

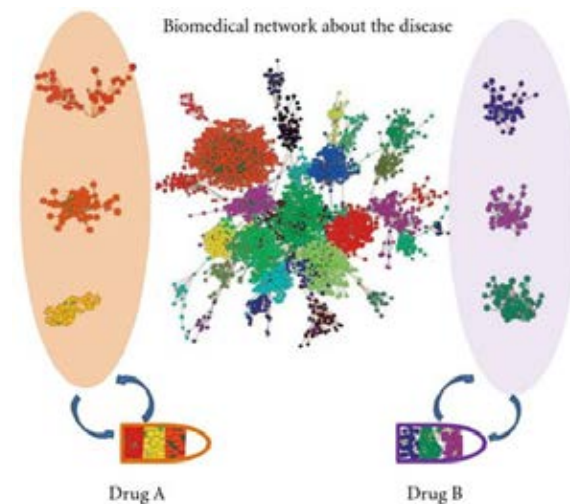


Использование сетевой фармакологии при поиске новых лекарственных мишеней фитокомпонентов для лечения сосудистой деменции

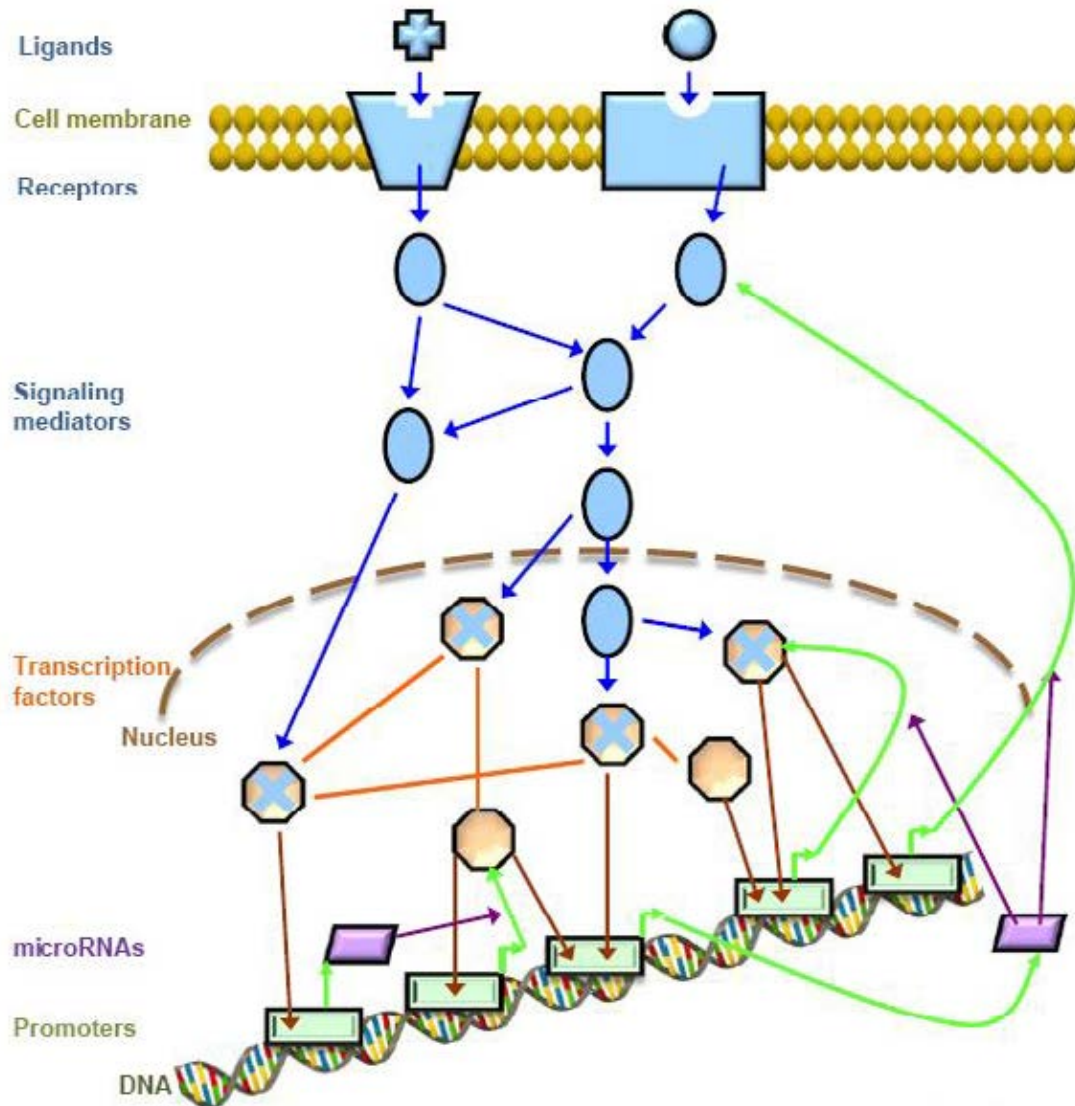
ЛАГУНИН А.А.

