طراحی یک لیگاند مهاری بر مبنای رسپتور اینترلوکین ۶ (IL6R) جهت اختلال و مهار در مسیر سیگنالینگ التهابی وابسته به اینترلوکین ۶ در بیماران مبتلا به کووید ۱۹

سعید پیرمرادی[۱]، محمد درویش خادم[۲]، حامد اسمعیل لشگریان[۳]

۱-موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، اهواز، ایران

۲-دکتری بیوشیمی، گروه آموزشی بیوشیمی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳-گروه آموزشی بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

یافته / دوره ۲۳ / شماره ۱ / ویژه نامه ۱۴۰۰

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۵/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۳

مقدمه: همه گیری کووید ۱۹ از زمانی که برای اولین بار در اواخر سال ۲۰۱۹ کشف شد، تأثیر زیادی بر سلامت انسان در سراسر جهان گذاشته است. در حال حاضر روش دارویی و درمانی خاصی برای درمان این بیماری کشف نشده است. از سوی دیگر، التهاب بیش از حد ناشی از ترشح بالای سیتوکین ها در بیماران کووید-۱۹ منجر به عوارض کشنده از جمله نارسایی اندام ها و مرگ می شود. بدین منظور برای درک بهتر پاتوفیزیولوژی این ویروس، دانشمندان سعی دارند از روش‌های مختلفی مانند بررسی برخی داروهای ضد التهابی دردسترس یا ارزیابی **In silico** ترکیبات بازدارنده به عنوان مهارکننده‌های رسپتور اینترلوکین ۶ (**IL-6R**) برای تعدیل بخش‌هایی از سیستم ایمنی استفاده کنند.

مواد و روش‌ها در این بررسی پس از طراحی **In silico**، بین لیگاندهای مهارکننده با **IL-6R** داکینگ صورت گرفت. پس از آن، لیگاند مناسب برای سمیت و آلرژی و پیش‌بینی **ADME** (جذب، توزیع، متابولیسم و دفع) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که بین قسمتهای غیر قطبی ترکیب لیگاند مهاری طراحی شده عمدتا با بخشهایی از پروتئین **IL-6R** مشتمل بر آمینواسیدهای **Arg118, Thr120** و**ser122** برهمکنش هیدروژنی صورت گرفته است. همچنین آمینواسیدهای **Pro94,Thr125 ,Val93, Pro121, Glu96,Thr120, Trp115, Ser122, Arg118**، برهم کنشهای استری را نشان می دهند.

بحث و نتیجه گیری: نتایج داکینگ نشان داد که از بین صد لیگاند مورد بررسی، لیگاند **(24) unknown [03]** دارای انرژی اتصالی مناسب تری(**114.648-**) با **IL-6R** نسبت به بقیه لیگاندها دارد و این سطح انرژی بیانگر برهمکنش مطلوب بین این ترکیب مهاری طراحی شده با **IL-6R** از طریق آمینو اسیدهای**Val93, Pro121, Glu96,Thr120, Trp115, Ser122, Arg118, Pro94** و**Thr125** دارد. به منظور اثبات میزان اثر مهاری این لیگاند روی **IL-6R** مطالعات بالینی نیاز می باشد.

واژه‌های کلیدی: لیگاند مهاری، **Insilico**، اینترلوکین۶،التهاب، داکینگ.

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه آموزشی بیوتکنولوژی پزشکی.

