Iranian Journal of Biomedical Engineering
11 (4) (2018) 303-311, www.ijbme.org
DOI: 10.22041/ijbme.2018.81637.1324

Molecular Dynamics Simulation of PASylated G-CSF and Proposing a Modified PAS String Sequence in order to Improve Drug's Properties

A. Gholami[1], A. Shamloo[2*]

[1]MSc Graduated, Mechanical Engineering Department, Sharif University of Technology, Tehran, Iran
[2]Associate Professor, Mechanical Engineering Department, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

Receipt in the Online Submission System: 16 February 2018, Received in Revised Form: 19 May 2018, Accepted: 7 June 2018

Abstract

PASylation is a new and effective way to increase the half-life of pharmaceutical proteins. This method is an alternative of PEGylaion and uses the natural polymers of Proline, Alanine, and Serine (PAS) amino acids in its structure. In this paper, we have studied the pharmacokinetic properties of PASylated Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) using Molecular Dynamics (MD) simulation for three different PAS strings length 210, 420 and 630. We studied several important mechanical quantities involving in enhancing half-life time of the conjugated protein like root-mean-square distance (RMSD), hydrodynamic volume, protein total energy and its hydrophilicity and we found out volume expansion, increase in hydrophilicity amount and coil structure in PASylation are main mechanical properties influencing half-life time. We also found out that RMSD will be modified by PASylation while energy level shows erratic behavior examining the mentioned residues properties, we have also offered a modified sequence for PAS string according to the importance of different parameters in PAS string's function.

Keywords: ***Pegylation, Pasylation, G-CSF, Half-Life, Hydrodynamic Volume, Molecular Dynamic***

[*] **Corresponding Author**
Address: Mechanical Engineering Department, Mechanical Engineering Faculty, Sharif University of Technology, P. O. Box: 11155-9567, Tehran, Iran
Tel: *+98-21-66165691*
Fax: *+98-21-66000021*
E-mail: *shamloo@sharif.ir*

© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org

مجله مهندسی پزشکی زیستی
دوره ۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، ۳۱۱-۳۰۳
شناسه دیجیتال: 10.22041/ijbme.2018.81637.1324

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اضافه شدن رشته‌ی PAS به داروی پپتیدی G-CSF و پیشنهاد توالی جدید برای رشته‌ی PAS به منظور بهبود عمل‌کرد داروی مورد نظر

عباس غلامی[۱]، امیر شاملو[۲*]

[۱] کارشناس ارشد مهندسی مکانیک، گروه تبدیل انرژی، دانشکده‌ی مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران
[۲] دانشیار، گروه تبدیل انرژی، دانشکده‌ی مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

تاریخ ثبت در سامانه: ۱۳۹۶/۱۱/۲۷، بازنگری: ۱۳۹۷/۲/۲۹، پذیرش قطعی: ۱۳۹۷/۳/۱۷

چکیده

در مطالعات اخیر، PASylation به عنوان یک روش موثر به منظور افزایش نیمه‌عمر داروهای پروتئینی و جایگزینی مناسب برای PEGylation مطرح شده است. در این روش، یک رشته‌ی به مراتب زیست‌سازگارتر و متشکل از پلیمرهای طبیعی، شامل پرولین، آلانین و سرین، که به اختصار به آن رشته‌ی PAS گفته می‌شود، برای بهبود مشخصه‌های دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مقاله، برخی از مشخصه‌های داروی G-CSF، نظیر میانگین توانی فاصله‌ی اتمی (RMSD)، حجم هیدرودینامیکی، انرژی کل و میزان آب‌دوستی پروتئین مورد بررسی قرار گرفته است. در این راستا، خواص مختلف داروی پروتئینی متصل به رشته‌ی PAS برای سه طول مختلف رشته‌ی مورد نظر (طول‌های ۲۱۰، ۴۲۰ و ۶۳۰) مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. نتایج به دست آمده بیان‌گر این نکته است که با اتصال رشته‌ی PAS به داروی پروتئینی، حجم هیدرودینامیکی آن افزایش یافته و به واسطه‌ی آن نیمه‌عمر دارو نیز افزایش می‌یابد. در نهایت، با در نظر داشتن نتایج به دست آمده در این قسمت، یک توالی اصلاح‌شده برای رشته‌ی PAS مورد نظر پیشنهاد شده است.

