

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 573.6.086.83
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-350-358>

Поступила в редакцию 28.03.2019
 Received 28.03.2019

Т. В. Рябцева¹, Д. А. Макаревич², Е. М. Ермола², В. П. Голубович², В. В. Кирковский¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ И ВИРТУАЛЬНЫЙ ДОКИНГ ОЛИГОПЕПТИДОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ И ЭЛИМИНИРОВАНИЯ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6

Аннотация. Интерлейкин-6 (ИЛ-6) рассматривается в качестве перспективной мишени для разработки противовоспалительной терапии при многих патологических состояниях (сепсис, аутоиммунная патология, аллергические заболевания). Цель данного исследования – разработка и изучение эффективности олигопептидов, предназначенных для связывания ИЛ-6. Для достижения цели были поставлены и успешно решены следующие задачи: на основании изучения трехмерных моделей молекулярных структур ИЛ-6 в комплексе с рецептором к ИЛ-6 и gp130 спрогнозированы структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов; для выявления максимально эффективного олигопептида проведена оценка их свободной энергии связывания с ИЛ-6; изучена эффективность олигопептидов по изменению концентрации ИЛ-6 в модельном растворе после контакта с экспериментальными олигопептидами.

В статье представлены результаты вычисления энергии связывания 62 пептидов, сконструированных с помощью программы PyMol, с ИЛ-6. Энергию связывания олигопептидов с ИЛ-6 рассчитывали в программе Chimera с помощью приложения AutodockVina. Представлены также результаты экспериментов *in vitro*, в которых синтезированные 7 секстапептидов, 2 тетрапептида и 3 трипептида взаимодействовали с рекомбинатным ИЛ-6. Эффективность пептидов рассчитывали по снижению концентрации цитокина в растворе в процентах от исходной концентрации.

Анализ свободной энергии связывания показал, что эффективность связывания увеличивается с возрастанием общего числа аминокислот, в частности ароматических, в олигопептиде. Корреляционный анализ показал, что метод молекулярного моделирования не является абсолютно эффективным для прогнозирования структуры олигопептида, однако может использоваться в качестве одной из предварительных ступеней анализа взаимодействия между молекулами и изучения оптимальных точек их соприкосновения для принятия решения о целесообразности синтеза и дальнейшего исследования лигандов. В результате экспериментов *in vitro* были определены два наиболее перспективных олигопептида для дальнейшего синтеза с целью использования их в качестве лигандов для связывания ИЛ-6 в плазме крови человека.

Ключевые слова: интерлейкин-6, молекулярное моделирование, докинг, пептиды

Для цитирования: Молекулярное конструирование и виртуальный докинг олигопептидов для связывания и элиминирования из плазмы крови интерлейкина-6 / Т. В. Рябцева [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 350–358. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-350-358>

T. V. Ryabzeva¹, D. A. Makarevich², E. M. Ermola², V. P. Golubovich², V. V. Kirkovskiy¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR DESIGN AND VIRTUAL DOCKING OF OLIGOPEPTIDES FOR BINDING AND ELIMINATION INTERLEUKIN-6 FROM BLOOD PLASMA

Abstract. Binding of interleukin-6 (IL-6) is the perspective target for the anti-inflammatory therapy in many pathological conditions (sepsis, autoimmune pathology, allergic diseases). The aim of this work was to develop and study the binding IL-6 oligopeptides. To achieve the goal, were set and successfully solved the following tasks: studying three-dimensional models of molecular structures of IL-6 in combination with the R-IL-6 and gp130, prediction and virtual synthesis low molecular weight oligopeptides; evaluating the free energy of IL-6 binding for identity the most effective oligopeptide; studying the changing the concentration of IL-6 in the model solution after contact with experimental oligopeptides. In the article presents the binding IL-6 energy of 62 peptides, designed using the PyMol. Energy was calculated in the Chimera program using the AutodockVina application. There are also presented results of *in vitro* experiments interacting 7 sextapeptides, 2 tetrapeptides, and 3 tripeptides with recombinant IL-6. The effectiveness of the peptides was calculated by reducing the concentration of cytokine in solution as a percentage of the initial concentration.

The free binding energy has shown that the efficiency of binding increases with an increase in the total number of amino acids and, in particular, of aromatic amino acids in the oligopeptide. Correlation analysis showed that the molecular modeling

method is not absolutely effective for predicting the structure of an oligopeptide, however, it can be used as one of the preliminary steps for analyzing the interaction between molecules and studying the optimal interaction points. Two oligopeptides were identified as the most promising for further synthesis as the ligands for binding and evaluating IL-6 in human blood plasma.