پست الکترونیک: : hamedesmaiili@gmail.com

مقدمه

از اواخر سال ۲۰۱۹ ، جهان با یک بحران بزرگ بهداشتی بواسطه ویروسی موسوم به COVID-19 که منجر به یک سندرم تنفسی حاد شدید میشود روبرو شده است (۱). اولین مورد شناخته شده COVID-19 از شهر ووهان در استان هوبئی چین نشات گرفته است و از آنجا در سراسر جهان گسترش یافت. این ویروس متعلق به خانواده ویروس های بتا کرونا است (۲). این ویروس یک ویروس RNA تک رشته مثبت است که به طور معمول بر سیستم تنفسی تأثیر می گذارد. مسیر اصلی انتقال ان از طریق قطرات تولید شده در هنگام عطسه یا سرفه فرد آلوده و یا از طریق محیط های مخاطی مختلف از جمله بزاق و بینی صورت می گیرد (۳). SARS-CoV-2 از طریق گیرنده آنزیم مبدل آنژیوتانسین۲ (ACE2) به سلول هدف دسترسی پیدا می کند در نتیجه عمدتا قادر است دستگاه تنفسی تحتانی را آلوده می کند ودر سلولهای اپیتلیال آلوئول به ACE2 متصل می شود (۴،۱۲). پس از اتصال سیستم ایمنی بدن از طریق تظاهرات التهابی پاسخهایی در جهت مهار آن ارائه می دهد (۵،۶). عفونت COVID-19 می تواند به صورت عفونت بدون علامت و یا بصورت یک بیماری خفیف دستگاه تنفسی فوقانی که شامل سرفه، لرز، تب، خستگی و تنگی نفس است بروز کند (۷،۸،۹،۱۰). این بیماری در موارد شدید عوارضی شبیه سپسیس، سندرم دیسترس تنفسی حاد (ARDS)، نارسایی قلبی و شوک سپتیک را نیز بهمراه دارد. با این حال این پنومونی ویروسی شدید همراه با نارسایی تنفسی می تواند به طور بالقوه (۱۱) با اختلال عملکردی در اعضای مختلف شخص ناشی از التهاب حاد کنترل نشده و انتشار توفان سایتوکاینی حاصل از ان مرگ را بدنبال داشته باشد (۱۲،۱۳). علی رغم حفظ فاصله اجتماعی و سایر محدودیت ها اما این بیماری توانسته منجر به تأثیرات اقتصادی و بهداشتی زیادی در سطح جهانی شود. طبق مطالعات موردی اخیر مشخص شده که COVID-19 با ذات الریه شدید همراه است (۱۷). در چنین مواردی این ویروس باعث ترشح کنترل نشده سیتوکین های پیش التهابی می شود که منجر به سندرم آزاد سازی سیتوکین (CRS) می شود (۵،۱۴) که فعال سازی CRS شرایط بدنی بیمار را بدتر می کند و می تواند منجر به اختلالات عملکردی در اعضای مختلفی از شخص بیمار شود (۵،۶،۱۲،۱۸). شواهد نشان می دهد که بیماران آلوده به SARS-CoV-2 که از بیماری روماتیسم و سایر بیماریهای التهابی مانند آرتریت روماتوئید (RA) رنج می برند نسبت به ARDS ناشی از CRS در قیاس با افراد فاقد این نوع بیماریهای زمینه ای اسیب پذیرتر هستند (۱۹،۲۰). به این دلیل است که طوفان سیتوکین یا CRS هم در بیماران COVID-19 و هم در بیماران روماتولوژی شایع است. سکته مغزی (۱۵) و آنوسمی یا آگروزیا (۱۶) نیز در بسیاری از این بیماران شایع است (۱۹،۲۱،۱۱). محرک های التهابی از طریق فرایندهای سیگنالینگ درگیر التهابی و واسطه های التهابی بر پاتوژنز بیماری های مزمن و مسیرهای نظارتی مربوط به آنها تأثیر می‌گذارند. از جمله این محرک های التهابی اولیه میتوان به محصولات میکروبی و سیتوکین ها مانند اینترلوکین۱ -بتا (IL-1β) ، اینترلوکین -۶ (IL-6) و فاکتور نکروز تومورالفا (TNF-α) اشاره کرد که التهاب را از طریق تعامل با TLRها، گیرنده IL-1(IL-1R) ، گیرنده IL-6(IL-6R) و گیرنده TNF(TNFR) واسطه گری می کنند (۲۴).). فعال سازی این گیرنده ها باعث ایجاد و فعال شدن مسیرهای مهم سیگنال دهی درون سلولی از جمله پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK)، فاکتور هسته ای kappa-B(NF-κB)، و JAK(Janus kinase) مبدل سیگنال و فعال کننده مسیر رونویسی (STAT) می شود (۲۲،۲۳). اگرچه در حال حاضر هیچ روش درمانی یا واکسنی خاص برای متوقف کردن اپیدمی در دسترس نیست اما داروهای مهار کننده CRS مانند توسیلیزوماب در آزمایشات بالینی برای درمان COVID-19.12 انجام شده است (۲۴،۲۵). هدف اصلی ما بررسی ارائه یک نمای کلی از مکانیسم پاسخ بیش از حد التهابی است در

بیماران COVID-19 با تمرکز ویژه بر برخی مسیرهای موجود محل اثر داروهای ضد التهابی مانند مسیر وابسته به IL6R و سنتز insilico یکسری لیگاند مهاری رقابتی برای مهار این مسیرها و کاهش پاسخ شدید التهابی سیستم ایمنی وابسته به IL6 در جهت کاهش اسیب به بدن اشخاص بیمار می باشد.

روش کار

تهیه فایلهای پروتیین IL6R و طراحی لیگاند

در این مطالعه ابتدا ساختارPDB (ساختار سه بعدی) کمپلکس پروتئین IL6R از طریق توالی پروتئینی ان در پایگاه دادهRCSB با نام 1n26 تهیه شد(۲۶). و با انتخاب لیگاند خاص این پروتئین از ان جهت طی فرایند جستجوی مجازی در جهت تهیه لیگاندهای مهاری جدید از طریق پایگاه داده ZINC15 استفاده شد.

پیش بینی ADME (جذب ، توزیع ، متابولیسم و دفع) تجزیه و تحلیل فارماکودینامیک یک مولکول پیشنهادی که می تواند به عنوان یک دارو مورد استفاده قرار گیرد مهم است. SWISS-ADME یک وب سایت (https://www.swissadme.ch) است که به کاربر اجازه می دهد تا از طریق ترسیم لیگاند یا مولکول دارویی و یا از طریق فرمول SMILES ان لیگاند، انرا در این پایگاه داده بگنجاند تا از طریق ان پارامترهایی مانند لیپوفیلیسیته (iLOGP، XLOGP3، WLOGP، MLOGP، SILICOS-IT، LogP0/w)، حلالیت در آب- ESOL(LogS، Ali، SILICOS-IT) ، قوانین شباهت به مواد دارویی (Lipinski, Ghose, Veber, Egan and Muegge) و شیمی دارویی (PAINS، Brenk، Leadlikeness ، Synthetic accessibility) تجزیه و تحلیل شوند (۲۷). داده های مربوط به SMILES لیگاند تهیه شده از طریق PubChem و از آدرس(https: //pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) قابل دستیابی است.