کلیدواژه‌ها: ***PEGylation*، *PASylation*، *G-CSF*، نیمه‌عمر، حجم هیدرودینامیکی، دینامیک مولکولی**

[*] نویسنده مسئول
نشانی: گروه تبدیل انرژی، دانشکده‌ی مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران، کد پستی: ۹۵۶۷-۱۱۱۵۵
تلفن: ۶۶۱۶۵۶۹۱ (۲۱) ۹۸+
دورنگار: ۶۶۰۰۰۰۲۱ (۲۱) ۹۸+
پست الکترونیکی: shamloo@sharif.ir

© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org

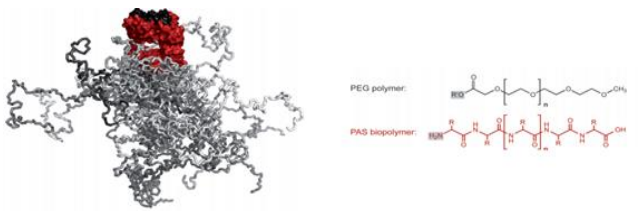
۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، رشد چشم‌گیری در زمینه‌ی مطالعات مربوط به داروهای پروتئینی و پلی‌پپتیدی، به خصوص در شاخه‌هایی که مکانیزم مولکولی بیماری‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد، صورت گرفته است [۱-۴]. یکی از مشکلات اساسی داروهای پروتئینی و پلی‌پپتیدی، نیمه‌عمر کوتاه و دفع سریع آن‌ها از بدن می‌باشد [۵, ۶]. چرا که در این صورت، اثرگذاری داروی مورد نظر به واسطه‌ی مکانیزم فیلتراسیون بدن انسان و ایمن‌سازی ناشی از سیستم دفاعی بدن، بسیار کاهش می‌یابد. به همین دلیل، مطالعات زیادی به منظور افزایش نیمه‌عمر دارو و به تبع آن افزایش اثربخشی آن صورت گرفته است. روش PEGylation، که نخستین بار توسط ابوچفسکی[۱] در سال ۱۹۷۷ معرفی شد، یک روش موثر و البته بسیار گسترده برای غلبه بر ایراد مطرح شده‌ی داروهای پروتئینی می‌باشد [۵].

با وجود عمل‌کرد قابل قبول روش PEGylation در افزایش نیمه‌عمر برخی از داروها، این روش مشکلاتی را نیز به وجود می‌آورد. به عنوان مثال، با افزایش وزن مولکولی رشته‌ی PEG، میزان سمی بودن این رشته افزایش می‌یابد، هم‌چنین این رشته در ابعاد بزرگ، خواص آب‌گریزی از خود به نمایش می‌گذارد. غیرطبیعی و تخریب‌ناپذیر بودن رشته‌ی PEG، در صدر تمام معایب روش PEGylation است که منجر به تجمیع آن در بافت و مشکلات اجتناب‌ناپذیر کلیوی می‌شود [۷-۹].

در سال‌های اخیر، اسکولاپسکی[۲] و هم‌کارانش روشی با نام PASylation را به عنوان جایگزینی برای روش PEGylation معرفی کردند، که در آن از پلیمرهای آب‌دوست، طبیعی و بدون بار، شامل سه آمینواسید پرولین[۳]، آلانین[۴] و سرین[۵] استفاده شده است [۱۰]. شکل (۱) ساختار شیمیایی این دو رشته را با یک‌دیگر مقایسه می‌کند. یکی از مزایای رشته‌ی PAS در مقایسه با رشته‌ی PEG، قابلیت مهندسی کردن ساختار آن به واسطه‌ی وجود توالی‌های آمینواسیدی در آن می‌باشد. ساختار رشته‌ی PAS به گونه‌ای است که افزایش طول رشته، به سادگی، در مدت زمان اندک و خارج از بدن صورت می‌گیرد [۱۱-۱۶]. یکی از مشکلات اصلی جهت دست‌رسی به ساختاری بهینه برای رشته‌ی PAS، درک مکانیزم کلیدی است که منجر به پایداری و افزایش نیمه‌عمر دارو می‌شود. در این راستا، روش‌های آزمایشگاهی، زمان‌بر، دشوار و غیراقتصادی می‌باشند. از طرف دیگر، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی[۶] (MD)، یک روش کارآمد برای بررسی دقیق‌تر مجموعه‌ی دارو و رشته‌ی PAS می‌باشد [۱۷, ۱۸]. لی[۷] و هم‌کارانش، از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به منظور درک نحوه‌ی اثرگذاری روش PEGylation بر افزایش پایداری دارو، استفاده کردند. آن‌ها با بررسی اندرکنش[۸] بین مجموعه‌ی دارو و رشته‌ی PEG با مولکول‌های آب، و تاثیر آن بر نیمه‌عمر دارو و نرخ دفع آن برای انسولین، نتایج به دست آمده را با نتایج آزمایشگاهی مقایسه کردند [۱۹].