д.б.н., профессор РАН

*РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва;
ИБМХ, Москва*



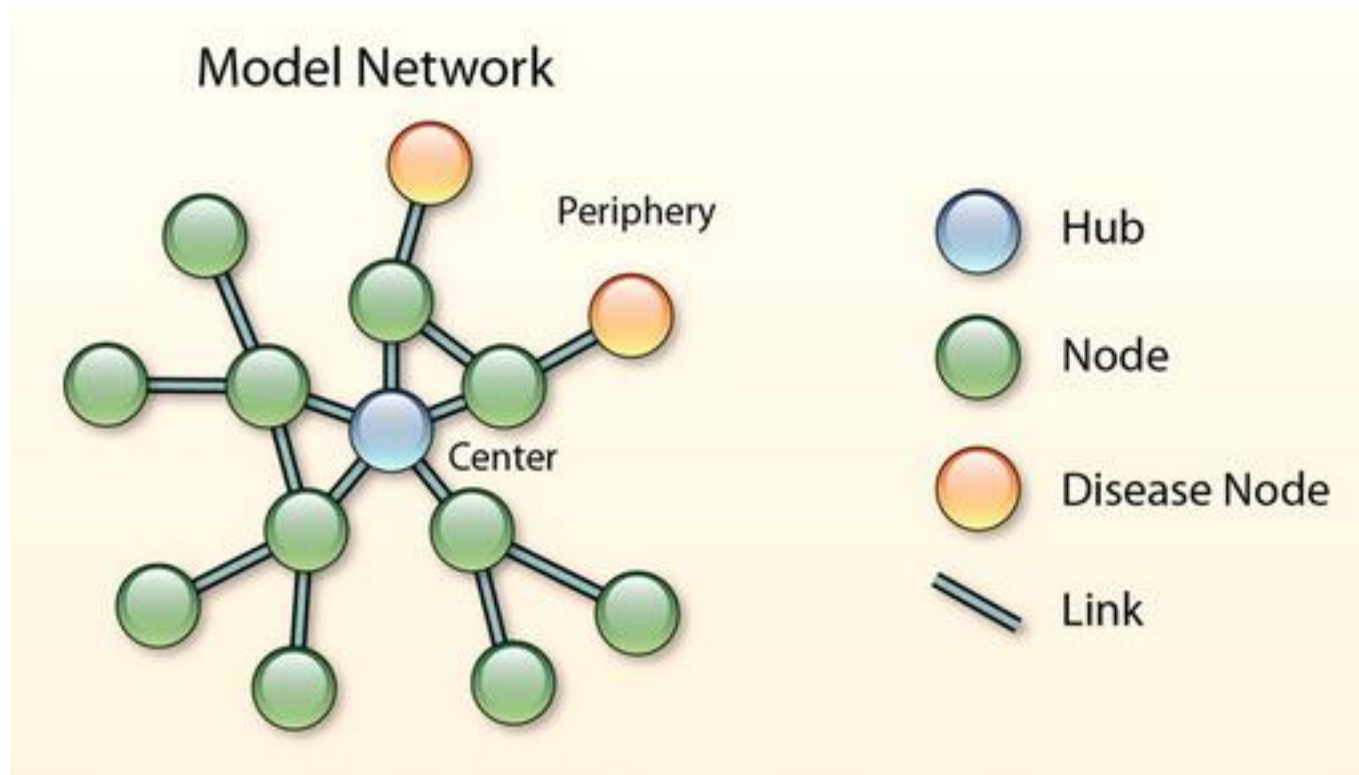
Сетевая фармакология – новая парадигма в конструировании лекарств



Более 80% новых лекарств действуют на мишени, которые связаны с сетью мишеней известных лекарственных препаратов

Подход основан на оценке новых белков-кандидатов для лечения соответствующих заболеваний при помощи использования информации об известных терапевтических мишенях, белках-кандидатах и методах анализа сетей белок-белковых взаимодействий

Сетевая фармакология



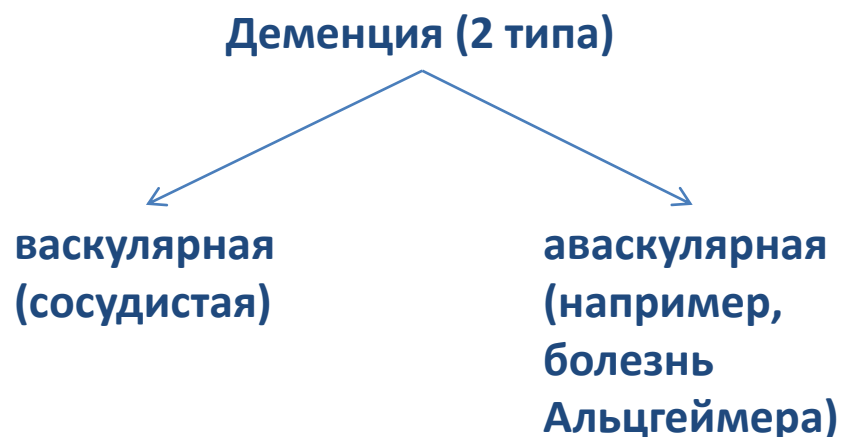
Circulation Research. 2012;111:359-374

Алгоритм поиска новых мишеней с использованием сетевой фармакологии

1. Поиск генов, ассоциированных с заболеванием, а также продукты которых (белки используются для лечения).
2. Отбор биологических процессов GeneOntology , сигнальных и регуляторных путей KEGG, связанных с заболеванием.
3. Создание сети белок-белковых взаимодействий или взаимодействий генов.
4. Картирование отобранных генов ассоциированных с заболеванием на сеть.
5. Отбор новых мишеней, ассоциированных с заболеванием с использованием специального алгоритма (**DIAMOnD**).
6. Из списка новых мишеней выбор мишеней для виртуального скрининга и экспериментального тестирования.