پیش بینی سمیت

پیش بینی سمیت مولکول های کوچک هدف برای پیش بینی میزان تحمل ان مولکول ها قبل از مصرف در مدل های انسانی ، حیاتی و مهم است. pkCSM یک پایگاه داده است که در آن با ورود ساختار ترکیب مورد لیگاند مهاری مورد بررسی در این سرور لیگاند مورد نظر مورد تجزیه و تحلیل قرار میدهد که در پایان انالیز جزئیاتی از اثرات سم شناسی در زمینه های سمیت AMES ، حداکثر دوز تحمل انسان ، مهار کننده hERG-I، مهار کننده hERG-II، LD50، LOAEL، سمیت کبدی، سمیت پوستی، سمیت T. pyriformis و Minnow toxicity لیگاند مهاری مورد مطالعه را ارائه دهد (۲۸).

فرایند داکینگ

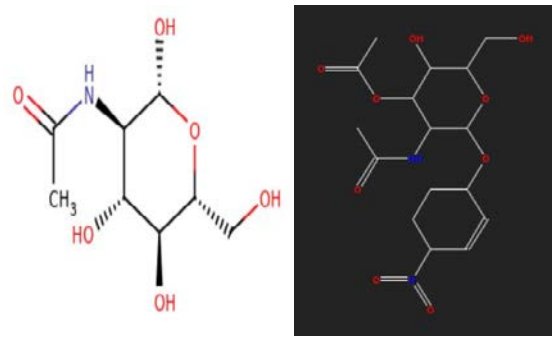
در این مرحله ابتدا فایل PBD پروتئین IL6R را وارد نرم افزار MOLEGRO VIRTUAL DOCKER نموده و لیگاندهای آن حذف شد. در ادامه لیگاندهای طراحی شده در مرحله قبل به نرم افزار وارد شد. پیش از انجام فرایند داکینگ، آماده سازیهای لازم روی پروتئین انجام گرفت و خطاهای پروتئین اصلاح شد. برای این منظور، ابتدا در مرحله اماده سازی مولکولی حالتی انتخاب می‌شود که باندها، جهت گیری پیوندهای هیدروژنی، بارها و نیز پیوندهای منعطف در لیگاند شناسایی شوند پس از آن خطاهای باقیمانده های ان شناسایی، حذف و بهینه سازی شدند. بطوری که باقیمانده جایگزین آنها در بهترین جهت گیری با رزیدوهای اطرافش در ساختار پروتئین قرار گیرد. در مرحله بعد حفره های موجود در ساختار پروتئین را یافته و تعیین شدند که بیانگر این است که احتمال برهمکنش بین لیگاند و پروتئین در کدام بخشهای پروتئین بیشتر است. با انجام این اعمال، آماده سازی های قبل از داکینگ انجام شد. پس از انتخاب لیگاندها، نحوه SCORING را در حالت MolDock scoring(GRID) قرار داده و مکان اتصال، بر اساس حفره ها انتخاب شد. در ادامه الگوریتم را بر اساس Mol Dock

SE انتخاب نموده، با انتخاب تعداد رانها و فرمت ذخیره POSES ها، فرایند داکینگ اغاز گردید. در آخر از بین لیگاندهای طراحی شده و بر اساس سطح انرژی منفی، لیگاندهای دارای بالاترین انرژی منفی انتخاب شده و برای بررسی برهمکنش با کمپلکس IL6R مورد استفاده قرار گرفت (۲۹).

نتایج

نتایج حاصل طراحی لیگاند

در این مرحله از پایگاه داده، RCSBیک نمونه از لیگاندهای اختصاصی طراحی شده برای پروتئین IL6R بنام NAG، به عنوان الگو انتخاب شد (تصویر۱-الف) و با طراحی ان در پایگاه داده ZINC15 از آن بعنوان یک الگو جهت طراحی و تهیه لیگاندهای مهاری مورد نظر استفاده شد. در مرحله بعد، فایلSDF یا MOL2 صد عدد لیگاندهای طراحی شده مهاری بر مبنای این الگو (تصویر۱-ب) از این پایگاه داده تهیه شد (۲۹).

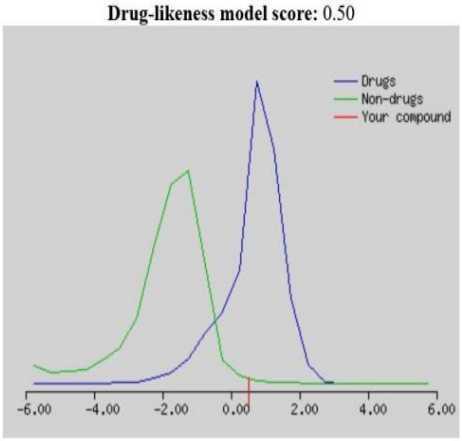


الف ب

تصویر۱. الف: لیگاند الگو NAGجهت طراحی لیگاندهای مهاری. ب: لیگاند (24)UNKNOW(03)انتخاب شده از بین صد لیگاند طراحی شده برمبنای لیگاند الگوNAG.

نتایج پیش بینی شباهت دارویی

در این مرحله ابتدا با کمک سرور molsoft و از بخش Molecular Properties and Drug-likeness به بررسی تشابه دارویی ترکیب لیگاند مهاری پرداخته شد و مشخص شد که لیگاند بدست امده در محدوده ترکیبات دارای خاصیت دارویی قرار دارد (تصویر ۲).