آب‌دوستی، یکی از مشخصه‌های مهم داروهای پلی‌پپتیدی است، که نقش به‌سزایی در اثرگذاری دارو دارد. مولکول‌های با آب‌دوستی بیش‌تر، قابلیت حل‌شدن بیش‌تری در آب داشته و در نتیجه، سلول‌های بدن نیز بیش‌تر آن‌ها را جذب می‌کنند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که روش PEGylation، میزان آب‌دوستی پپتیدها را زیاد می‌کند [۸]. به طور مشابه، مطالعات اخیر حاکی از این نکته هستند که روش PASylation نیز میزان آب‌دوستی داروها را افزایش می‌دهد [۱۰]. پتانسیل نیروی متوسط[۹] (PMF)، یک معیار مناسب برای بررسی آب‌گریزی مولکول‌ها، و پیش‌بینی رفتار سیستم با تحلیل تغییرات انرژی آزاد سیستم و پتانسیل‌های بین مولکولی می‌باشد [۲۰-۲۲]. فاکتور دیگر به منظور اندازه‌گیری آب‌گریزی، سطح مقطع در دست‌رس[۱۰] (ASA) است که بیان‌گر سطح مقطع در دست‌رس، زمانی که مولکول مورد نظر در یک حلال حل می‌شود، می‌باشد [۲۰]. این فاکتور برای آمینواسیدهای مختلف محاسبه شده، و در قالب جدول‌هایی در دست‌رس می‌باشد [۲۳, ۲۴]. شمارش تعداد پیوندهای هیدروژنی، که بیان‌گر تمایل اندرکنش مولکول مورد نظر و آب می‌باشد، نیز یک روش ساده به منظور تحلیل آب‌گریزی مولکول‌ها می‌باشد، که در مطالعه‌ی حاضر از این روش استفاده شده است [۲۵].



شکل (۱)- ساختار اضافه شدن رشته‌ی PAS به دارو (سمت چپ) و مقایسه بین ساختار شیمیایی رشته‌ی PEG و PAS (سمت راست)

[۱] Abuchowski
[۲] Schlapschy
[۳] Proline
[۴] Alanine
[۵] Serine
[۶] Molecular Dynamic Simulation
[۷] Lie
[۸] Interaction
[۹] Potential of Mean Force
[۱۰] Accessible Surface Area

© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org

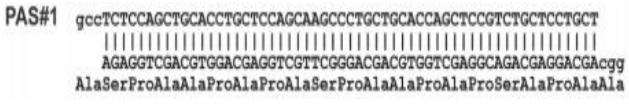
در این مطالعه، G-CSF، به دلیل قابلیت تولید انبوه با روش کلونی‌سازی با استفاده از باکتری E.coli، و مشکلات عدیده‌ی آن در دفع نامناسب و نیمه‌عمر کوتاه، به عنوان داروی مدل، مورد استفاده قرار گرفته است. سه رشته‌ی PAS با طول‌های مختلف ۲۱۰، ۴۲۰ و ۶۳۰، به منظور برآورد طول بهینه‌ی رشته‌ی PAS مورد بررسی قرار گرفته است. در نهایت، و بر مبنای داده‌های به دست آمده در قسمت‌های قبل، یک رشته‌ی PAS بهینه پیش‌بینی شده است.

۲- روش‌ها

PDB1CD9 به عنوان ساختار دوم برای داروی G-CSF، که نمایش دهنده‌ی ساختار آن در مجاورت پذیرنده‌های آن در داخل بدن می‌باشد، انتخاب شده است [۱۷]. به این طریق، انتظار می‌رود که نتایج حاصل از شبیه‌سازی، به نتایج اثربخشی دارو در داخل بدن بسیار نزدیک باشد. لازم به ذکر است که زنجیره‌ی A از فایل PDB این دارو مورد مطالعه قرار گرفته است. شکل (۲)، پروتئین مورد نظر را در مجاورت پذیرنده‌های آن نمایش می‌دهد.

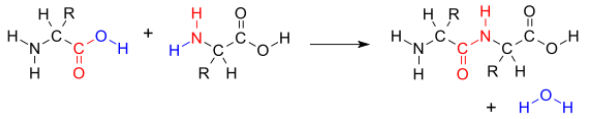
شکل (۲)- ساختار G-CSF (زنجیره‌ی A، ساختار مارپیچ آلفا)، کد PDB: PDB1CD9

در مطالعه‌ی حاضر، توالی پیشنهاد شده توسط اسکولاپسکی[۱] که در اولین مطالعه‌ی وی در زمینه‌ی PASylation معرفی شده است (شکل ۳) [۱۰]، به عنوان مرجع به منظور تولید رشته‌ی PAS در نظر گرفته شده است. ساختار ثانویه‌ی رشته‌ی PAS در طول‌های ۲۱۰، ۴۲۰ و ۶۳۰ بر مبنای توالی ذکر شده توسعه داده شده است.