Keywords: interleukin-6, molecular design, docking, peptides

For citation: Ryabzeva T. V., Makarevich D. Al., Ermola E. M., Golubovich V. P., Kirkovskiy V. V. Molecular design and virtual docking of oligopeptides for binding and elimination interleukin-6 from blood plasma. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 350–358 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-350-358>

Введение. Интерлейкин-6 (ИЛ-6) характеризуется широким спектром действия как на клетки иммунной 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 противовоспалительные свойства. В настоящее время ИЛ-6 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 как Т-клетки, В-клетки, моноциты, фибробласты, кератиноциты, эндотелиальные клетки, мезангиальные клетки, адипоциты и некоторые опухолевые клетки. Рецептор ИЛ-6 (ИЛ-6Р) в основном экспрессируется на Т-клетках, моноцитах, активированных В-клетках и нейтрофилах. Когда в 1986 г. ИЛ-6 был впервые идентифицирован, его основной характеристикой являлась способность индуцировать активацию и пролиферацию Т-клеток, а также участвовать в дифференцировке В-клеток в плазматические клетки. Сейчас ИЛ-6 рассматривается как плейотропный цитокин с гормоноподобной активностью, который участвует в патогенезе сосудистых заболеваний, нарушении липидного обмена, инсулинорезистентности посредством влияния на регуляцию нейроэндокринной и нейропсихологической систем [2].

В экспериментах на животных было показано, что ИЛ-6 играет ключевую роль в повышении температуры тела в острой фазе воспаления, а также в продукции белков острой фазы воспаления гепатоцитами [3]. Подкожное введение человеческого ИЛ-6 (1–10 мкг/кг в сутки) в течение 7 сут приводит к увеличению концентрации сывороточного амилоида А (SAA), С-реактивного белка (CRP), α 1-кислого гликопротеина, α 1-антихимотрипсина, гаптоглобина, α 1-антитрипсина, фибриногена, компонента комплемента С3 и церулоплазмينا [4]. Кроме того, доказано, что ИЛ-6 является важным фактором поддержания гомеостаза в печени. ИЛ-6 наряду с другими провоспалительными цитокинами участвует в ангиогенезе, регулирует процессы пролиферации и активации эндотелиальных клеток, а также миграцию иммунокомпетентных клеток по эндотелию сосудов. После инъекции ИЛ-6 наблюдается демаргинация внутрисосудистого пула нейтрофилов, а в периферической крови отмечается нейтрофилия: первая волна – через 1,5 ч, вторая волна – в течение 4–12 ч после инъекции ИЛ-6 [5]. Участие ИЛ-6 в развитии специфического иммунного ответа связано в первую очередь с активацией пролиферации и дифференцировки В-клеток и Т-хелперов в ответ на воздействие митогена. ИЛ-6 усиливает продукцию IgM, IgG и IgA плазматическими клетками, оказывает мощное влияние на образование костной ткани и регуляцию ее обновления (в частности, он стимулирует образование и активность остеокластов, особенно после падения концентрации эстрогена) [6], играет важную роль в метаболизме липидов [7].

Нормальные физиологические концентрации ИЛ-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 более ранним прогностическим маркером 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. Предполагается участие ИЛ-6 в развитии кахексии через стимуляцию синтеза белков острой фазы клетками печени.

Применение блокаторов/ингибиторов ИЛ-6 (в первую очередь моноклональных антител к ИЛ-6 или к рецепторам ИЛ-6) рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений фармакотерапии воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. В мировой медицинской практике разработан и успешно применяется препарат Тоцилизумаб, представляющий собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело к человеческому рецептору ИЛ-6 [8, 9]. Успешное его применение создало предпосылки для разработки других лекарственных средств, которые в перспективе могут сформировать новый класс генно-инженерных биологических препаратов – ингибиторов ИЛ-6. В табл. 1 представлены препараты, которые либо нашли клиническое применение, либо проходят испытания.