تصویر۲. نمودار مربوط به تشابه دارویی لیگاند طراحی شده (خط قرمز تعین کرده که لیگاند در محدوده ترکیبات دارویی می باشد)

نتایج پیش بینی سمیت

نتایج حاصل از سمیت پیش بینی شده در سرورPKCSM بدین گونه بود که لیگاند مورد بررسی فاقد سمیت AMES است زیرا حداکثر دوز تحمل شده این ترکیب در انسان در حدود(log mg/kg/day) 1.075 میباشد. این ترکیب مقدارکمی سمیت کبدی ایجاد می کند که معمولا در اکثریت داروها مقداری سمیت کبدی دیده میشود. همچنین باعث حساسیت پوستی نمیشود. فرایند بررسی سمیت مولکولی و ژنتیکی لیگاند مهاری با استفاده از نرم افزار LAZAR TOXICITY PREDICTION انجام شدکه نتایج مربوط به پیش بینی خطر سمیت ژنتیکی و سلولی ترکیبات طراحی شده نشان داد که ترکیب لیگاندی مورد نظر فاقد خاصیت موتاژنیکی و کارسینوژنیکی است. همچنین بررسی سمیت کبدی ، کلیوی،عصبی وقلبی عروقی از طریق سرور way2drug انجام شد که ترکیب لیگاند مهاری فاقد سمیت قلبی عروقی وعصبی بود . ترکیب لیگاند مهاری با داشتن ۶ پیوند قابل چرخش و ۹ گروه پذیرنده و ۳ گروه دهنده هیدروژنی شرایط مطلوبی را بر اساس معیارهای چندگانه لیپینسکی در مورد داروها را دارا میباشد و از قواعد لیپینسکی پیروی میکند.

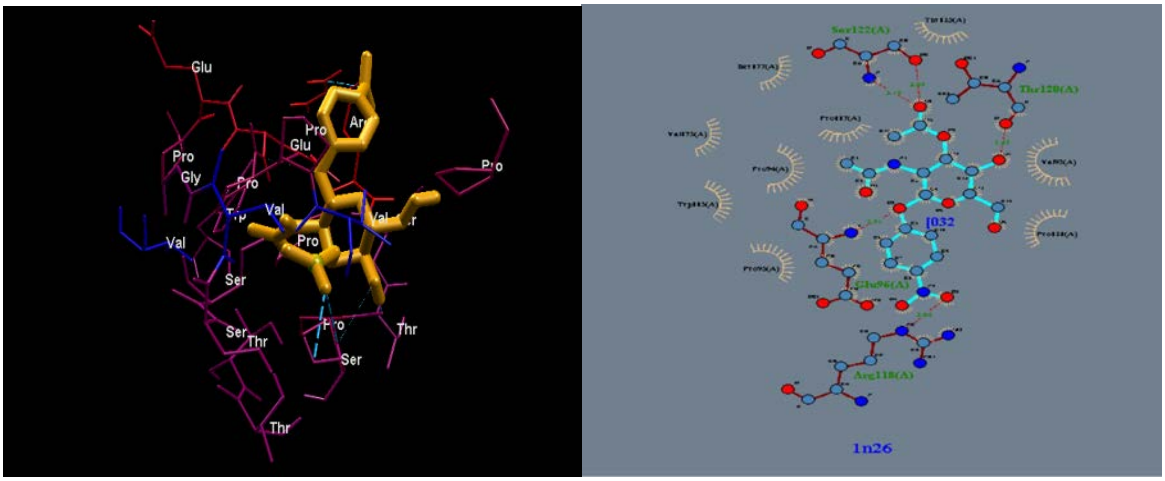
نتـــایج پـــیش بینـــی ADME (جـــذب ، توزیـــع ، متابولیسم و دفع)

در طی بررسی پیش بینی ADME که با استفاده از پایگاه داده SWISSADME انجام شد که پس از بررسی ترکیب لیگاند مهاری نتایج زیر حاصل شد. خصوصیات فیزیولوژیکی این ترکیب عبارتند از: تعداد ۲۷ اتم سنگین، ۹ گیرنده پیوند هیدروژنی، ۳ اهدا کننده پیوند هیدروژن، انعطاف پذیری مولی ۹۱،۲۱ و سطح قطبی توپولوژیکی (TPSA) این مولکول۱۴ است. مقادیر مربوط به برایند لیپوفیلیته مولکول در مجموع حالتهای مختلف برابر با (P0/W(-0.76 است. از بررسی خاصیت حلالیت ترکیب لیگاندی مورد بررسی در آب مشخص شد که در حالتهای مختلف در نهایت در کلاس ترکیبات محلول قرار گرفت. داده های فارماکوکینتیک پیش بینی شده بیانگر جذب مناسب دردستگاه گوارش (GI) است. در ادامه بررسی های بر مبنای مقادیر مربوط به مهار CYP1A2، CYP2C19، CYP2C9، CYP2D6 و سیتوکروم های CYP3A4 مشخص شک که لیگاند مربوطه انها را مهار نمی کند. سینتیک نفوذ پوست ان Log Kp=- 9.02 سانتی متر در ثانیه بود. این ترکیب بدون هیچ مشکلی بطور کامل از قوانین لیپینسکی پیروی می کند.