Деменция

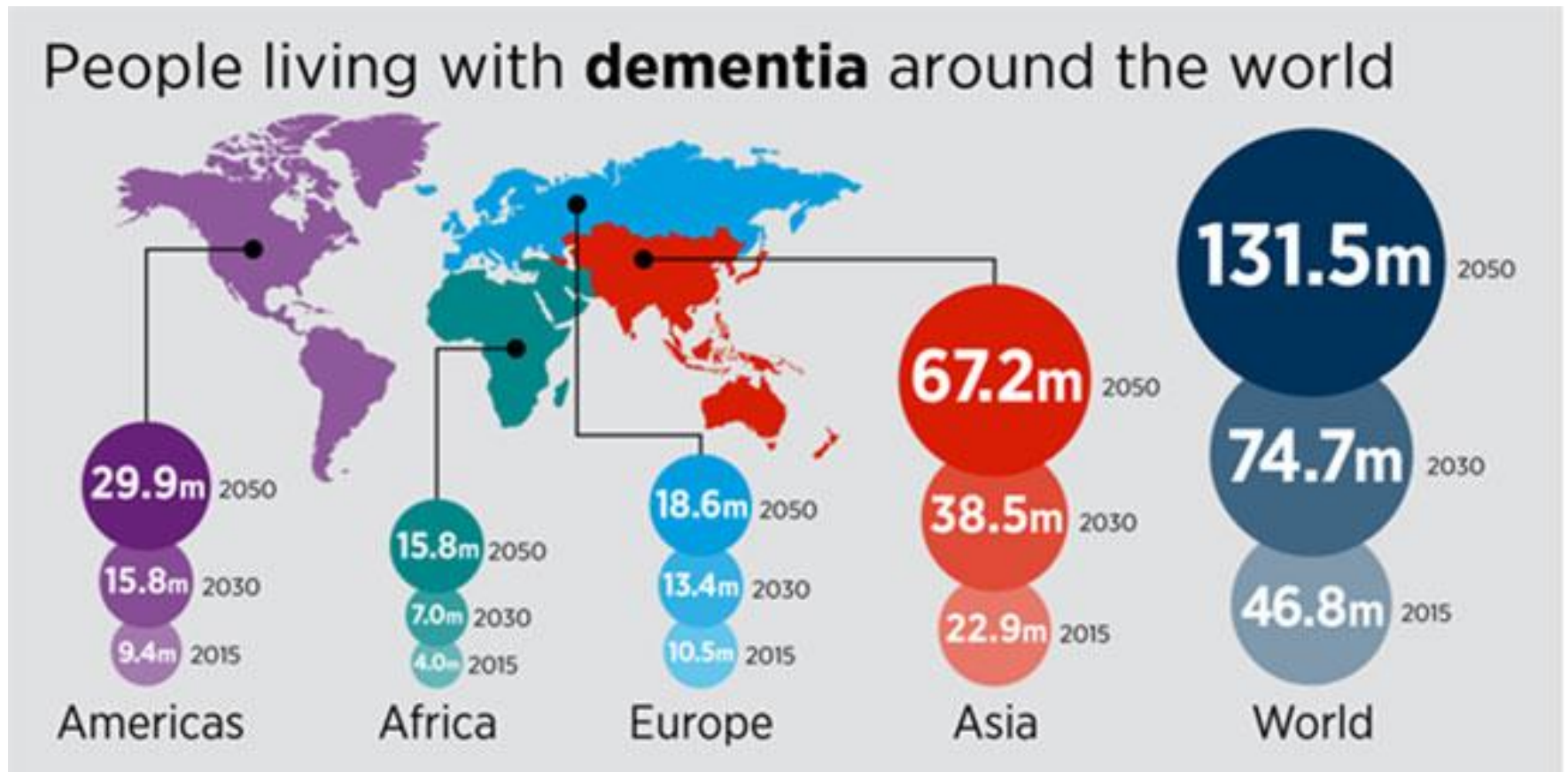
Заболевание пожилых людей, которое характеризуется прогрессирующей потерей памяти и других умственных способностей, таких как общение, суждения и планирования, нарушениями повседневной деятельности, а также дефицитом социального взаимодействия.



В России смертность от сосудистой деменции почти в 4 раза превышает смертность от болезни Альцгеймера (Какорина и др., 2015)

Деменция

По данным ВОЗ количество больных в мире
в настоящее время – 46,8 млн
к 2050 году возрастет до 131,5 млн



Сосудистая деменция (СД)

Причиной СД является снижение кровоснабжения отделов головного мозга, участвующих в познавательных функциях

Показана связь с сосудистой деменцией с факторами риска:

- возраст
- гипертония
- сахарный диабет
- ожирение
- курение
- гиперлипидемия
- заболевания коронарной артерии
- аритмия
- аутоиммунные

Сосудистая деменция (СД)

Не смотря на то, что СД является наиболее распространенным нарушением памяти после болезни Альцгеймера, до сих пор не существует эффективной лекарственной терапии СД (Iemolo et al., 2009)

ПРИЧИНЫ

1. Точный характер связи между цереброваскулярной патологией и когнитивными нарушениями не совсем понятен
- 2. Недостаток знаний о лекарственных мишенях**
3. Отсутствие специфических методов лечения

Отбор генов ассоциированных с сосудистой деменцией

Использовались общедоступные и коммерческие ресурсы:

PROTEOME™ - коммерческая база данных по известным белок-белковым взаимодействиям

DisGeNET - открытая платформа, интегрирующая информацию о генетических ассоциациях с заболеваниями. Текущая версия (DisGeNET v4.0) содержит 429 036 ассоциаций, между 17381 генами и 15 093 болезнями. (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/>)

Disease-Connect - веб-сервер для анализа и визуализации связей между мишенями, генами, изменением генной экспрессии, лекарствами и заболеваниями. (<http://disease-connect.org/>)

DISEASES - интегрирует данные об ассоциациях генов с болезнями на основе автоматического извлечения текста, анализа литературы, данных о мутациях в опухолях и ассоциативных исследований генома. (<http://diseases.jensenlab.org/>)