Таблица 1. Ингибиторы ИЛ-6

Table 1. IL-6 inhibitors

Препарат	Описание	Стадия исследования
Тоцилизумаб	Моноклональные антитела против рецептора ИЛ-6	Клинические испытания
Силтуксимаб	Химерные моноклональные антитела против рецептора ИЛ-6	Клинические испытания
Олоклизумаб	Моноклональные антитела против ИЛ-6	Клинические испытания
Сарилумаб	Человеческие моноклональные антитела против рецептора ИЛ-6	Клинические испытания
Елсалимомаб	Мышиные моноклональные антитела против ИЛ-6	Клинические испытания
Сирукумаб	Человеческие моноклональные антитела против ИЛ-6	Доклинические испытания
Клазакизумаб	Гликозилированные моноклональные антитела против ИЛ-6	Доклинические испытания

Однако применение препаратов на основе моноклональных антител связано с развитием целого ряда побочных эффектов, таких как реакция гиперчувствительности замедленного типа, инфекционные осложнения (туберкулез, вирусные гепатиты), лимфопролиферативные заболевания, лейкопения, тромбоцитопения и нейтропения [10]. 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.

Цель данной работы – разработать и изучить эффективность олигопептидов, предназначенных для связывания ИЛ-6.

Для достижения цели были поставлены и успешно решены следующие задачи: на основании изучения трехмерных моделей молекулярных структур ИЛ-6 в комплексе с рецептором к ИЛ-6 и gp130 спрогнозированы структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов; для выявления максимально эффективного олигопептида проведена оценка их свободной энергии связывания с ИЛ-6; изучена эффективность олигопептидов по изменению концентрации ИЛ-6 в модельном растворе после контакта с экспериментальными олигопептидами.

Материалы и методы исследования. Для прогнозирования структуры перспективных низкомолекулярных олигопептидов проведен анализ трехмерных моделей из базы данных NCBI ProteinDataBank: 111R (комплекс цитокина с цитокинсвязывающей областью gp130) и 1P9M (комплекс ИЛ-6/рецептор ИЛ-6/gp130) в программе Chimera. Оценку свободной энергии взаимодействия олигопептидов с ИЛ-6 проводили методом молекулярного докинга с помощью программного обеспечения AutodockVina [11]. Для докинга указывали координаты центра и размеры куба, которые определяли визуально, исходя из структуры цитокина. Координаты центра: Sx:0, Sy:0, Sz:0. Размеры куба: Sx:50, Sy:50, Sz:50.

Эффективность взаимодействия олигопептидов с ИЛ-6 изучали на модельных растворах. Рабочая концентрация рекомбинантного ИЛ-6 (Cloud-CloneCorp., США) – 100 нг/мл, рекомбинантного рецептора к ИЛ-6 (Cloud-CloneCorp., США) – 100 нг/мл, экспериментального пептида (№ 1–12, синтезирован сотрудниками ИБОХ НАН Беларуси) – 0,05 мг/мл. Для постановки экспе-

римента в лунке планшета смешивали 100 мкл раствора пептида и 100 мкл раствора ИЛ-6. В качестве отрицательного контроля смешивали 100 мкл физиологического раствора NaCl, 100 мкл раствора ИЛ-6 и инкубировали 2 ч при 37 °С, а затем около 18 ч при 4 °С. Через 20 ч от начала эксперимента отбирали 100 мкл для постановки иммуноферментного анализа с целью определения концентрации ИЛ-6. По изменению концентрации ИЛ-6 в пробе с пептидами по сравнению с концентрацией ИЛ-6 в пробе с физиологическим раствором судили об эффективности экспериментального пептида. Снижение концентрации цитокина рассчитывали в процентах от исходной концентрации.

Статистическую обработку и построение графиков проводили с помощью программы Statistica 10.0 и GraphPadPrism6. Значения свободной энергии связывания представлены в виде Me (25 %; 75 %).

Результаты исследования. Результаты определения свободной энергии связывания пептидов с ИЛ-6 представлены в табл. 2. Результаты сравнительного анализа процента связывания синтезированных олигопептидов с ИЛ-6 в экспериментах *in vitro* с рассчитанной свободной энергией связывания приведены в табл. 3, результаты статистического анализа изменений свободной энергии связывания в зависимости от строения олигопептидов – в табл. 4.

Т а б л и ц а 2. Свободная энергия связывания пептидов с ИЛ-6
T a b l e 2. Free energy of peptide binding to IL-6