نتایج داکینگ

امروزه فرآیندهای استاندارد به منظور یافتن ترکیبات فعال در برابر یک هدف زیستی، از طریق آزمایش هزاران یامیلیونها مولکول کوچک (لیگاندها) امکان پذیر است. اگرچه این نوع روشها بسیارمفید است اما به امکانات آزمایشگاهی بسیارزیاد و همچنین صرف مدت زمان زیادی نیاز دارد. بدین خاطر امروزه شبیه سازی اتصال مولکولی یک برنامه ی کامپیوتری است که میتواند جایگزین روشهای قدیمی ذکرشده گردد (۲۷) امروزه روشهای کامپیوتری که مولکولهای کوچک را در ساختار مولکول هدف پروتئینی داک میکنند و به میزان جفت شدن لیگاند با سایت فعال شناخته شده امتیاز میدهند، در معرفی و بهینه کردن ترکیبات منتخب مورد نظر مشهور شده اند.با این سری از برنامه های کامپیوتری ساختار صحیح لیگاند و گیرنده تعیین میشود. به منظور انجام فرایند داکینگ، ابتدا لیگاند اصلی پروتئینIL6R حذف شد سپس لیگاند طراحی شده با ان توسط نرم افزار MVD داک شده و داده های مربوط به تغییرات انرژی اتصال، برهمکنشهای لیگاندها شامل پیوندهای هیدروژنی، برهم کنشهای استری بدست امده توسط نرم افزارهای , MVD, Discovery Studio نمایش داده شدند. نتایج این بررسیها نشان داد که لیگاند مورد مطالعه می تواند بااتصال به بخشی از پروتئین IL6R در تغییر عملکرد آن نقش ایفا کند. تجزیه و تحلیل داکینگ ترکیب لیگاند مهاری با IL6R سلولهای میزبان با مقادیر منفی برای انرژی - 114.648KJ/mol ، بیانگر میل بالا و مطلوب اتصال ترکیب لیگاند مهاری با شماره (24)unknown[03]، با پروتیین IL6R است. انرژی اتصالی مبین قدرت اتصال بین ترکیبات مولکولی طراحی شده و پروتیین IL6R است . نتایج داکینگ مولکولی همچنین نشان داد که بین قسمتهای غیر قطبی ترکیب لیگاند مهاری طراحی شده عمدتاً با بخشهایی از پروتیین IL6R مشتمل بر امینواسیدهای Arg118, Thr120,ser122, برهمکنش هیدروژنی صورت گرفته است. همچنین آمینواسیدهای Trp115, Ser122, Arg118 ,Val93, Pro121, Glu96,Thr120, Pro94,Thr125، برهم کنشهای استری را نشان میدهند (تصویر۳). در ادامه با استفاده از نرم افزار LIGPLOT تصویری از نوع برهمکنش امینواسیدهای پروتئین IL6R با لیگاند(24)unknown [03] مشخص گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضرمیتوان نتیجه گرفت که ترکیب شماره (24)unknown[03] میتواند ضمن میان کنش با آمینواسیدهای مهم واقع در جایگاه مهم پروتیین IL6R باعث اختلال در عملکرد طبیعی ساختاری و یا مهار ان شود زیرا پروتئین گیرنده IL6R دارای سه دومین عملکردی فعال در ساختار خود میباشد که در محدوده ۷-۷۷ و۹۴ - ۱۹۸ و۱۹۹ - ۲۹۷ قرار دارند که بیشترین برهمکنش لیگاند مهاری (24)unknown[03] مورد مطالعه ما در محدوده

دومین دوم که توالی امینواسیدی از شماره ۹۴ تا ۱۹۸ را شامل میشود قرار می گیرد.



تصویر۳. نمایش دو بعدی و سه بعدی برهمکنش استخلافهای لیگاند مورد بررسی با برخی از اسید امینه های پروتئین گیرندهIL6R توسط نرم افزار LIGPLOT وDiscovery Studio

بحث و نتیجه گیری

روشهای کامپیوتری نقش بسزایی در فرآیند اکتشاف دارو دارند. بدینگونه که درمعرفی ترکیبات کلیدی و بهینه کردن چندین فاکتور آنتالپیک و آنتروپیک و برهمکنش بین آنها نقش مهمی ایفا میکنند. تولید مجموعه ی جامعی از کمپلکس لیگاند - گیرنده و سپس رتبه بندی آنها بر طبق میزان پایداری، ایده ایست که پشت این گونه تکنیکها نهفته است(۳۰). در بسیاری از مشتقات طراحی شده گروه های عاملی مختلف موجود در ترکیبات طراحی شده با آمینواسید مختلف در پروتئین مورد نظر تشکیل پیوند هیدروژنی و استری یا الکترواستاتیک می دهند.

همچنین استخلاف های الکترون دهنده بر روی حلقه های فنیل ترکیب لیگاند مهاری مورد بررسی میتواند قدرت پیوند میان دارو و گیرنده را افزایش دهد. در سالهای اخیر تولید و تهیه ترکیبات مختلف دارویی در حال طراحی و آزمایش هستند تا شاید بتوان از طریق انها شیوع برخی از بیماریهای ویروسی مانند کرونا ویروسها را مهار کرد (۳۱). برخی ترکیبات دارویی مختلف مانند کمپلکس هیدروکسی کلروکین و آزیترومایسین برای افراد بیمار در مواقع اضطراری در برابر گونه هایی از این ویروس تجویز شدند که دارای عوارض جانبی هستند و این سری ضعفها در این ترکیبات دارویی باعث شده که نیاز به ایجاد ترکیبات مهاری جدیدتر و قدرتمندتر بعنوان گزینه هایی جایگزین و در قالب دارو بسیار ضروری به شمار آید (۱۸). بدین خاطر تلاشهای زیادی جهت یافتن ترکیبات دارویی مهاری مطلوبتر در حال انجام شدن است (۳۲). در این مطالعه شبیه سازی داکینگ مولکولی بین ترکیب ۱۰۰ لیگاند تهیه شده با کمپلکس پروتئین IL6R سلولهای میزبان جهت دست یافتن به اتصالات امینواسیدهای درگیر پروتئینIL6R با این لیگاندهای مهاری تهیه شده انجام گرفت.