Отобрано 115 генов ассоциированных с сосудистой деменцией

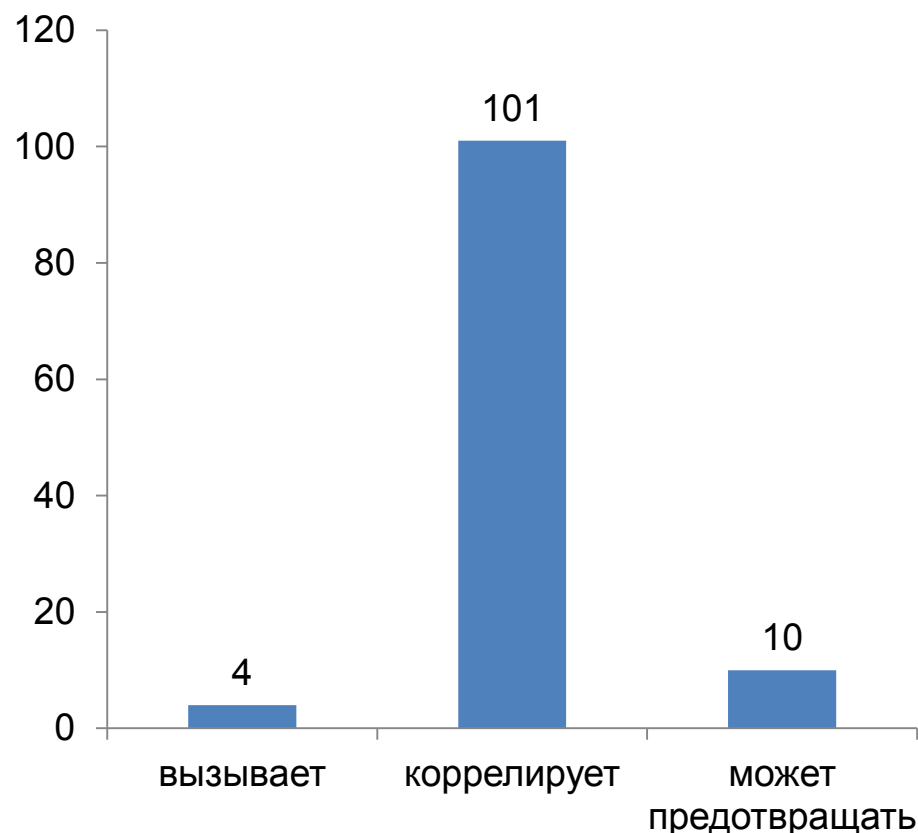
Название гена	Ген	Подтип деменции	Организм	Тип дефекта	Тип взаимосвязи	PubMedID
5-hydroxytryptamine receptor 1A	HTR1A	Vascular dementia	h	частичный агонизм	может предотвращать	16817981
72 kDa type IV collagenase	MMP2	Vascular dementia	r	увеличение экспрессии	коррелирует	16385583
Acetylcholinesterase	ACHE	Vascular dementia	h	ингибирование	может предотвращать	12417373
Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	CADASIL	h	снижение экспрессии	коррелирует	18176893
Alpha-1A adrenergic receptor	ADRA1A	Vascular dementia	h	ингибирование	может предотвращать	25243157
Angiopoietin-4	ANGPT4	Mixed	h	полиморфизм	коррелирует	20596041
.....						

115 генов ассоциированных с сосудистой деменцией

Тип дефекта

активация	3
изменение экспрессии	7
ингибирование	5
мутация	3
нарушение фолдинга; отсутствие; снижение процессинга; мутация	1
полиморфизм	24
полиморфизм; снижение экспрессии	1
полиморфизм; увеличение экспрессии	2
снижение фосфорилирования	1
снижение экспрессии	31
снижение экспрессии; увеличение экспрессии	2
увеличение активности	4
увеличение экспрессии	29
усиление фосфорилирования	1
частичный агонизм	1

Тип взаимосвязи



Известные мишени (24), которые используются для лечения сосудистой деменции

Мишень	Механизм действия	Ген
Adenosine receptor A1	Antagonist	ADORA1
Adenosine receptor A3	Antagonist	ADORA3
cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase A	Inhibitor	PDE3A
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A	Antagonist	GRIN2A
5-hydroxytryptamine receptor 3A	Antagonist	HTR3A
Alpha-7 nicotinic cholinergic receptor subunit	Antagonist	CHRNA7
D(2) dopamine receptor	Agonist	DRD2
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B	Antagonist	GRIN2B
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 3A	Antagonist	GRIN3A
Alpha-1A adrenergic receptor	Antagonist	ADRA1A
Mineralocorticoid receptor	Antagonist	NR3C2
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C	Inhibitor	CACNA1C
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D	Inhibitor	CACNA1D
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1F	Inhibitor	CACNA1F
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1S	Inhibitor	CACNA1S
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-1	Inhibitor	CACNB1
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2	Inhibitor	CACNB2
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-3	Inhibitor	CACNB3
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-4	Inhibitor	CACNB4
Glutamate receptor ionotropic AMPA	Stimulator	GRIA1; GRIA2; GRIA3; GRIA4
Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B	Inhibitor	CACNA1B
D(1A) dopamine receptor	Agonist	DRD1
Phosphodiesterase 1	Inhibitor	PDE1A; PDE1B; PDE1C
Translocator protein	Binding	TSPO

Отбор биологических процессов GeneOntology (GO), сигнальных и регуляторных путей KEGG, связанных с сосудистой деменцией

