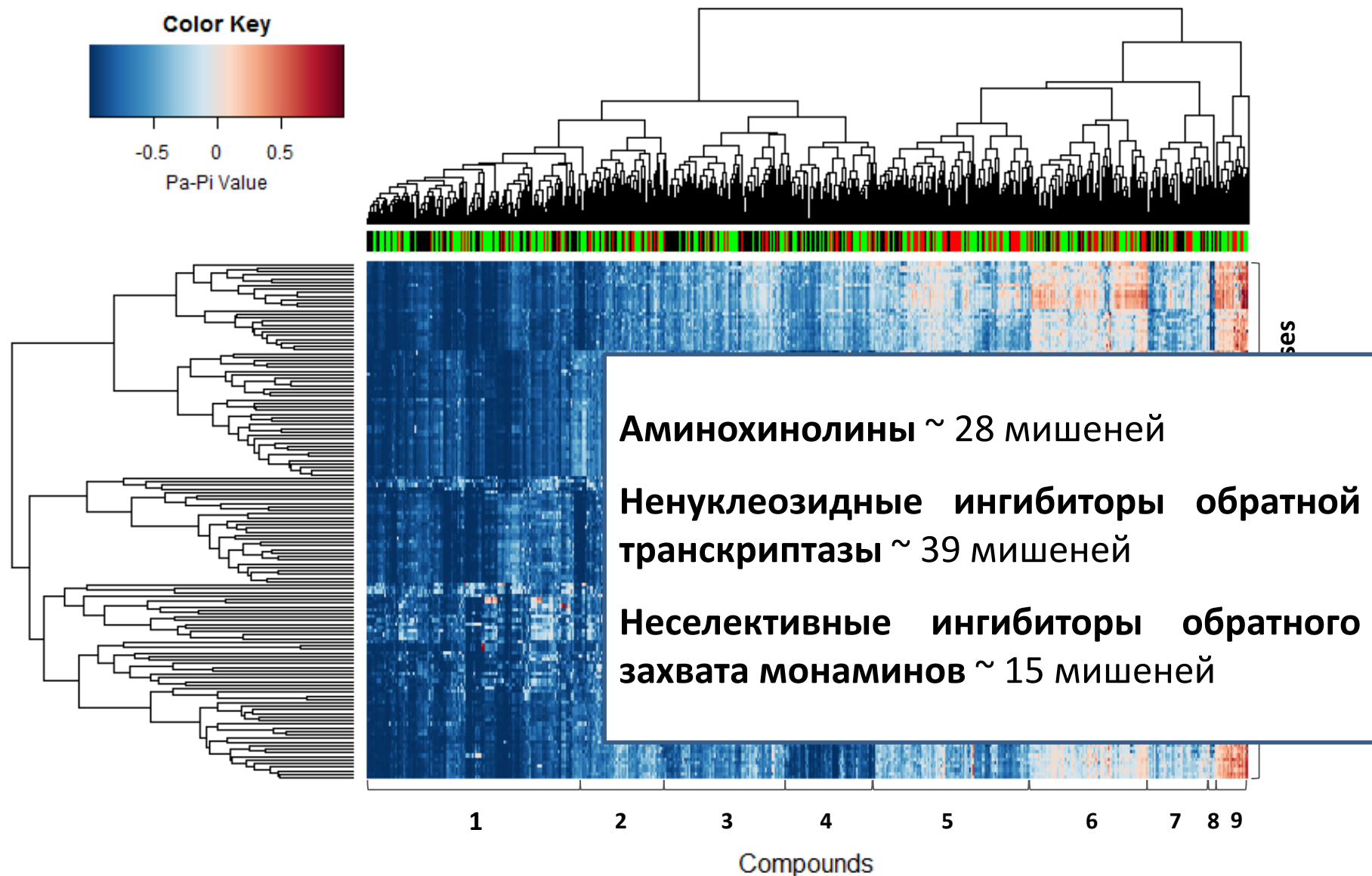
Категория высокой достоверности (76 белков) – участие этих белков в 11 патологических процессах установлено в экспериментах на печени.