روش محاسبه انرژی پیوندی و انرژی داکینگ محاسبه شده از نظر مقدار شامل مجموعه ای از انرژی داخل مولکولی با انرژی ازاد پیچشی و انرژی داخلی لیگاند است که طی ان منفی ترین برهمکنشهای مناسب اتصال محکم با اسیدامینه های اصلی در جایگاه فعال پروتئین IL6R سلولهای میزبان برای اغلب ترکیبات فعال محاسبه می شود (۳۲). مطالعات داکینگ نشان می دهد که لیگاند (03)unknown24 با پروتئین IL6R سلولهای میزبان از طریق پیوندهای هیدروژنی با امینواسیدهای Arg118, Thr120,ser122 و از طریق پیوندهای استری با امینواسیدهای Ser122, Pro121, Glu96,Thr120, Arg118,Trp115 Pro94,Thr125 ,Val93, برهم کنش های مهمی دارد که در این برهمکنش ها سه آمینواسید Arg118,

Thr120,ser122 بخاطر شرکتشان در پیوندهای استری و هیدروژنی نقش کلیدی تری در اتصال و برهمکنش لیگاند مورد بررسی با پروتئین IL6R داشتند. لیگاند انتخاب شده با شماره unknown24(03) نسبت به بقیه لیگاندها دارای میزان انرژی منفی(۱۱۴،۶۴۸-) بیشتری بود.

استخلافهای موجود در این لیگاند برمیزان لیپوفیلیسیته این لیگاند تاثیر زیادی دارند (۳۳). این لیگاند قادر به برهمکنشهای π-π است که با حلقه فنیل اسیدامینه هایی نظیر Arg118,Thr120,ser122, است. ۶ پیوند قابل چرخش و در این لیگاند بر روی خواص فیزیکوشیمیایی و جهت گیری فضایی در جایگاه اتصال به پروتئین IL6Rسلولهای میزبان موثر است (۳۴). بررسی رابطه ساختار و فعالیت این لیگاند باپروتئین IL6R نشان داد که وجود حلقه های آروماتیک، بخش های هیدروفوبیک، امین نوع سوم، پیوندهای قابل چرخش و پیوندهای هیدروژنی و استری در افزایش قدرت برهمکنشی مهاری این لیگاند موثر هستند (۲۲) و میتوان اینطور استنباط کرد که تشکیل پیوندهای هیدروژنی این ترکیب به منظور افزایش برهمکنشهای هیدروفوب از عوامل مهم در نقش در مهار مسیر التهابی فعال شونده توسط IL6R است. این ترکیب میتواند برای اثر در جهت کاهش فرایندهای التهابی در بسیاری از بیماریها بخصوص بیماری کوید-۱۹ ناشی از کروناویروسها به عنوان یک لیگاند مهاری جدید معرفی شود (۱۴،۳).البته جهت اثبات میزان و نحوه اثرگذاری انها نیازمند فرایندهای فاز بالینی در ازمایشگاه میباشد.. همچنین با توجه به نتایج تحلیلهای بدست امده از سرورهای ارزیابی کننده انعطاف پذیری مولی ترکیبات دارویی در مورد این ترکیب مورد بررسی ما تأیید می کند که ترکیب دارو از طریق غشاهای خاصی قابل نفوذ است و حتی در میان تعامل با حلالهای قوی یا ضعیف، می تواند ثبات و پایداری خود را حفظ کند. بر اساس میزان TPSA (۱۰۶،۱۴A2)بدست امده از ان میتوان فهمید که از ویژگی ترانسفری خوبی برخوردار است. و نیز طی نتایج حاصل از انالیز ترکیب لیگاند مهاری توسط سرورSWISSADME مشخص شد که این ترکیب خاصیت مناسبی برای جذب دهان و روده ای دارد و قادر به میزان جذب مطلوبی نیز هست (۳۷). از نتایج سرور molsoft و از بخش Molecular Properties and Drug-likeness که به بررسی خواص مولکولی و تشابه دارویی ترکیب لیگاند مهاری پرداخته شد مشخص شد لیگاند مورد بررسی از نظر ضریب حلالیت(logs=-1.17) که در اکثریت داروهای موجود در بازار بزرگتر از ۴- است و وزن مولکولی (388.37) و ضریب اکتانول/اب که معیاری از ابدوستی ترکیب است (logp=1.65) که نباید بیشتر از ۵ باشد شرایط مطلوبی دارد و ترکیب لیگاند مهاری مورد بررسی از مجموع فاکتورهای ذکر شده در مجموع امتیاز قابل قبولی کسب کرده است (۳۶،۳۷). همچنین از طریق خاصیت حلالیت در آب و بر اساس امتیازات حاصل از حلالیت بدست امده توسط سرور swissADME پیش بینی می شود که این دارو در آب حلالیت خوبی دارد . داده های فارماکوکینتیک بدست امده در مورد جذب و نفوذپذیری، صحت نتایج پیش بینی شده میزان لیپوفیلیسیته ترکیب مورد نظر را اثبات می کند و حلالیت آنها همچنین اثبات میکند که ترکیب مورد بررسی قادر است فسفات را از ATP و اتصال همزمان ADP به گلیکوپروتئین آزاد کند بنابراین ترکیب به عنوان یک بستر p-gp عمل می کند (۳۶،۳۷). این ترکیب متابولیسم داروهای ضد زخم، ضد مالاریا، ضد تشنج، بی حس کننده و آرام بخش را از طریق مهار CYP2C متوقف نمی‌کند. همچنین متابولیسم داروهای ضد حساسیت را از طریق CYP2C19 (۳۵،۳۷) و داروهای ضد آریتمی و ضد افسردگی از طریق مهار CYP2D6 ، متابولیسم عوامل ضد لخته شدن، ضد تشنج، مدیریت دیابت نوع II، ضد فشار خون، ضد فشار خون، داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSAIDs) از طریق CYP2D9 و نیز اکسیداسیون استروئیدها، اسیدهای چرب و زنوبیوتیک و همچنین سنتز هورمون و تجزیه آن از طریق CYP3A4 را متوقف نمی کند. طبق این ویژگیها و