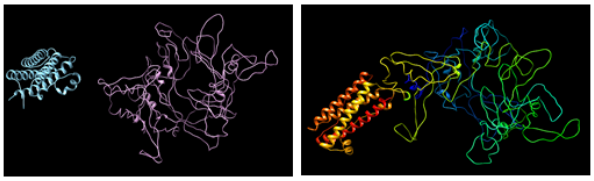


شکل (۳)- توالی آمینواسید پیشنهاد شده توسط اسکولاپسکی برای رشته‌ی PAS

پیوند بین پروتئین و رشته‌ی PAS، یک پیوند پپتیدی ساده است، به نحوی که پایانه‌ی C از رشته‌ی PAS به پایانه‌ی N از پروتئین، به صورت ژنتیکی متصل می‌شود (شکل ۴ واکنش شیمیایی مربوط به پیوندهای پپتیدی را نشان می‌دهد) [۱۰]. پس از آرام‌سازی پروتئین و رشته‌ی PAS به مقدار ۵ میلی‌ثانیه با استفاده از نرم‌افزار NAMD، پروتئین و رشته‌ی PAS با بهره‌گیری از نرم‌افزار CHIMERA و با یک پیوند پپتیدی ساده به یک‌دیگر متصل می‌شوند (شکل ۵ اتصال دارو و رشته‌ی PAS را در محیط نرم‌افزار CHIMERA نشان می‌دهد).



شکل (۴)- پیوند پپتیدی و واکنش بین پروتئین و رشته‌ی PAS به منظور تشکیل این پیوند (گروه کربوکسیلی رشته‌ی PAS با گروه آمینواسیدی پروتئین واکنش می‌دهد)



شکل (۵)- ساختار G-CSF و رشته‌ی PAS420 جفت نشده (سمت چپ) و جفت شده (سمت راست)

پس از تولید مجموعه‌های G-CSF-PAS210، G-CSF-PAS420 و G-CSF-PAS630، که به ترتیب شامل ۱۷۱، ۳۸۱ و ۸۰۱ جزء[۲]می‌باشند، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با گام زمانی ۲ fs به مدت ۱۵ تا ۳۰ fs انجام شد. در نهایت، برخی از مشخصه‌های مکانیکی پروتئین جفت شده، شامل حجم هیدرودینامیکی، سطح مقطع در دسترس، انرژی مجموعه، RMSD و آب‌دوستی مورد بررسی قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه‌گیری‌های حجم و سطح

پروتئین‌ها و پپتیدهای بزرگ‌تر، دفع کلیوی کم‌تری داشته و به عبارت دیگر، نیمه‌عمر بیش‌تری دارند. به منظور بررسی اثرات افزودن رشته‌ی PAS به داروی پروتئینی در نیمه‌عمر دارو، می‌توانیم حجم هیدرودینامیکی آن را تخمین بزنیم. بنابراین، با ادغام نتایج به دست آمده از نرم‌افزار NAMD (شبیه‌سازی

[۱] Schlapschy

[۲] Residue

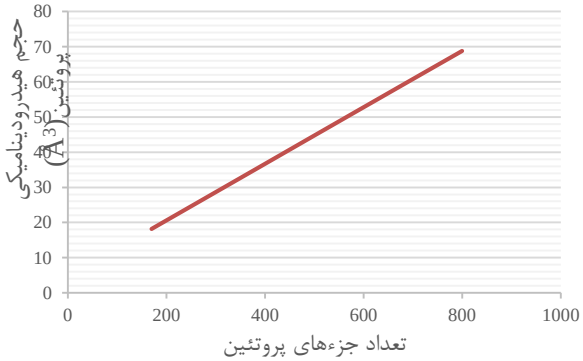
© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org

دینامیک مولکولی)، نرم‌افزار CHIMERA و نرم‌افزار محاسبه‌ی حجم (VA)، می‌توان حجم و سطح پروتئین را محاسبه کرد. نتایج به دست آمده در این قسمت، در جدول (۱) آورده شده است.