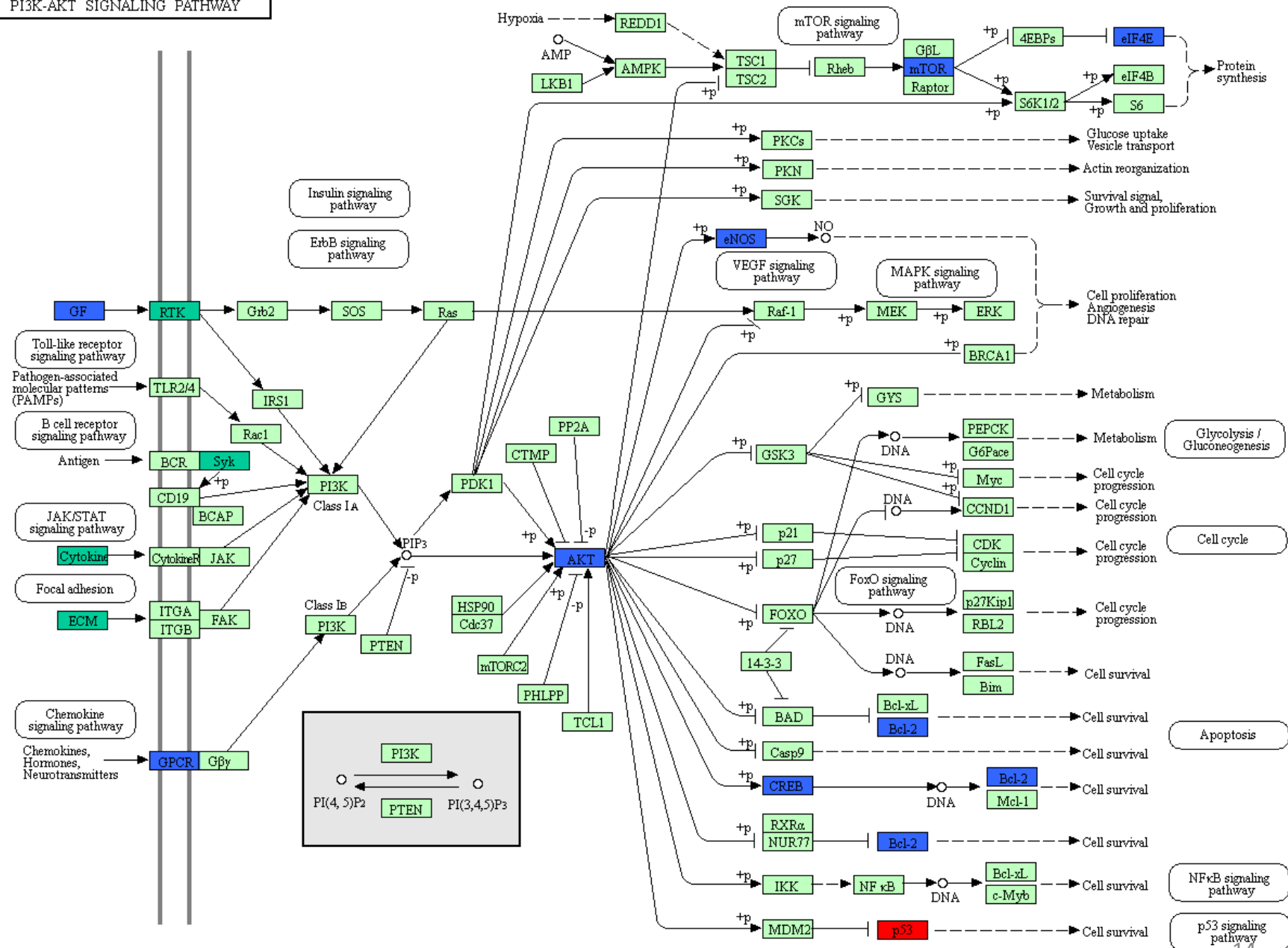
Был сделан с использованием метода анализа обогащенных генных сетей (Gene set enrichment analyses) для генов связанных с СД с использованием веб-сервиса DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>).

Результаты:

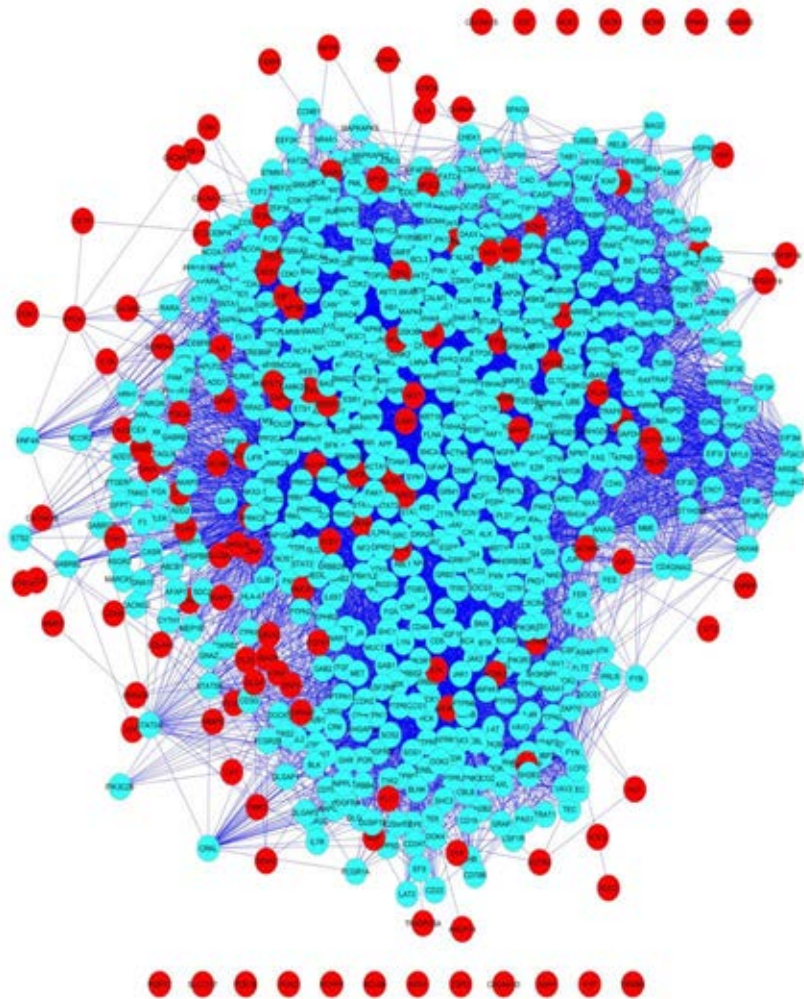
Angiogenesis
Atherosclerotic processes
Autophagy
Cell-cell junction and cell-matrix adhesion
Cognition, learning, memory, behavior
Glucose homeostasis/response to insulin
Inflammatory response
.....

AMPK signaling pathway
Apoptosis
cAMP signaling pathway
Cholinergic synapse
Cytokine-cytokine receptor interaction
Estrogen signaling pathway
Focal adhesion
.....