Пептид	Энергия, –ккал/моль (Me (25 %; 75 %))	Энергия, –ккал/моль (Me (25 %; 75 %))
<i>Дипептиды</i>		
Gly-Ser	4,05 (3,85; 4,20)	5,22 (4,82; 5,70)
Gly-Val	4,35 (4,20; 4,50)	
Gly-Pro	4,40 (4,30; 4,65)	
Ser-Val	4,60 (4,42; 4,87)	
Leu-Ser	4,70 (4,50; 4,87)	
Ser-Ile	4,80(4,60; 4,97)	
Thr-His	4,90 (4,80; 5,20)	
Asp-Leu	5,00 (4,90; 5,27)	
Val-Ile	5,15 (4,72; 5,30)	
Ser-Phe	5,30 (5,20; 5,57)	
Gly-Phe	5,40 (5,10; 5,70)	
Lis-Phe	5,50 (5,22; 5,60)	
Tyr-Arg	5,70 (5,50; 5,90)	
Trp-Ala	5,70 (5,50; 5,87)	
Val-Tyr	5,85 (5,60; 6,20)	
Phe-Val	5,90 (5,70; 6,10)	
<i>Трипептиды</i>		
Ser-Lys-Ser	4,65 (4,50; 4,82)	5,65 (5,12; 5,85)
Ser-Val-Ile	5,00 (4,72; 5,07)	
Ser-Ile-Lys	5,00 (5,00; 5,10)	
Pro-Leu-Ser	5,00 (4,72; 5,47)	
Lys-Asp-Leu	5,10 (5,00; 5,20)	
Ser-Thr-Val	5,15 (5,00; 5,40)	
Ala-Thr-His	5,30 (5,10; 5,50)	
Ser-Pro-Leu	5,50 (5,32; 5,67)	
Asp-Leu-Gln	5,50 (5,40; 5,60)	
Val-Pro-Glu	5,55 (5,37; 5,62)	
Tyr-Arg-Leu	5,65 (5,20; 5,80)	
Lys-Phe-Ala	5,65 (5,50; 5,87)	
Phe-Glu-Gly	5,70 (5,50; 5,90)	
Lys-Tyr-Gly	5,75 (5,40; 6,02)	

Окончание табл. 2

Пептид	Энергия, –ккал/моль (Ме (25 %; 75 %))	Энергия, –ккал/моль (Ме (25 %; 75 %))
Ser-Ser-Phe	5,80 (5,70; 6,00)	
Phe-Tyr-Arg	5,80 (5,70; 5,97)	
Glu-Trp-Ala	5,90 (5,80; 6,30)	
Ser-Phe-Tyr	6,15 (5,72; 6,47)	
Phe-Gln-Asn	6,30 (6,10; 6,42)	
Trp-Gly-His	6,55 (6,20; 6,80)	
Tyr-Phe-Val	6,60 (6,40; 6,80)	
<i>Тетрапептиды</i>		
Gln-Gly-Cys-Gln	4,90 (4,52; 4,97)	5,85 (5,48; 6,08)
Lys-Asp-Leu-Gln	5,20 (5,00; 5,40)	
Ser-Pro-Leu-Ser	5,30 (5,20; 5,40)	
Glu-Phe-Gly-Gln	5,45 (5,30; 5,67)	
Tyr-Ser-Thr-Val	5,60 (5,15; 5,97)	
Val-Asn-Gly-Arg	5,60 (5,30; 5,75)	
Glu-Gly-Leu-Phe	5,75 (5,57; 6,02)	
Gln-Asn-Ser-Pro	5,80 (5,50; 6,17)	
Ser-Ser-Phe-Tyr	5,90 (5,70; 6,07)	
Glu-Glu-Phe-Gly	5,95 (5,50; 6,30)	
Asp-Pro-Val-Tyr	6,00 (5,60; 6,30)	
Val-Tyr-Phe-Val	6,05 (5,80; 6,47)	
Phe-Gly-Gln-Gly	6,10 (5,92; 6,27)	
Asp-Tyr-Ala-Pro	6,15 (5,90; 6,30)	
Tyr-Phe-Val-Asn	6,25 (6,02; 6,47)	
Trp-Ala-Thr-His	6,35 (6,02; 6,67)	
<i>Пентапептиды</i>		
Ile-Lys-Ser-Val-Ile	5,20 (5,10; 5,30)	5,30 (5,20; 5,40)
Glu-Gly-Asp-Ser-Ser	5,30 (5,12; 5,40)	
Asn-Glu-Gly-Lys-Lys	5,50 (5,20; 5,70)	
<i>Секстапептиды</i>		
Met-Pro-Pro-Ala-Asp-Glu	5,50 (5,20; 5,80)	6,09 (5,85; 6,42)
Phe-Gln-Asn-Ser-Phe-Tyr	5,95 (5,72; 6,00)	
Pro-Ala-Pro-Glu-Asp-Tyr	6,00 (5,85; 6,12)	
Pro-Pro-Ala-Asp-Glu-Asp	6,25 (6,07; 6,42)	
Ser-Phe-Tyr-Phe-Gln-Asn	6,40 (6,30; 6,60)	
Phe-Gly-Gln-Gly-Ser-Phe	6,80 (6,70; 7,40)	