جدول (۱)- نتایج به دست آمده برای سطح و حجم مجموعه‌ی G-CSF-PAS

	G-CSF	G-CSF-PAS210	G-CSF-PAS420	G-CSF-PAS630
سطح ($Å^2$)	۱۶۵۱۲	۳۲۲۱۱	۴۷۷۴۲	۶۳۰۰۱
حجم ($Å^3$)	۱۸۲۱۳	۳۵۰۸۹	۵۱۹۸۰	۶۸۷۹۲

رابطه‌ی بین حجم هیدرودینامیکی پروتئین و تعداد جزءهای آن، که به صورت خطی تقریب زده شده است، در شکل (۶) نمایش داده شده است.



شکل (۶)- تغییرات حجم هیدرودینامیکی پروتئین بر مبنای تعداد جزءهای آن برای مجموعه‌ی G-CSF-PAS

۳-۲- میانگین توانی فاصله‌ی اتمی (RMSD)

میانگین توانی فاصله‌ی اتمی[۱] (RMSD)، در واقع فاصله‌ی میانگین بین اتم‌های پروتئین نسبت به حالت اولیه‌ی آن می‌باشد، که به صورت زیر تعریف می‌شود.

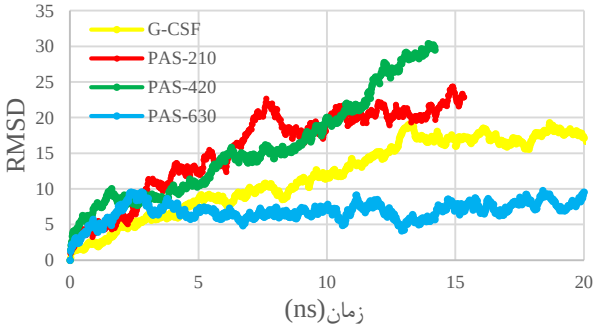
$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_i d_i^2}{n}}$$

که در رابطه‌ی فوق، d_i فاصله‌ی بین اتم i نسبت به حالت اولیه‌ی آن می‌باشد.

میزان شباهت بین دو پروتئین با تعداد اجزای مختلف، با استفاده از RMSD بی‌بعد شده، سنجیده می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر، RMSD مربوط به جزء پروتئین از مجموعه‌ی پروتئین-رشته‌ی PAS، با استفاده از ابزار مربوطه در نرم‌افزار VMD مورد بررسی قرار گرفته است.

[۱] Root-Mean-Square Distance

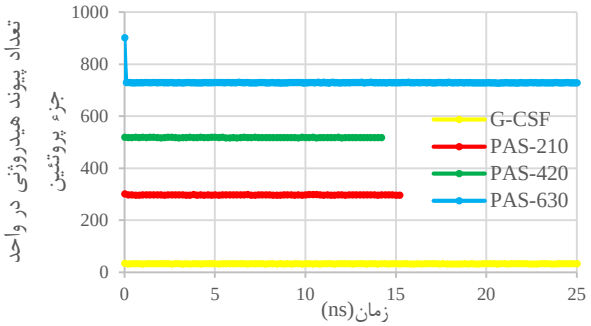
نتایج به دست آمده بیان‌گر این موضوع است که RMSD برای قسمت پروتئینی از مجموعه‌ی پروتئین-رشته‌ی PAS، برای سه مورد پروتئین تنها، پروتئین-رشته‌ی PAS210 و پروتئین-رشته‌ی PAS420، تفاوت زیادی نمی‌کند، اما برای مجموعه‌ی پروتئین-رشته‌ی PAS630، به صورت محسوسی کاهش پیدا می‌کند، که این به معنی آرام‌تر بودن مجموعه‌ی مورد نظر در مقایسه با سایر مجموعه‌ها در بدن می‌باشد.



شکل (۷)- مقایسه‌ی RMSD برای چهار نمونه‌ی پروتئین تنها، پروتئین-PAS210، پروتئین-PAS 420 و پروتئین-PAS630

۳-۳- آب‌دوستی

افزایش تعداد جزءهای پروتئین، به افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی منجر می‌شود، اما تعداد پیوندهای هیدروژنی، معیار مناسبی برای مقایسه‌ی میزان آب‌دوستی مجموعه‌های مختلف دارو نمی‌باشد. به همین دلیل، ملزم به مقایسه‌ی تعداد پیوندهای هیدروژنی به ازای هر جزء از مجموعه‌ی پروتئینی مورد نظر هستیم. این مقایسه برای مجموعه‌های مختلف دارو و رشته‌ی PAS انجام شده و در شکل (۸) آورده شده است.