ویژگیهای فاکتورهای دارویی این ترکیب میتواند به عنوان یک ترکیب دارویی احتمالی و پیشنهادی در سیستم های بیولوژیکی به شمار آید (۳۷). بدین خاطر ارزش انجام تستها و آزمایشهای مورد نیاز برای سنجشهای بیوشیمیایی را دارد. همانطور که سرورها مورد استفاده پیش بینی سمیت پیش بینی کردند مشخص شد این یک ترکیب تقریبا بی خطری است و می تواند به عنوان یک ترکیب دارویی پیشنهادی با ارزش برای مصرف در انسان البته پس از فرایندهای فاز بالینی در ازمایشگاه با رعایت احتیاطات لازم تجویز شود. اگرچه این ویژگی ها در مطالعاتInsilico بسیار قابل توجه هستند اما مطالعات بیشتر در شرایط آزمایشگاهی و بالینی بر روی حیوانات جهت اطمنیان از صحت نتایج Insilico مربوط به لیگاند مهاری باید حتما در نظر گرفته شود.

مطالعه ما نشان داده است که رویکردهای محاسباتی یکپارچه می تواند برای پیش بینی کاندیداهای داروهای مهاری علیه عوارض التهابی اسیب زای پاتوژنها از جمله HCoV ، با روشهای جدید insilico مورد استفاده قرار گیرد. به این ترتیب ، در نتایج حاصل از داکینگ مشخص شد که لیگاند unknown24(03) با پروتئین IL6R سلولهای میزبان از طریق پیوندهای هیدروژنی با امینواسیدهای Arg118, Thr120,ser122,و از طریق پیوندهای استری با امینواسیدهای Trp115, ,Ser122, Arg118, Pro94,Thr125 ,Val93, Pro121, Glu96,Thr120, برهمکنشهای مهمی دارد که در این برهمکنشها سه امینواسید Arg118,Thr120,ser122 بخاطر شرکت در پیوندهای استری و هیدروژنی نقش کلیدی تری در اتصال و برهمکنش لیگاند مورد بررسی با پروتئین IL6R و ایجاد انرژی اتصالی مطلوب بین لیگاند و گیرنده داشتند.این میتواند بیانگر این باشد که ترکیب مورد بررسی میتواند در جهت کاهش فرایندهای التهابی در بسیاری از بیماریها بخصوص بیماری کوید-۱۹ ناشی از کروناویروسها به عنوان یک لیگاند مهاری جدید معرفی شود که البته اثبات این ادعا نیازمند انجام فرایندهای ازمایشگاهی می باشد.

تشکر و قدردانی

از کلیه کسانی که در جمع اوری داده های این مقاله مشارکت داشتند سپاسگزاری میکنیم.

References

1. Lin SH, Zhao YS, Zhou DX, Zhou FC, Xu F. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): cytokine storms, hyper-inflammatory phenotypes, and acute respiratory distress syndrome. Genes & Diseases. 2020 Jun 29.
2. Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. International journal of antimicrobial agents. 2020 Jun 1;55(6):105948.
3. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. International journal of antimicrobial agents. 2020 Mar 1;55(3):105924.
4. Jiang Q, Tan O. Corruption and enterprise innovation under the background of transition in China. In2019 6th International Conference on Behavioral, Economic and Socio-Cultural Computing (BESC) 2019 Oct 28 (pp. 1-5). IEEE.
5. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, Pan P, Wang W, Hu D, Liu X, Zhang Q. Coronavirus infections and immune responses. Journal of medical virology. 2020 Apr;92(4):424-32.
6. Conti P, Ronconi G, Caraffa AL, Gallenga CE, Ross R, Frydas I, Kritas SK. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. J Biol Regul Homeost Agents. 2020 Mar 1;34(2):1.
7. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science. 2020 Mar 27;367(6485):1444-8.
8. Touyz RM, Li H, Delles C. ACE2 the Janus-faced protein–from cardiovascular protection to severe acute respiratory syndrome-coronavirus and COVID-19.
9. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. Jama. 2020 Apr 7;323(13):1239-42.
10. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, Liu S, Zhao P, Liu H, Zhu L, Tai Y. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. The Lancet respiratory medicine. 2020 Apr 1;8(4):420-2.
11. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. The lancet. 2020 Mar 28;395(10229):1054-62.
12. Kritas SK, Ronconi G, Caraffa AL, Gallenga CE, Ross R, Conti P. Mast cells contribute to coronavirus-induced inflammation: new anti-inflammatory strategy. J Biol Regul Homeost Agents. 2020 Jan 1;34(1):9-14.
13. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS. Dysregulation of immune