Т а б л и ц а 3. Процент связывания олигопептидов с ИЛ-6 *in vitro*T a b l e 3. Percentage of binding of oligopeptides with IL-6 *in vitro*

Олигопептид	Энергия связывания, ккал/моль	% связывания
Ser-Phe-Tyr-Phe-Gln-Asn	6,40 (6,30; 6,60)	4,25 (2,07; 6,03)
Phe-Gln-Asn-Ser-Phe-Tyr	5,95 (5,72; 6,00)	0,35 (0,00; 1,18)
Ser-Thr-Val-Tyr-Phe-Val	6,20 (6,10; 6,30)	54,90 (48,96; 57,38)
Pro-Ala-Pro-Glu-Asp-Tyr	6,00 (5,85; 6,12)	0,65 (0,31; 1,06)
Met-Pro-Pro-Ala-Asp-Glu	5,50 (5,20; 5,80)	0,69 (0,22; 1,16)
Pro-Pro-Ala-Asp-Glu-Asp	6,25 (6,07; 6,42)	15,20 (11,81; 15,77)
Phe-Gly-Gln-Gly-Ser-Phe	6,80 (6,70; 7,40)	63,45 (55,76; 65,96)
Trp-Gly-His	6,55 (6,20; 6,80)	0,40 (0,10; 0,99)
Val-Asn-Gly-Arg	5,60 (5,30; 5,75)	0,53 (0,25; 0,80)
Ser-Lys-Ser	4,65 (4,50; 4,82)	10,40 (7,41; 10,55)
Glu-Gly-Leu-Phe	5,75 (5,57; 6,02)	10,24 (9,36; 10,57)
Lys-Tyr-Gly	5,75 (5,40; 6,02)	0,25 (0,00; 0,96)

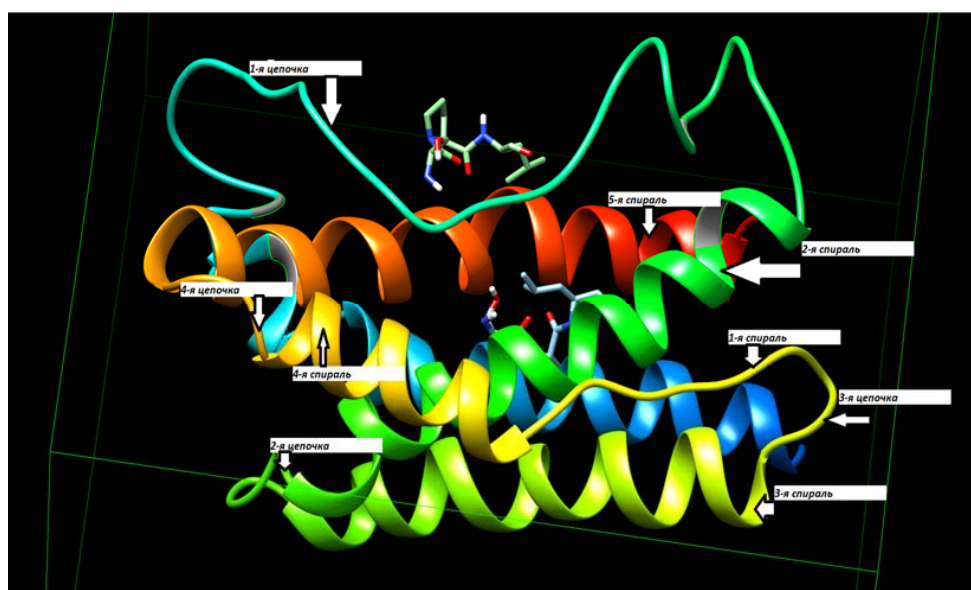
Таблица 4. Коэффициент корреляции свободной энергии и процента связывания ИЛ-6 *in vitro*Table 4. Correlation coefficient of free energy and the percentage of IL-6 binding *in vitro*

Показатель	% связывания	Энергия связывания	Общее число АК	Число ароматических АК	Число Phe	Число Tyr
% связывания	1,00	0,26	0,39	-0,01	0,21	-0,31
Энергия связывания	0,26	1,00	0,36	0,58*	0,37	0,14
Общее число АК	0,39	0,36	1,00	0,37	0,46	0,30
Число ароматических АК	-0,01	0,58	0,37	1,00	0,86*	0,66*
Число Phe	0,21	0,37	0,46	0,86	1,00	0,41
Число Tyr	-0,31	0,14	0,30	0,66	0,41	1,00

*Статистически значимая корреляция.