PI3K-AKT SIGNALING PATHWAY



Картирование 115 отобранных генов и 29 генов, кодирующих известные мишени, всего 140 генов на сеть функционально связанных генов



Сеть включает в себя 13460 белков и 141296 взаимодействий:

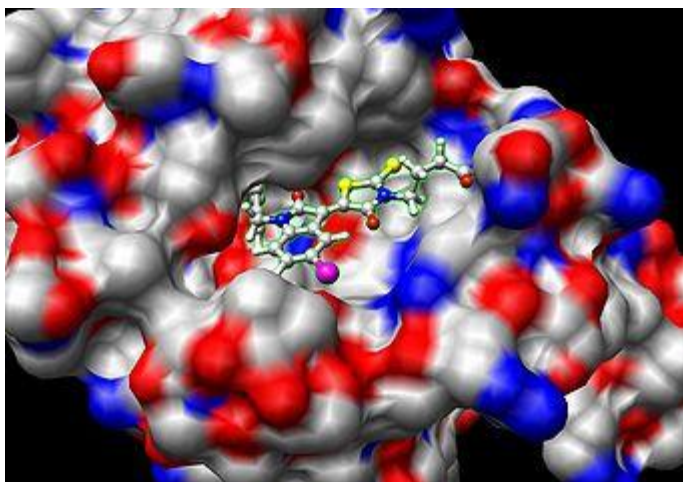
- Белок-белковые взаимодействия
- Регуляторные взаимодействия (белок-ДНК)
- Непрямые взаимодействия из метаболических путей

Ghiassian S.D. et al. PLoS Comput. Biol. 2015, 11(4), e1004120

Отобрано 600 генов (белков), которые могут быть связаны с сосудистой деменцией

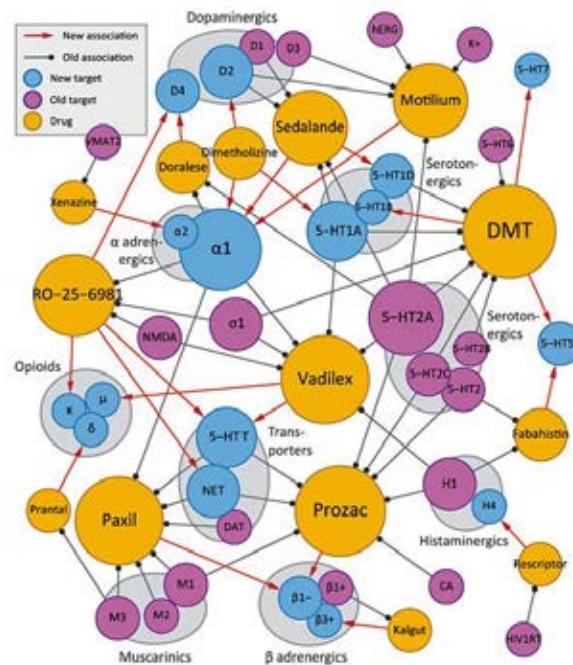
Название гена	Ген	Ранг
Protein kinase C alpha type	PRKCA	1
Voltage-dependent calcium channel gamma-2 subunit	CACNG2	2
Amyloid beta A4 protein	APP	3
Protein kinase C beta type	PRKCB	4
Transcription factor Sp1	SP1	5
Nitric oxide synthase, brain	NOS1	6
Protein kinase C epsilon type	PRKCE	7
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2D	GRIN2D	8
Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	SPTAN1	9
Presenilin-1	PSEN1	10
Protein kinase C zeta type	PRKCZ	11
B2 bradykinin receptor	BDKRB2	12
Ribosomal protein S6 kinase beta-2	RPS6KB2	13
Protein kinase C delta type	PRKCD	14
Interleukin-1 receptor type 1	IL1R1	15
Guanine nucleotide-binding protein G	GNAZ	16
Protein kinase C gamma type	PRKCG	17
Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1	HAND1	18
Actin filament-associated protein 1	AFAP1	19
Tissue factor	F3	20

Компьютерные методы для оценки взаимодействия соединений с белками-мишенями



Структура мишени: докинг

- 473 из 600 белков имеют записи в PDB
- 36 мишеней имеют PDB записи в комплексе с лекарствами



Структуры лиганлов: (Q)SAR

База данных ChEMBL:

- для 370 мишеней есть данные о тестированных соединениях
- 692 лекарств взаимодействуют с 106 мишенями

PASS: Prediction of Activity Spectra for Substance

(предсказывает 3612 механизмов действия)

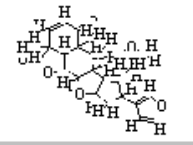
PASS - D:\2D-structure\all.sdf

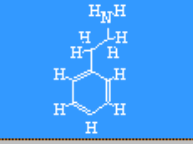
File Base Predict View Options Help

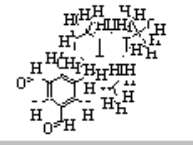
D:\РФФИ-Индия 2016\PASS2015-mechanisms of known associations.SAR

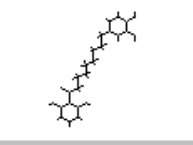
D:\2D-structure\all.sdf

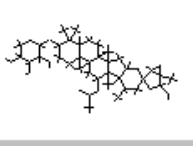
5x5 4x4 3x3 2x2 Molecular Structure MNA

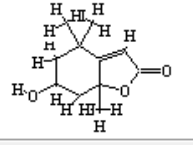
1 

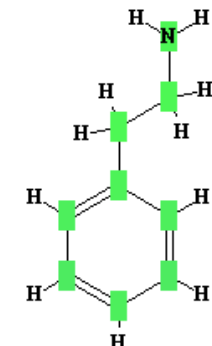
2 

3 

4 

5 

6 



SAR Base Information

Substances	666479
Descriptors	90018
Activity Types	9686
Selected Activity Types	3934 Modified
Average IEP	2.869, %
Prediction	Enabled

5 Hydroxytryptamine release stimulant

Known General Mechanisms Toxicity Antitargets Metabolism

2390 of 3612 Possible Mechanisms of Action at Pa > Pi

0.940	0.003	5 Hydroxytryptamine release stimulant
0.907	0.014	Transferase stimulant
0.890	0.004	Taurine dehydrogenase inhibitor
0.886	0.002	Polyamine-transporting ATPase inhibitor
0.886	0.003	Venombin AB inhibitor
0.878	0.004	Glucose oxidase inhibitor
0.871	0.003	Ompin inhibitor
0.870	0.006	Protein disulfide-isomerase inhibitor
0.858	0.001	5 Hydroxytryptamine 7B antagonist
0.864	0.014	Membrane integrity agonist
0.847	0.003	NADPH-cytochrome-c2 reductase inhibitor
0.852	0.008	Transferase inhibitor
0.848	0.012	Signal peptidase II inhibitor
0.849	0.014	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
0.838	0.004	Glutamyl endopeptidase II inhibitor
0.834	0.003	Limulus clotting factor C inhibitor
0.834	0.004	Fusarinine-C ornithinesterase inhibitor
0.832	0.004	N-benzoyloxycarbonylglycine hydrolase inhibitor
0.829	0.004	Exoribonuclease II inhibitor
0.833	0.008	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1 inhibitor
0.826	0.002	MAP kinase stimulant
0.827	0.005	Arginine 2-monooxygenase inhibitor
0.826	0.005	Nicotinic alpha6beta3beta4alpha5 receptor antagonist
0.817	0.004	Dimethylargininase inhibitor
0.825	0.012	Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor
0.810	0.004	Limulus clotting factor B inhibitor