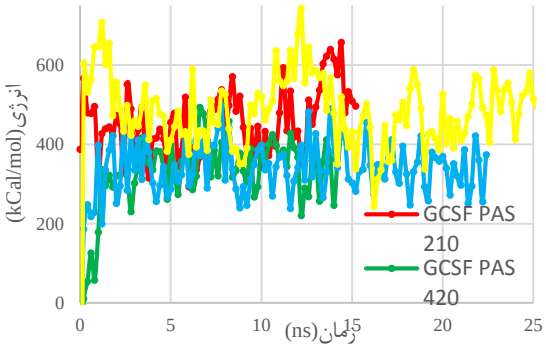
شکل (۸)- مقایسه‌ی تعداد پیوندهای هیدروژنی به ازای واحد جزء برای دارو به تنهایی، دارو-PAS210، دارو-PAS420 و دارو-PAS630

با توجه به شکل (۸)، اضافه کردن رشته‌ی PAS به پروتئین، به افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی در واحد جزء پروتئین منجر شده که به معنی آب‌دوستی بیش‌تر مجموعه می‌باشد.

© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org

۳-۴- انرژی

انرژی کل، که شامل مجموع انرژی‌های واندروالس، دایهدرال، الکترواستاتیک و غیره می‌باشد، می‌تواند به عنوان معیاری برای مقایسه‌ی پایداری مجموعه‌های پروتئینی مختلف در نظر گرفته شود. به همین دلیل، انرژی کل مربوط به جزء پروتئینی و دارویی مجموعه، به صورت مجزا تعیین شده و در شکل (۹) مقایسه شده است. لازم به ذکر است که در مقایسه‌ی انجام شده، انرژی اندرکنش بین مولکول‌های رشته‌ی PAS و مولکول‌های آب حذف شده است.



شکل (۹)- انرژی کل برای دارو به تنهایی، دارو-PAS210، دارو-PAS420 و دارو-PAS630 (فقط برای قسمت دارویی مجموعه)

.انرژی کل کمتر یک مجموعه در آب به معنی پایدارتر بودن مجموعه مورد نظر در محیط آبی می‌باشد. با توجه به شکل۹، با تقریب خوبی می‌توان گفت که با افزایش تعداد اجزا در رشته‌ی PAS، پایداری مجموعه حاصل شده در آب بیش‌تر می‌شود.

۴- اصلاح توالی رشته‌ی PAS

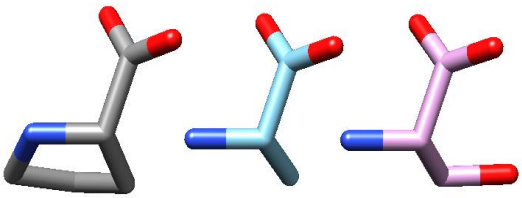
با در نظر داشتن نقش غیر قابل انکار توالی رشته‌ی PAS در عمل‌کرد روش PASylation، که توسط اسکولاپسکی و هم‌کاران پیشنهاد شده بود، می‌توان با تغییر این توالی و حرکت در مسیر یافتن توالی بهینه برای این رشته، نیمه‌عمر و پایداری مجموعه‌ی دارو-رشته‌ی PAS را بهبود بخشید. در این راستا، انجام سعی و خطا در توالی‌های مختلف از پرولین، آلانین و سرین به منظور یافتن ترکیب بهینه، روشی زمان‌بر و پرهزینه است. می‌توانیم از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، به عنوان یک جایگزین قابل اعتماد برای روش‌های آزمایشگاهی، برای بررسی و بهینه‌سازی توالی رشته‌ی PAS استفاده کنیم. به منظور ساده‌سازی روند بررسی توالی‌های مختلف، در ادامه الگوریتمی پیشنهاد شده است که ما را به سمت یافتن ساختار مناسب سوق می‌دهد.

۴-۱- الگوریتم

رشته‌های مختلف PAS باید برخی از الزامات را در ساختار خود داشته باشند تا منجر به افزایش نیمه‌عمر دارو گردند:

۱- این رشته‌ها باید تا حد ممکن حجیم باشند.
۲- مقدار آب‌دوستی آن‌ها باید زیاد باشد.
۳- در ساختار خود باید مارپیچ[۱] داشته باشند.
۴- باید قابل تولید باشند.

به منظور بررسی الزامات ذکر شده، ساختار سه آمینواسید مورد استفاده در رشته‌ی PAS در شکل (۱۰) آورده شده است.



