**Разработка синтетических лигандов пептидной природы для связывания интерлейкина 6**

Рябцева Т.В.

*Белорусский государственный медицинский университет, научно-исследовательская часть, научная группа гемо- и лимфосорбции,*

*г.Минск, Беларусь*

**Актуальность.** Интерлейкин 6 (ИЛ-6, IL-6) характеризуется широким спектром действия как на клеткииммунной системы, так и на клетки организма в целом, оказывая гормоноподобный эффект и поддерживая гомеостатические процессы. В зависимости от микроокружения данный цитокин может проявлять и про-, и антивоспалительныесвойства. В настоящее время IL6 рассматривается в качестве перспективной мишени для разработки противовоспалительной терапии при многих патологических состояниях (сепсис, аутоиммунная патология, аллергические заболевания) [1].

ИЛ-6 продуцируется различными типами клеток, таких какТ-клетки, В-клетки, моноциты, фибробласты, кератиноциты, эндотелиальные клетки, мезангиальные клетки, адипоциты и некоторые опухолевые клетки. Рецептор ИЛ-6 (ИЛ-6Р, IL-6R) в основном экспрессируется на Т-клетках, моноцитах, активированных В-клетках и нейтрофилах.

Когда в 1986 году IL-6 был впервые идентифицирован, его основной характеристикой являлась способность индуцировать активацию и пролиферацию Т-клеток, а также участие в дифференцировке В-клеток в плазматические клетки. Сейчас ИЛ-6 рассматривается как плейотропный цитокин с гормоноподобной активностью, который участвует в патогенезе сосудистых заболеваний, нарушениях липидного обмена, резистентности к инсулину посредством влияния на регуляцию нейроэндокринной и нейропсихологической систем.

 Нормальные физиологические концентрации IL-6 в сыворотке крови человека являются относительно низкими (1-5 пг/мл), однако они быстро увеличиваются в условиях патологического процесса и могут достигать величин в мг/мл. Во многих случаях ИЛ-6 является более чувствительным и ранним прогностическим маркеров развития воспаления, чем С-реактивный белок.

Участие ИЛ-6 доказано при таких заболеваниях как ревматоидный артрит, Болезнь Каслмана и мезангиальный пролиферативный гломерулонефрит. Кроме того, ИЛ-6 является фактором роста некоторых опухолей, таких как множественная миелома и карцинома почки. ИЛ-6 участвует в развитии кахексии, предположительно через стимуляцию синтеза белков острой фазы клетками печени.

На сегодняшний день в мировой медицинской практике разрабатан и успешно применяется препарат – Тоцилизумаб, представляющий собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело к человеческому рецептору IL-6 [2]. Однако применение препаратов на основе моноклональных антител связано с развитием целого ряда побочных эффектов: реакции гиперчувствительности замедленного типа, инфекционные осложнения (туберкулез, вирусные гепатиты), лимфопролиферативные заболевания, лейкопения, тромбоцитопения и нейтропения [3]. Кроме того, одним из важных недостатков лечения с применением моноклональных антител является стоимость. Таким образом, поиск новых способов регулирования концентрации провоспалительных цитокинов в плазме крови с использованием синтетических пептидных лигандов является актуальной и перспективной задачей современной медицинской науки. Во-первых, олигопептид является менее чужеродным антигеном, чем химерные моноклональные антитела, во-вторых – он более дешевый.

**Целью** работы являлось молекулярное моделирование пептидов для связывания ИЛ-6. Для достижения были решены следующие **задачи:** изучены трехмерные модели молекулярных структур ИЛ6 в комплексе с рецептором к ИЛ-6 и gp 130, спрогнозированы структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов, проведена оценка свободной энергии связывания для отбора олигопептидов, способных максимально эффективно взаимодействовать с ИЛ-6.