Категория средней достоверности (69 белков) – участие этих белков в 11 патологических процессах установлено в экспериментах на других органах, но они экспрессируются в печени.

В целом выявлено 145 белков-мишеней



Обзор предсказанных взаимодействий 699 ЛС со 145 белками



Выраженная ГТ

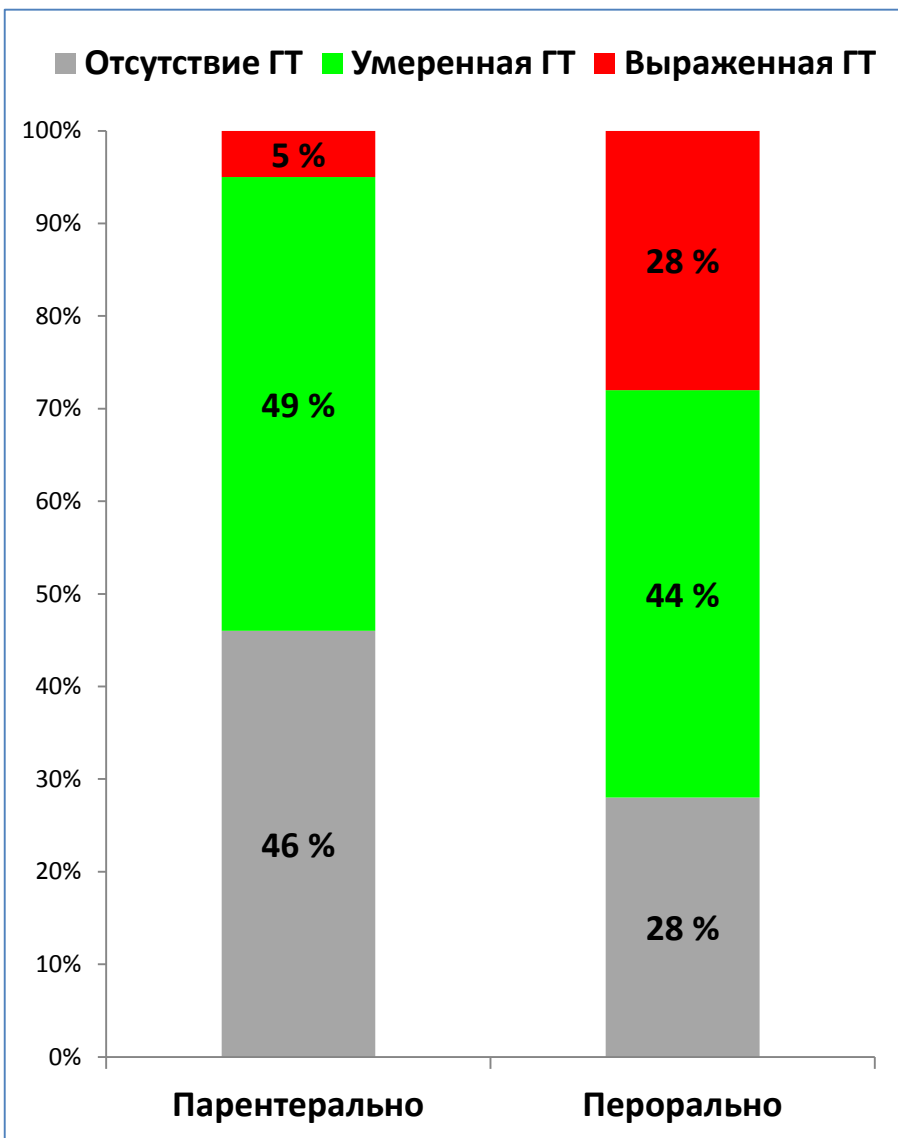


Умеренная ГТ

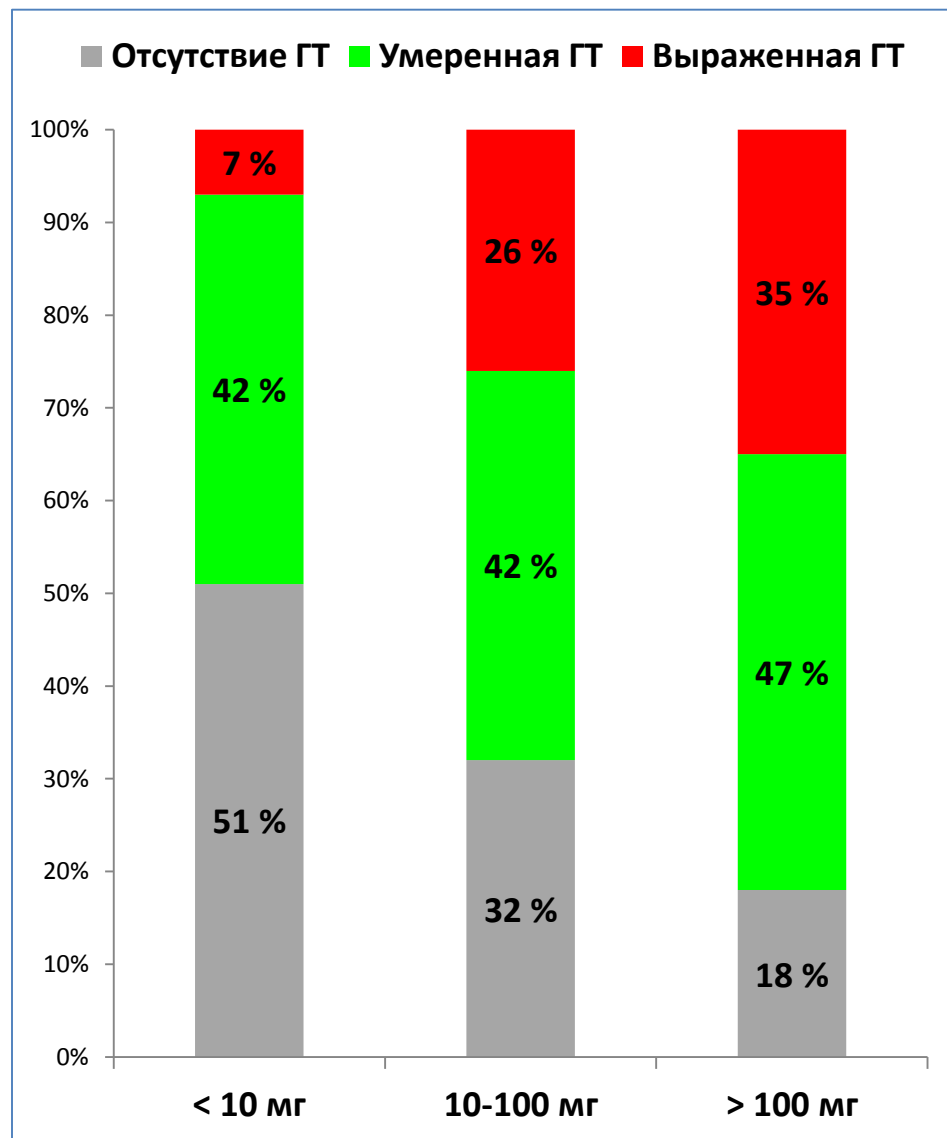


Отсутствие ГТ

Зависимость степени ГТ от дозы и способа применения ЛС



Способ применения



Суточная доза

Идентификация ассоциаций между белками и ГТ в пределах кластеров

Значение $p < 0.05$

61 из 145 мишеней (42%) были найдены в пределах хотя бы одного кластера



Примеры выявленных белков-мишеней

Cyclooxygenase-2. Выявлен в пяти кластерах. Ингибирование усиливает поражение печени, вызванное гепатотоксичным соединением.

Niemann-Pick C1 protein. При болезни Нимана-Пика типа С поражены, главным образом, печень и мозжечок. Генетический нокаут увеличивает экспрессию генов, связанных с индукцией оксидативного стресса, фиброза и воспаления в печени.

Hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase 70Z-PEP. Эта фосфатаза снижает передачу сигнала с Т-клеточного рецептора. Полиморфизм rs2476601 соответствующего гена ассоциирован с повышенной чувствительностью к идиосинкратическим поражениям печени, вызванным амоксициллином/клавулановой кислотой, и связан с иммунным ответом на ткани печени.

Toll-like receptor 9. Активация вызывает инфильтрацию печени нейтрофилами посредством индукции хемокиновых рецепторов. Активация также вызывает неалкогольный стеатогепатит.

Связь ЛС с мишенями и патологическими процессами

Лекарство	Белок-мишень	Патологический процесс
Ацетилсалициловая кислота	<u>AMPK alpha2/beta1/gamma1</u> Cysteine protease ATG4B	Блокада аутофагии Митохондриальная токсичность
Амодиахин Цинхофен Сульфасалазин Толкапон	Cysteine protease ATG4B FAD-linked sulfhydryl oxidase ALR	Митохондриальная токсичность
Атоваквон	Cysteine protease ATG4B <u>Dihydroorotate dehydrogenase</u>	Митохондриальная токсичность
Флутамид	<u>Aryl hydrocarbon receptor</u>	Апоптоз, нарушение метаболизма липидов
Миноциклин	Protein-tyrosine phosphatase LC-PTP	Аутоиммунный гепатит
Оланзапин	<u>FAD-linked sulfhydryl oxidase ALR</u>	Митохондриальная токсичность

Выводы

Взаимодействие лекарственных соединений со специфическими белками человека играет важную роль в индукции поражений печени.

Мы выявили 61 белок-мишень лекарственных соединений, для которых связь с гепатотоксичностью наиболее вероятна.

Эти белки могут служить основой для дальнейших компьютерных и экспериментальных исследований с целью создания новых методов ранней доклинической оценки гепатотоксичности.

In Silico Identification of Proteins Associated with Drug-Induced Liver Injury Based on the Prediction of Drug-Target Interactions

Sergey Ivanov,^{*,[a, b]} Maxim Semin,^[a, b] Alexey Lagunin,^[a, b] Dmitry Filimonov,^[a] and Vladimir Poroikov^[a]

Abstract: Drug-induced liver injury (DILI) is the leading cause of acute liver failure as well as one of the major reasons for drug withdrawal from clinical trials and the market. Elucidation of molecular interactions associated with DILI may help to detect potentially hazardous pharmacological agents at the early stages of drug development. The purpose of our study is to investigate which interactions with specific human protein targets may cause DILI. Prediction of interactions with 1534 human proteins was performed for the dataset with information about 699 drugs, which were divided into three categories of DILI: severe (178 drugs), moderate (310 drugs) and without DILI (211 drugs). Based on the comparison of drug-target

interactions predicted for different drugs' categories and interpretation of those results using clustering, Gene Ontology, pathway and gene expression analysis, we identified 61 protein targets associated with DILI. Most of the revealed proteins were linked with hepatocytes' death caused by disruption of vital cellular processes, as well as the emergence of inflammation in the liver. It was found that interaction of a drug with the identified targets is the essential molecular mechanism of the severe DILI for the most of the considered pharmaceuticals. Thus, pharmaceutical agents interacting with many of the identified targets may be considered as candidates for filtering out at the early stages of drug research.

Keywords: Hepatotoxicity · bioinformatics · off-target · structure-activity relationships · pathway analysis

1. Introduction

Drug-induced liver injury (DILI) is one of the main problems associated with the use of drugs in clinical practice. Despite its rare frequency of occurrence, it is the leading cause of acute liver failure (ALF) and liver transplantation in Western

only been realized for a relatively small number of drugs. Further investigations of DILI-related mechanisms may provide a basis for improving of existing approaches and allow the development of new prediction methods with higher accuracies and lower costs.

It is generally accepted that the main DILI mechanisms

Благодарности

Семин М.И.

Лагунин А.А.

Филимонов Д.А.

Поройков В.В.

**Работа была выполнена при поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
(грант № 16-34-01077)**