17 Substructure Descriptors; 0 new. Mol.Mass: 121.18. Stereo C: 0.
There are 20 known activities.
2554 of 3934 Possible Activities
0 of 0 Possible Pharmacological Effects
2390 of 3612 Possible Mechanisms of Action
1 of 1 Possible Toxic and Adverse Effects
71 of 108 Possible Antitargets
1 of 2 Possible Metabolism-Related Actions
3 of 4 Possible Gene Expression Regulation
12 of 19 Possible Transporters-Related Actions

2/2073 0.940 0.003 5 Hydroxytryptamine release stimulant

18

Как PASS прогнозирует спектр биологической активности?

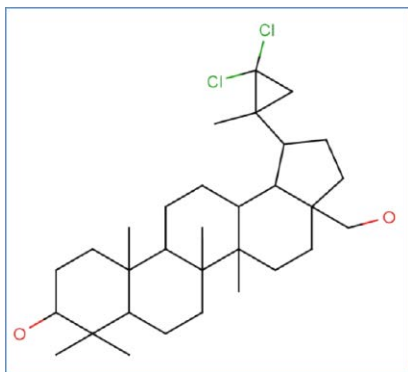
Структурная формула нового соединения



Оценка вероятности наличия конкретного вида биологической активности



Предсказанный спектр биологической активности



Anxiolytic
Sedative
5HT1A Inhibitor
Carcinogen

Pa	Pi	Activity
0.853	0.020	Anxiolytic
0.694	0.035	Sedative

Pa – вероятность наличия, *Pi* – вероятность отсутствия активности

Основные характеристики PASS 2014

Обучающая выборка	959,801 лекарств, клинических кандидатов, фармакологических и токсических веществ
Биологическая активность	7,158 видов биологической активности (активно/неактивно)
Химическая структура	MNA дескрипторы [1, 2]
Математический алгоритм	Байесовские оценки (отобран на основе сравнения множества различных подходов) [2]
Валидация	Средняя точность прогноза при скользящем контроле с исключением по одному ~95% [2]; робастность показана в специальных компьютерных экспериментах [3]

Свободно доступный веб-сервис PASSOnline: <http://www.way2drug.com/PASSOnline>

1. Filimonov D.A. et al. J. Chem. Inform. Computer Sci., 1999, 39, 666. 2. Filimonov D.A., Poroikov V.V. In: Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening. RSC Publ., 2008, 182-216. 3. Poroikov V.V. et al. J. Chem. Inform. Computer Sci., 2000, 40, 1349.

Из 115 генов с известной ассоциацией с сосудистой деменцией были отобраны 30

Название гена	Ген	Тип дефекта	Тип взаимосвязи
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	полиморфизм; увеличение экспрессии	коррелирует
Choline O-acetyltransferase	CHAT	увеличение активности	коррелирует
Phospholipase A2, membrane associat...	PLA2G2A	Увеличение активности	коррелирует
Apolipoprotein B-100	APOB	увеличение экспрессии	коррелирует
Apoptosis regulator BAX	BAX	увеличение экспрессии	коррелирует
Cellular tumor antigen p53	TP53	увеличение экспрессии	коррелирует
Endothelin-1	EDN1	увеличение экспрессии	коррелирует
Excitatory amino acid transporter 2	SLC1A2	увеличение экспрессии	коррелирует
Gamma-enolase	ENO2	увеличение экспрессии	коррелирует
Glutamate receptor 2	GRIA2	увеличение экспрессии	коррелирует
Kallikrein-6	KLK6	увеличение экспрессии	коррелирует
Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3	увеличение экспрессии	коррелирует
NADPH oxidase 1	NOX1	увеличение экспрессии	коррелирует
Neurofilament light polypeptide	NEFL	увеличение экспрессии	коррелирует
Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	увеличение экспрессии	коррелирует
Tumor necrosis factor	TNF	увеличение экспрессии	коррелирует
Vascular cell adhesion protein 1	VCAM1	увеличение экспрессии	коррелирует
Vascular endothelial growth factor	VEGFA	увеличение экспрессии	коррелирует
Vitronectin	VTN	увеличение экспрессии	коррелирует
Caspase-3	CASP3	усиление фосфорилирования	коррелирует
Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2	GABBR2	активация	может предотвращать
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	активация	может предотвращать
Type-2 angiotensin II receptor	AGTR2	активация	может предотвращать
Acetylcholinesterase	ACHE	ингибирование	может предотвращать
Alpha-1A adrenergic receptor	ADRA1A	ингибирование	может предотвращать
Cholinesterase	BCHE	ингибирование	может предотвращать
Sodium-dependent noradrenaline transporter	SLC6A2	ингибирование	может предотвращать
Substance-P receptor	TACR1	ингибирование	может предотвращать
Brain-derived neurotrophic factor	BDNF	увеличение экспрессии	может предотвращать
5-hydroxytryptamine receptor 1A	HTR1A	частичный агонизм	может предотвращать

Механизмы действия PASS, соответствующие отобранным лекарственным мишеням среди известных ассоциаций