**Материалы и методы.** Построение пептидной последовательности в PDB формате проводили в программе PyMol. Визуализация комплекса лиганд-рецептор – в программе Chimera. Молекулярный докинг проводили в программе Chimera с помощью программного обеспечения AutodockVina. AutoDock выбран в качестве программы для моделирования, поскольку является наиболее часто цитируемой в литературе (примерно в 27% литературы по докингу), кроме этого AutoDock является бесплатной программой для образовательных учреждений. Для решения задач докинга использовали модели белковых молекул, находящиеся в базе данных NCBI. Модели представлены в виде pdb-файлов (ProteinDataBank) и содержат информацию о трехмерной структуре молекулы, полученную в результате различных методов исследования (X-raydiffraction, NMR, гомологичное моделирование) [4].Для изучения и анализа использовали следующие структуры из ProteinDataBank: 1I1R (комплекс цитокина с цитокинсвязывающей областью gp130) и 1P9M (комплекс ИЛ6/рецептор ИЛ6/gp130).Статистическую обработку и построение графиков – GraphPadPrism6.

**Результаты и обсуждение.** Методом визуального анализа выделяли область взаимодействия цитокина ИЛ6 с растворимым рецептором и gp130. Область взаимодействия ИЛ6 с gp130 предполагает три точки соприкосновения. Для более подробного анализа были выделены следующие полипептиды:

-X-Ile-Lys-X-Y-Ile- (1),

-X-Thr-Val-Y-Phe-Z- (2),

-Glu-X-Ala-Thr-Y-Lys-Phe-Ala-Asp- (3).

Далее измеряли расстояние между атомами аминокислот в выделенных последовательностях на gp130 и атомами аминокислот ИЛ6. Дальнейшее конструирование пептидов осуществляли на базе аминокислотных остатков gp130 наиболее близко расположенных к ИЛ6. Оптимальное расстояние находилось в диапазоне от 2 до 4Å.

Для молекулярного докинга были сконструированы 19 пептидов. Проведен анализ и вычислены энергии связывания сконструированных пептидов с ИЛ6 методом жесткого докинга с помощью AutodockVina. Полученные данные приведены в Таблице 1.

Таблица 1.

Значения свободной энергии связывания с ИЛ-6 пептидов, сконструированных по анализу 3D модели взаимодействия ИЛ6 с gp130.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Пептид | Свободная энергия связывания |
| Медиана (мин.;макс.) |
| 1 | -X-Phe | -5,500 (4.900;6,100) |
| 2 | -Y-His | -4,900 (4,800;5,600) |
| 3 | -Z-Ala | -5,700 (5,500;6,500) |
| 4 | -Lys-X-Ala | -5,650 (5,300;6,100) |
| 5 | -Ala-Y-His | -5,300 (4,900;6,000) |
| 6 | -Glu-Z-Ala | -5,900 (5,700;6,600) |
| **7** | **-X-Ala-Thr-Y** | **-6,350 (5,900;7,000)** |
| 8 | -Y | -3,000 (2,800;3,200) |
| 9 | -X-Ise | -5,150 (4,600;5,500) |
| 10 | -Ser-Y | -4,600 (4,300;5,200) |
| 11 | -Z-Ile | -4,800 (4,500;5,300) |
| 12 | -Ser-X-Ile | -5,000 (4,500;5,400) |
| 13 | -Y-Ile-Lys | -5,000 (4,800;5,800) |
| 14 | -Phe-Z | -5,900 (5,000;6,200) |
| 15 | -X-Tyr | -5,850 (5,500;6,600) |
| **16** | **Val-Y-Phe-Z** | **-6,050 (5,600;6,700)** |
| 17 | -X-Thr-Z-Y-Phe | -5,900 (5,500;6,400) |
| **18** | **-X-Phe-Val** | **-6,600 (6,300;6,900)** |
| 19 | -Ser-Z-Val | -5,150 (4,900;5,500) |