شکل (۱۰)- ساختار مولکولی پرولین، آلانین و سرین (از چپ به راست) که در آن اکسیژن با رنگ قرمز و نیتروژن با رنگ آبی نمایش داده شده است

هر یک از آمینواسیدهای مورد استفاده در ساختار رشته‌ی PAS مشخصه‌هایی دارند که آن‌ها را با الزامات ذکر شده سازگار می‌کند. به عنوان مثال، پرولین در ساختار خود یک حلقه‌ی پیریدین[۲] دارد، که منجر به دشواری‌هایی در روند تولید آن می‌شود، و از طرف دیگر، حجم هیدرودینامیکی ساختار مورد نظر را زیاد می‌کند، بنابراین این آمینواسید، کلیدی‌ترین آمینواسید به منظور افزایش حجم ساختار دارو می‌باشد. هم‌چنین ساختار ساده‌ی آلانین باعث تولید ساده‌تر رشته‌ی PAS مورد نظر می‌شود. آمینواسید سرین نیز به واسطه‌ی وجود اکسیژن در ساختار خود، منجر به تشکیل پیوندهای هیدروژنی در محیط آبی شده و از این جهت به منظور افزایش آب‌دوستی رشته‌ی PAS مهم می‌باشد.

با در نظر داشتن اهمیت هر یک از آمینواسیدهای مورد استفاده، توالی زیر از پرولین، آلانین و سرین برای رشته‌ی PAS پیشنهاد شده است:

Ala-Pro-Ser-Pro-Ala-Ser

توالی پیشنهاد شده، یک توالی ۸ جزئی است که می‌تواند به عنوان یک پایه برای تولید رشته‌های PAS با طول‌های دل‌خواه مورد استفاده قرار گیرد. طول‌های مختلف رشته‌ی PAS با پشت سر هم قرار گرفتن این توالی حاصل می‌شوند.

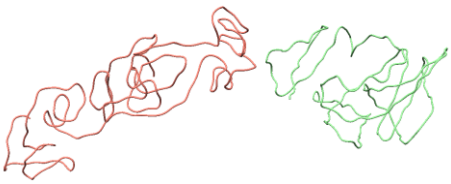
[۱] Coil
[۲] Pyridine

© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org

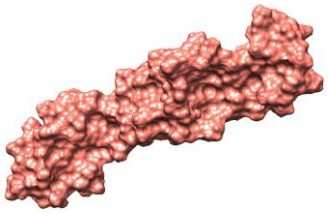
۴-۲- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

در این قسمت، یک رشته‌ی ۲۰۸ جزئی از توالی پیشنهادی تولید شده و قصد داریم نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی را برای آن با نتایج حاصل از رشته‌ی ۲۱۰ جزئی که از پیش بررسی شده بود، مورد مقایسه قرار دهیم. با در نظر داشتن اهمیت حجم هیدرودینامیکی رشته‌ی تولید شده، این رشته‌ی جدید پیش از آغاز سایر مراحل، تحت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی خلاء قرار گرفته است، تا حجم مورد نظر به آرامش برسد. همان‌طور که در قسمت‌های پیشین مطرح شد، مهم‌ترین فاکتور تاثیرگذار در نیمه‌عمر دارو، حجم هیدرودینامیکی آن است و به همین دلیل رشته‌ی تولید شده به مدت ns ۱ تحت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی خلاء قرار گرفته است تا حجم آرامش یافته‌ی آن به دست آید. لازم به ذکر است که این شبیه‌سازی فقط به منظور آرامش و محاسبه‌ی حجم هیدرودینامیکی رشته‌ی مورد نظر انجام می‌شود و سایر پارامترهای دخیل، نظیر آب‌دوستی، از آن منتج نمی‌شوند. ساختار رشته‌ی PAS اصلاحی با ۲۰۸ جزء، در مقایسه با ساختار ۲۱۰ جزئی پیشین، در شکل (۱۱) نمایش داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هر دو رشته در ساختار خود مارپیچ داشته و حجم رشته‌ی اصلاحی بیش‌تر به نظر می‌رسد.

ساختار سطح جامد رشته‌ی PAS208 در شکل (۱۲) نمایش داده شده است. هم‌چنین مقادیر عددی مربوط به سطح و حجم این دو رشته، محاسبه شده و در جدول (۲) آورده شده است. با در نظر گرفتن مقادیر ذکر شده در جدول (۲)، حجم هیدرودینامیکی رشته‌ی اصلاحی، در مقایسه با رشته‌ی ۲۱۰ جزئی، ۱۵ درصد افزایش یافته است که این افزایش منجر به زیاد شدن نیمه‌عمر داروی جفت شده خواهد شد.