response in patients with COVID-19 in Wuhan. China (February 17, 2020). 2013.
14. Zhang W, Zhao Y, Zhang F, Wang Q, Li T, Liu Z, Wang J, Qin Y, Zhang X, Yan X, Zeng X. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China. Clinical immunology. 2020 May 1;214:108393.
15. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siati DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodriguez A, Dequanter D, Blecic S, El Afia F, Distinguin L, Chekkoury-Idrissi Y. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2020 Aug;277(8):2251-61.
16. Avula A, Nalleballe K, Narula N, Sapozhnikov S, Dandu V, Toom S, Glaser A, Elsayegh D. COVID-19 presenting as stroke. Brain, behavior, and immunity. 2020 Jul 1;87:115-9.
17. Zhou Y, Hong Y, Huang H. Triptolide attenuates inflammatory response in membranous glomerulo-nephritis rat via downregulation of NF-κB signaling pathway. Kidney and Blood Pressure Research. 2016;41(6):901-10.
18. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, Shi Z, Hu Z, Zhong W, Xiao G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. Cell research. 2020 Mar;30(3):269-71.
19. Brusselle G, Bracke K. Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Annals of the American Thoracic Society. 2014 Dec;11(Supplement 5):S322-8.
20. Gudkov AV, Komarova EA. p53 and the carcinogenicity of chronic inflammation. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2016 Nov 1;6(11):a026161.
21. Hendrayani SF, Al-Harbi B, Al-Ansari MM, Silva G, Aboussekhra A. The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF-κB positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. Oncotarget. 2016 Jul 5;7(27):41974.
22. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiological reviews. 2001 Apr 1;81(2):807-69.
23. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. Nature Reviews Immunology. 2004 Jun;4(6):469-78.
24. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000 Dec 5;97(25):13766-71.
25. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular

docking. Journal of medicinal chemistry. 2006 Jun 1;49(11):3315-21.
26. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Scientific reports. 2017 Mar 3;7(1):1-3.
27. Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. Journal of medicinal chemistry. 2015 May 14;58(9):4066-72.
28. Huang SY, Zou X. Advances and challenges in protein-ligand docking. International journal of molecular sciences. 2010 Aug;11(8):3016-34.
29. Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. Viruses. 2012 Apr;4(4):557-80.
30. Vincent MJ, Bergeron E, Benjannet S, Erickson BR, Rollin PE, Ksiazek TG, Seidah NG, Nichol ST. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. Virology journal. 2005 Dec;2(1):1-0.
31. Dveksler GS, Pensiero MN, Cardellichio CB, Williams RK, Jiang GS, Holmes KV, Dieffenbach CW. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. Journal of virology. 1991 Dec;65(12):6881-91.
32. Refsgaard HH, Jensen BF, Brockhoff PB, Padkjær SB, Guldbrandt M, Christensen MS. In silico prediction of membrane permeability from calculated molecular parameters. Journal of medicinal chemistry. 2005 Feb 10;48(3):805-11.
33. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. Journal of medicinal chemistry. 2002 Jun 6;45(12):2615-23.
34. Ertl P, Schuffenhauer A. Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. Journal of cheminformatics. 2009 Dec;1(1):1-1.
35. Daina A, Zoete V. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. ChemMedChem. 2016 Jun 6;11(11):1117..
36. Ritchie TJ, Ertl P, Lewis R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. Drug Discovery Today. 2011 Jan 1;16(1-2):65-72.
37. Pliska V, Mannhold R, Kubinyi H, Timmerman H. Lipophilicity in drug action and toxicology. Testa B, van de Waterbeemd H, editors. Weinheim: VCH; 1996 Jul.

Design of an inhibitory ligand based on interleukin 6 (IL6R)receptor for disruption and inhibition of interleukin 6-dependent inflammatory signaling pathway in Covid-19 patients

Pirmoradi S [1], Darvish Khadem M [2], Esmaeil lashgarian H [*3]

1.Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

2. Ph.D.in Biochemistry, Department of Biochemistry, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

Abstract

***Background*:** The covid 19 pandemic since it was first discovered in late 2019 has made a great impact on human health worldwide. At present, no specific drug and treatment methods have been discovered to treat this disease. On the other hand, excessive inflammation due to high cytokines secretion in Covid-19 patients results in fatal effects including organ failure and death. Therefore, to define a better understanding of the pathophysiology of this virus, scientists are trying to use a variety of methods such as examining some available anti-inflammatory drugs or evaluating Insilico inhibitory compounds as IL-6 receptor (IL–6R) inhibitors to modulate parts of the immune system.

Materials and Methods: In this study, after designing Insilico, docking was performed between inhibitory ligands and IL6R. Subsequently, the appropriated ligand was evaluated for toxicity and allergy, and ADME prediction (absorption, distribution, metabolism, and excretion).

Results: The results of the molecular docking showed that between the non-polar parts of the designed inhibitory ligand composition, mainly with parts of IL–6R protein containing amino acids of Arg118, Thr120, ser122 hydrogen interaction took place. The amino acids of Arg118, Ser122, Trp115, Thr120, Glu96, , Pro121, Val93, Thr125 and Pro94 also demonstrate ester interactions.

Conclusion: Docking results demonstrated that out of 100 studied ligands, [03] unknown (24) has more suitable binding energy (-114.648) with the IL-6R than other ligands and this energy level indicates a favorable interaction between this inhibitory compound and IL–6R through amino acids of Ser122, Arg118, Trp115, Glu96, Thr120, Pro121, Val93, Pro94, and Thr125. Clinical studies are needed to prove the inhibitory effect of this ligand on the IL6R.

Keywords: Inhibitory ligand, Insilico, Interleukin 6, Inflammation, Docking.

Citation: Pirmoradi S, Darvish Khadem M, Esmaillashgarian H. Design of an inhibitory ligand based on interleukin 6 (IL6R)receptor for disruption and inhibition of interleukin 6-dependent inflammatory signaling pathway in Covid-19 patients. Yafte. 2021; 23(1):344-355.