Механизм взаимодействия ИЛ-6 с клеточной поверхностью предполагает взаимодействие с gp130 и с растворимым рецептором к ИЛ-6 (ИЛ-6R). Поэтому далее методом визуального анализа изучали область взаимодействия цитокина ИЛ-6 с рецептором ИЛ-6R. Область взаимодействия ИЛ6 с ИЛ-6R предполагает семь точек соприкосновения. Для более подробного анализа были выделены следующие полипептиды:

-X- Lys-Phe-Gln-X-Ser-Pro-Y- (1),

-Val-Pro-Glu-X-Asp-Ser-Ser-Y-Tyr (2),

-Thr-Y- Phe-Gln-Gly-Cys-Y-Ile-Leu (3),

-Glu-X-Phe-Gly-Gln-Y-X-Trp (4),

-X-Lys-Ser-Y-Pro-Leu-Ser (5),

-Met-Val-Lys-X-Y-Gln-His (6),

-Ser-X-Phe-Y-Tyr-Arg-Leu-Z-Phe (7).

Измеряли расстояние между атомами аминокислот в выделенных последовательностях на ИЛ-6R и атомами аминокислот ИЛ-6. Дальнейшее конструирование пептидов осуществляли на базе аминокислотных остатков наиболее близко расположенных друг к другу. Для молекулярного докинга сконструировали 19 пептидов. Данные анализа энергии связывания сконструированных пептидов с ИЛ6 приведены в Таблице 2.

Таблица 2.

Значения свободной энергии связывания с ИЛ-6 пептидов, сконструированных по анализу 3D модели взаимодействия ИЛ6 с R-ИЛ6

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Пептид | Свободная энергия связывания |
| Медиана (мин.;макс.) |
| 1 | Ser-X-Phe | -5,800 (5,400;6,600) |
| 2 | Y-Arg-Leu | -5,650 (5,100;5,900) |
| 3 | Ser-Z | -5,300 (4,900;6,100) |
| 4 | X-Arg | -5,700 (5,300;6,200) |
| **5** | **Ser-Y-Tyr** | **-6,150 (5,200;6,800)** |
| 6 | X-Tyr-Arg | -5,800 (5,600;6,200) |
| 7 | Lys-X-Leu-Z | -5,400 (5,000;5,600) |
| 8 | X-Asp-Y | -5,100 (4,800;5,400) |
| 9 | Asp-Z-Gln | -5,500 (5,300;5,800) |
| 10 | X-Leu | -5,000 (4,600;5,500) |
| 11 | Ser-Y-Leu-Z | -5,300 (4,900;5,500) |
| 12 | X-Leu-Ser | -5,000 (4,600;5,800) |
| 13 | Leu-Z | -4,700 (4,400;5,200) |
| 14 | X-Glu-Y-Gly | -5,950 (5,300;6,800) |
| **15** | **Phe-Z-X** | **-6,300 (6,000;6,900)** |
| 16 | Val-Y-Glu | -5,550 (5,200;6,200) |
| 17 | X-Phe-Z-Gln | -5,350 (5,200;5,700) |
| **18** | **Phe-X-Gln-Y** | **-6,100 (5,800;6,400)** |
| 19 | Phe-Z-X | -5,700 (5,400;6,100) |

**Выводы.** В результате молекулярного моделирования и математической оценки свободной энергии связывания из 38 пептидов были выбраны 6 наиболее перспективных для дальнейшего синтеза и оценки их специфической активности по связыванию ИЛ-6 *in vitro*.

**Литература**

1. HunterC.A., JoneaS.A IL-6 as a keystone cytokine in health and disease / Nature immunology, 2015, V.16, N5, p.448-481
2. Mihara M., Hashizume M., Yoshida H. et al. IL6 / IL6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions / Clinical science, 2012, N122, p.143-159
3. Palladino M.A., Bahjat F.R., Theodorakis E.A. Anti-TNF-α therapies: the next generation / Nature reviews, 2003, V2, p.736-753
4. Sotriffer C.A., Flader W., Winger R.H. et al. Automated docking of ligands to antibodies: method and applications / Methods, 2000, V.20, p.280-291