No	Activity Type	Number	AUC, %
1	5 Hydroxytryptamine 1A agonist	1205	99.1
2	Acetylcholinesterase inhibitor	3107	97.7
3	Adrenaline uptake inhibitor	3088	98.9
4	Alpha 1a adrenoreceptor antagonist	2912	98.7
5	Angiotensin AT2 receptor agonist	7	98.9
6	Apolipoprotein B-100 inhibitor	92	99.9
7	BAX expression inhibitor	67	88.1
8	BDNF expression enhancer	19	80.1
9	Butyrylcholinesterase inhibitor	1588	98.7
10	Caspase 3 inhibitor	1077	97.6
11	Choline acetyltransferase inhibitor	7	74.3
12	ENO2 expression inhibitor	14	95.2
13	Endothelin A receptor antagonist	2121	99.8
14	Endothelin B receptor antagonist	1168	99.7
15	Endothelin-converting enzyme 1 inhibitor	319	99.3
16	Excitatory amino acid transporter 2 inhibitor	49	100
17	GABA B receptor agonist	23	98.4
18	Glutamate (mGluR2) antagonist	279	100
19	Kallikrein 6 inhibitor	4	100
20	Metalloproteinase-3 inhibitor	1017	99.2
21	Metalloproteinase-9 inhibitor	2291	98.9
22	NADPH oxidase 1 inhibitor	61	99.7
23	NEFL expression inhibitor	5	91.2
24	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist	2531	98.9
25	Phospholipase A2 IIa inhibitor	256	99.7
26	Plasminogen activator inhibitor antagonist	308	99.4
27	Substance P antagonist	1648	99.3
28	Tumour necrosis factor antagonist	904	93.7
29	VCAM-1 antagonist	173	98.0
30	Vascular endothelial growth factor antagonist	12725	96.4

Для поиска соединений, взаимодействующих с отобранными мишенями использовалась выборка структур фитокомпонентов

1976 фитокомпонентов из 561 лекарственного растения, для которых известны терапевтические эффекты, связанные с лечением расстройств памяти и заболеваний, приводящих к развитию сосудистой деменции.



Количество соединений, для которых предсказан механизм действия, связанный с сосудистой деменцией

1. Acetylcholinesterase inhibitor – 11 структур;
2. Adrenaline uptake inhibitor – 6 структур;
3. Butyrylcholinesterase inhibitor – 5 структур;
4. Excitatory amino acid transporter 2 inhibitor – 2 структур;
5. Plasminogen activator inhibitor antagonist – 9 структур;
6. Tumour necrosis factor antagonist – 14 структур;
7. Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase inhibitor – 10 структур;
8. Kynureninase inhibitor – 26 структур.

Для 1976 фитокомпонентов был сделан прогноз 32 отобранных механизмов действия

Из 600 генов были отобраны 175 генов, с которыми связаны 187 механизмов действия предсказываемых PASS

Pa	Number	Activity type	
0.854	712	CF transmembrane conductance regulator agonist	Для 1976 фитокомпонентов был сделан прогноз 187 механизмов действия
0.841	696	Insulin like growth factor 1 agonist	
0.788	227	SMAD3 inhibitor	
0.688	200	Interleukin 2 agonist	
0.993	107	Hypoxia inducible factor 1 alpha inhibitor	
0.634	75	Mcl-1 antagonist	
0.857	65	Ribosomal protein S6 kinase alpha 3 inhibitor	
0.939	47	Factor XIIIa stimulant	
0.937	46	Estrogen receptor alpha antagonist	
0.789	46	Protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitor	
0.919	44	T-cell protein-tyrosine phosphatase inhibitor	Показаны 25 механизмов действия, которые предсказывались для более 5 фитокомпонентов с вероятностью более 50%
0.623	43	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase II alpha inhibitor	
0.927	30	Phospholipase C gamma 1 inhibitor	
0.699	19	EphB2 antagonist	
0.601	18	Transcription factor STAT3 inhibitor	
0.766	17	Beta tubulin antagonist	
0.970	16	Retinoic acid alpha receptor antagonist	
0.870	14	Androgen agonist	
0.834	9	Protein-tyrosine phosphatase 2C inhibitor	
0.863	8	GABA A receptor antagonist	
0.848	8	Opioid delta receptor antagonist	
0.863	8	Topoisomerase II alpha inhibitor	

Отобрано 10 наиболее перспективных для лечения сосудистой деменции

Механизм действия	UniProt ID	Ранк	Известные эффекты	PubMed ID
Alpha 2A adrenergic receptor antagonists	P08913	49	Increase special memory acquisition; increase learning and memory; potentiate inhibition of acetylcholinesterase; antidiabetic (increase insulin secretion; reduce blood glucose); Anti-parkinsonism: potentiate dopamine system	23512937; 24534171; 10650154; 18086828; 11907173; 8739550; 9007838; 2875910; 11712871; 21418144; 9918591; 22169246
Opioid delta receptor agonist	P41143	63	Neuroprotection, promotion of angiogenesis, increasing in insulin signaling	23764370; 21515255; 21250979; 11735084; 11735084; 1657461
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator agonist	P13569	104	Neuroprotection, increase insulin secretion	14757935; 23221371; 19654104; 26547591; 24801204
Insulin like growth factor 1 receptor agonist	P08069	109	Neuroprotection, antidiabetic, dual action on atherosclerosis, hypotensive effect	22342912; 23721666; 23717526; 24401233; 27154724; 24943302; 18477064; 17906644; 24995704
Androgen receptor agonist	P10275	289	Dual effect on cerebral ischemia consequences, atherosclerosis treatment, antidiabetic, anti-obesity, promotion of angiogenesis	18395206; 19427328; 27941939; 19436313; 24323721; 19002196; 24688120; 25550469; 22566500; 24653668; 27133133; 23723256
Protein phosphatase 1B inhibitor	P20417	507	Angiogenesis promotion (anti-ischemic effect), antidiabetic, dual action on atherosclerosis, anti-obesity	24982127; 20814956; 21676396; 10409197; 26523876; 19687357

Благодарности

Сотрудников кафедры фармацевтических наук и исследований лекарств, Пенджабского университета Индии

Профессор Раджеш Гоел
Аспирант Сандип Кумар

Сотрудников лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств, Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича

н.с. Сергей М. Иванов
н.с. Татьяна А. Глариозова
м.н.с. Павел В. Погодин

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-54-45016).