Обсуждение. Секретируемый ИЛ-6 состоит из 184 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу около 21 кД. В зависимости от степени гликозилирования наблюдается гетерогенность ИЛ-6 по молекулярному весу. Вторичное строение молекулы ИЛ-6 представлено в основном альфа-спиралью. Общая топология ИЛ-6 в растворе представляется как длинная цепочка, сложенная вверх-вниз-вверх-вниз, участки левозакрученной альфа-спирали (всего их 5) чередуются с цепочками (их 4), которые образуют «петли» [12, 13]. Первая альфа-спираль (А-спираль) начинается с Leu20 и заканчивается Asn46, затем следует цепочка от Lys47 до Glu81 (первая цепочка); вторая спираль (В-спираль) начинается с Glu82 и заканчивается Asn104, затем следует цепочка от Arg105 до Ser109 (вторая цепочка); третья спираль (С-спираль) начинается с Glu110 и заканчивается Lys130, затем следует цепочка от Ala131 до Asp141; четвертая спираль (D-спираль) начинается с Pro142 и заканчивается Gln153, затем следует цепочка от Ala154 до Asn156; пятая спираль (Е-спираль) начинается с Gln157 и заканчивается Gln184. Третичная структура поддерживается двумя дисульфидными связями по обе стороны молекулы, которые образуются при контакте Cys51 и Cys74 первой цепочки с Cys45 А-спирали и Cys84 В-спирали соответственно (см. рисунок).

Для выделения участков взаимодействия ИЛ-6 с растворимым рецептором и sgp130 анализировали пространственную структуру 1I1R и 1P9M, измеряли расстояние между атомами аминокислот в зоне взаимодействия ИЛ-6 с gp130 и растворимым рецептором. Область взаимодействия ИЛ-6 с gp130 предполагает четыре точки соприкосновения. Область взаимодействия ИЛ-6



Трёхмерная модель ИЛ-6 со встроенным олигопептидом (визуализация Chimera, AutodockVina)

Three-dimensional model IL-6 with oligopeptide embedded (Chimera, AutodockVina visualization)

с ИЛ-6Р предполагает шесть точек соприкосновения. Конструирование пептидов осуществляли на базе аминокислотных остатков рецепторов, наиболее близко расположенных (в диапазоне от 2 до 4 Å) к ИЛ-6. Учитывали также результаты наших предыдущих исследований, в которых изучалась способность отдельных протеиногенных аминокислот, фиксированных на твердой матрице, изменять концентрацию ИЛ-6. Показано, что из 20 протеиногенных аминокислот наилучшей энергией связывания обладают ароматические аминокислоты Phe, Trp, Tyr (–4,85 (4,55; 5,25) ккал/моль) и полярные положительно заряженные аминокислоты Lys, Arg, His (–3,85 (3,55; 4,10) ккал/моль).

С помощью программы PyMol было сконструировано 62 пептида для молекулярного виртуального докинга. Результаты вычисления энергии связывания сконструированных пептидов с ИЛ-6 с помощью метода жесткого докинга, программы Chimera и приложения AutodockVina представлены в табл. 1 (свободная энергия связывания указана в таблице со знаком «минус» (–ккал/моль)!).

Из полученных результатов следует, что энергия связывания дипептидов, в состав которых входит ароматическая аминокислота, меньше, чем у остальных (–5,30 (5,20; 5,57) ... –5,90 (5,70; 6,10) ккал/моль), что свидетельствует о лучшей их способности связываться с ИЛ-6. Наиболее эффективными дипептидами можно назвать Val-Tyr и Phe-Val. Аналогичная тенденция наблюдается и среди трипептидов – энергия связывания меньше у пептидов, содержащих ароматические аминокислоты Ser-Phe-Tyr, Phe-Gln-Asn, Trp-Gly-His, Tyr-Phe-Val. Энергия данных трипептидов находится в диапазоне от –6,15 (5,72; 6,47) до –6,60 (6,40; 6,80) ккал/моль. Среди тетра- и секстапептидов данная закономерность не ярко выражена, однако пептиды, эффективно связывающие ИЛ-6 с энергиями от –6,25 (6,02; 6,47) до –6,80 (6,70; 7,40) ккал/моль, содержат в составе ароматические аминокислоты. Что касается места взаимодействия олигопептидов с ИЛ-6, то наиболее часто олигопептид был локализован в пространстве между первой цепочкой и пятой спиралью ИЛ-6 (см. рисунок). Эта локализация характерна для взаимодействия растворимого рецептора ИЛ-6 с ИЛ-6. Намного реже взаимодействие пептида отмечалось в торцах молекулы ИЛ-6, между второй и первой спиралью, а также между четвертой и второй цепочками. Мембраноассоциированный рецептор gp130, согласно 3D-модели, взаимодействует с первой и третьей спиралью ИЛ-6. Таким образом, возможно, взаимодействие олигопептида с ИЛ-6 не будет препятствовать контакту ИЛ-6 с мембраноассоциированным рецептором, но будет мешать контакту с растворимым рецептором к ИЛ-6.

Для экспериментов *in vitro* было синтезировано 7 секстапептидов, 2 тетрапептида и 3 трипептида. На данном этапе исследования синтез осуществляли без учета рассчитанной энергии связывания с целью изучения корреляции между рассчитанной энергией связывания и эффективностью влияния олигопептида на концентрацию ИЛ-6 в модельном растворе. Эффективность пептидов рассчитывали по снижению концентрации цитокина (в % от исходной) в растворе (см. табл. 2). Как показали результаты, самыми эффективными по снижению концентрации ИЛ-6 (уменьшение ИЛ-6 более чем на 50 %) оказались секстапептиды Ser-Thr-Val-Tyr-Phe-Val, Phe-Gly-Gln-Gly-Ser-Phe. Из 12 синтезированных пептидов 6 не оказали какого-либо заметного влияния на концентрацию ИЛ-6 в модельном растворе. Влияние же остальных на снижение концентрации ИЛ-6 было незначительным (10–15 %).

Результаты корреляционного анализа представлены в табл. 3. Статистически значимая корреляция была обнаружена между свободной энергией связывания и числом ароматических аминокислот в олигопептиде. Корреляция между процентом связывания и свободной энергией невысокая ($K = 0,26$). Положительная корреляция процента связывания обнаружена также от числа аминокислот ($K = 0,39$) и от числа Phe в олигопептиде ($K = 0,21$), а вот число Tyr в олигопептиде с процентом связывания ИЛ-6 в растворе характеризовалось обратной корреляционной зависимостью – $K = -0,31$. Анализ полученных результатов показал, что метод молекулярного моделирования не является абсолютно эффективным для прогнозирования структуры олигопептида, однако может использоваться в качестве одной из предварительных ступеней анализа взаимодействия между молекулами и изучения оптимальных точек их соприкосновения для принятия решения о целесообразности синтеза и дальнейшего изучения лигандов.

Заклучение. Анализ пространственной структуры комплекса ИЛ-6 с рецепторами позволил определить их точки взаимодействия, на основании чего было сконструировано 62 олигопептида. Виртуальный докинг и статистическая оценка результатов оценки свободной энергии связывания олигопептидов с ИЛ-6 показали, что эффективность связывания увеличивается с возрастанием общего числа аминокислот, в частности ароматических, в олигопептиде. В результате оценки изменения концентрации ИЛ-6 после контакта с олигопептидами *in vitro* определены два олигопептида, наиболее перспективные для дальнейшего синтеза и разработки способов модификации с целью использования их в качестве лигандов для связывания ИЛ-6 в плазме крови человека.

Список использованных источников

1. Hunter, C. H. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease / C. H. Hunter, S. A. Jones // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, N 5. – P. 448–457. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>
2. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions / M. Mihara [et al.] // *Clin. Sci.* – 2012. – Vol. 122, N 4. – P. 143–159. <https://doi.org/10.1042/cs20110340>
3. LeMay, L. G. Role of interleukin 6 in fever in rats / L. G. LeMay, A. J. Vander, M. J. Kluger // *Am. J. Phys.-Regul., Integr. Comp. Phys.* – 1990. – Vol. 258, N 3. – P. R798–R803. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.3.R798>
4. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6 / R. E. Banks [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 1995. – Vol. 102, N 1. – P. 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb06659.x>
5. Ulich, T. R. *In vivo* hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs / T. R. Ulich, J. Castillo, K. Z. Guo // *Blood.* – 1989. – Vol. 73, N 1.
6. Lack of evidence for an increase in interleukin-6 expression in adult murine bone, bone marrow, and marrow stromal cell cultures after ovariectomy / S. J. Vargas [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 1996. – Vol. 11, N 12. – P. 1926–1934. <https://doi.org/10.1002/jbmr.565011214>
7. Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor / M. Hashizume [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69, N 4. – P. 741–746. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.104844>
8. Yuzaiful, M. Y. Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis / M. Y. Yuzaiful, P. Emery // *Drugs.* – 2013. – Vol. 73, N 4. – P. 341–356. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0018-2>
9. Kang, S. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody / S. Kang, T. Tanaka, T. Kishimoto // *Int. Immunol.* – 2015. – Vol. 27, N 1. – P. 21–29. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu081>
10. Anti-TNF- α therapies: the next generation / M. A. Palladino [et al.] // *Nat. Rev. Drug Disc.* – 2003. – Vol. 2, N 9. – P. 736–753. <https://doi.org/10.1038/nrd1175>
11. Automated docking of ligands to antibodies: method and applications / C. A. Sotriffer [et al.] // *Methods.* – 2000. – Vol. 20, N 3. – P. 280–291. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0922>
12. Solution structure of recombinant human interleukin-6 / G.-Yi Xu [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 268, N 2. – P. 468–481. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0933>
13. Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor binding site: implications for its three-dimensional structure / R. Savino [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – Vol. 90, N 9. – P. 4067–4071. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4067>

References

1. Hunter C. H., Jones S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 2015, vol. 16, no. 5, pp. 448–457. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>
2. Mihara M., Hashizume M., Yoshida H., Suzuki M., Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 2012, vol. 122, no. 4, pp. 143–159. <https://doi.org/10.1042/cs20110340>
3. LeMay L. G., Vander A. J., Kluger M. J., Role of interleukin 6 in fever in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1990, vol. 258, no. 3, pp. R798–R803. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.3.R798>
4. Banks R. E., Forbers M. A., Storr M., Higginson J., Thompson D., Raynes J., Illingworth J. M., Perren T. J., Selby P. J., Whicher J. T. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clinical and Experimental Immunology*, 1995, no. 102, pp. 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb06659.x>
5. Ulich T. R., Castillo J., Guo K. Z. *In vivo* hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. *Blood*, 1989, vol. 73, no. 1, pp. 108–110.
6. Vargas S. J., Naprta A., Lee S. K., Kalinowski J., Kawaguchi H., Pilbeam C. C., Raisz L. G., Lorenzo J. A. Lack of evidence for an increase in interleukin-6 expression in adult murine bone, bone marrow, and marrow stromal cell cultures after ovariectomy. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1996, vol. 11, no. 12, pp. 1926–1934. <https://doi.org/10.1002/jbmr.565011214>
7. Hashizume M., Yoshida H., Koike N., Suzuki M., Mihara M. Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2010, vol. 69, no. 4, pp. 741–746. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.104844>

8. Yuzaiful M. Y., Emery P. Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Drugs*, 2013, vol. 73, no. 4, pp. 341–356. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0018-2>
9. Kang S., Tanaka T., Kishimoto T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. *International Immunology*, 2015, vol. 27, no. 1, pp. 21–29. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu081>
10. Palladino M. A., Bahjat F. R., Theodorakis E. A., Moldawer L. L. Anti-TNF- α therapies: the next generation. *Nature Reviews*, 2003, vol. 2, no. 9, pp. 736–753. <https://doi.org/10.1038/nrd1175>
11. Sotriffer C. A., Flader W., Winger R. H., Rode B. M., Liedl K. R., Varga J. M. Automated docking of ligands to antibodies: method and applications. *Methods*, 2000, vol. 20, no. 3, pp. 280–291. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0922>
12. Xu G.-Yi, Yu H.-Ai, Hong J., Stahl M., McDonagh T., Kay L. E., Cumming D. A. Solution structure of recombinant human interleukin-6. *Journal of Molecular Biology*, 1997, no. 268, pp. 468–481. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0933>
13. Savino R., Lahm A., Giorgio M., Cabibbo A., Tramontano A., Ciliberto G. Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor binding site: implications for its three-dimensional structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, vol. 90, no. 9, pp. 4067–4071. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4067>

Информация об авторах

Рябцева Татьяна Владимировна – науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ta-yana@mail.ru

Макаревич Денис Александрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: demkarevich@yandex.ru

Ермола Евгений Михайлович – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь).

Голубович Владимир Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: golubovich@iboch.bas-net.by

Кирковский Валерий Васильевич – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kirkovskv@mail.ru

Information about the authors

Tatiana V. Ryabzeva – Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ta-yana@mail.ru

Denis A. Makarevich – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: demkarevich@yandex.ru

Eugeniy M. Ermola – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

Vladimir P. Golubovich – Ph. D. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: golubovich@iboch.bas-net.by

Valeriy V. Kirkovskiy – Ph. D. (Med.), Professor, Chief researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kirkovskv@mail.ru