شکل (۱۱)- ساختار رشته‌ی ۲۰۸ جزئی اصلاحی (سمت چپ) و رشته‌ی ۲۱۰ جزئی (سمت راست)



شکل (۱۲)- ساختار سطح جامد به منظور محاسبه‌ی حجم رشته‌ی PAS اصلاحی

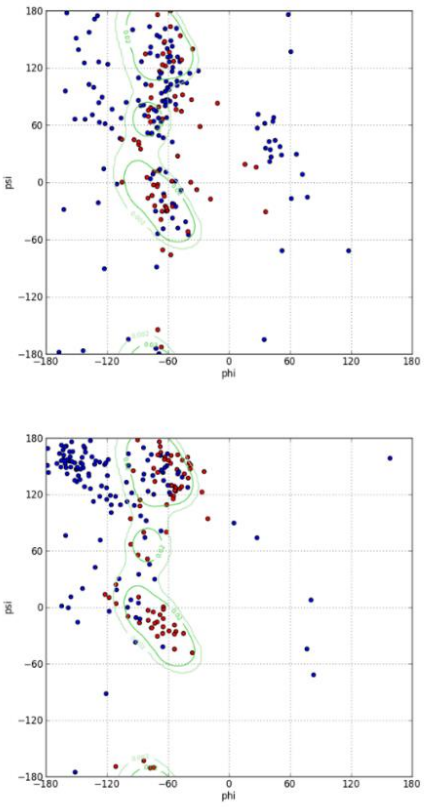
جدول (۲)- حجم و سطح محاسبه شده برای رشته‌های PAS

	PAS 208	PAS210
سطح ($Å^2$)	۸۴۲۲	۱۲۲۴۰
حجم ($Å^3$)	۱۸۹۳۰	۱۶۳۶۰

۴-۳- طرح راماچاندران (Ramachandran)

طرح راماچاندران، کلیه‌ی مقادیر ممکن برای phi و psi، که تعیین کننده‌ی ساختار سه‌بعدی متشکل از آمینواسیدهای طبیعی هستند، را پوشش می‌دهد. برای بررسی قابلیت تولید توالی پیشنهاد شده برای رشته‌ی PAS، باید انطباق توالی مورد نظر با طرح راماچاندران بررسی شود.

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، روند تولید آمینواسید پرولین، به دلیل وجود مارپیچ در ساختار آن، به مراتب دشوارتر از دو آمینواسید دیگر می‌باشد. شکل (۱۳)، طرح راماچاندران را برای آمینواسید پرولین در هر دو ساختار ۲۱۰ جزئی و ۲۰۸ جزئی (اصلاحی) رشته‌ی PAS نشان می‌دهد. طرح راماچاندران به وضوح بیان‌گر این نکته است که این ساختار به صورت طبیعی قابل تولید بوده و هم‌چنین در مقایسه با رشته‌ی PAS210، سازگاری بیش‌تری با طرح مذکور دارد.



شکل (۱۳)- طرح راماچاندران برای جزء پرولین (نقاط قرمز) در ساختار PAS210 (بالا) و PAS208 (پایین)، منحنی‌های بسته‌ی سبز رنگ بیان‌گر پیدایش طبیعی phi و psi از ساختار پرولین می‌باشند

© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org

۵- نتیجه‌گیری

در این مقاله، برخی از مشخصه‌های مجموعه‌ی G-CSF-PAS، شامل RMSD، حجم هیدرودینامیکی، انرژی کل پروتئین و آب‌دوستی، به منظور بررسی نیمه‌عمر و پایداری دارو در بدن، مورد مطالعه قرار گرفت. با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده برای سه رشته‌ی PAS با طول‌های مختلف، مشاهده شد که ساختار مارپیچ زنجیره و حجم هیدرودینامیکی آن، مهم‌ترین فاکتورهای تاثیرگذار در نیمه‌عمر دارو است، به طوری که افزایش حجم هیدرودینامیکی مجموعه، منجر به افزایش میزان آب‌دوستی آن می‌شود.

با در نظر داشتن اهمیت پارامترهای مختلف، توالی جدیدی از سه آمینواسید پیش‌تر استفاده شده، به منظور تولید رشته‌ی PAS پیشنهاد شد. در ادامه نشان داده شد که توالی پیشنهاد شده بر اساس طرح راماچاندران قابل تولید بوده و حجم هیدرودینامیکی آن نیز در، مقایسه با رشته‌ی PAS موجود، ۱۵ درصد افزایش می‌یابد که این افزایش منجر به افزایش نیمه‌عمر دارو خواهد شد.

۶- مراجع

[1] Duncan, R., Polymer therapeutics: Top 10 selling pharmaceuticals — What next? Journal of Controlled Release, 2014. 190(Supplement C): p. 371-380.

[2] Pasut, G., Polymers for Protein Conjugation. Polymers, 2014. 6(1): p. 160.

[3] Harari, D., et al., Enhanced in vivo efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis. The Journal of biological chemistry, 2014. 289(42): p. 29014-29029.

[4] Leader, B., Q.J. Baca, and D.E. Golan, Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. Nature reviews. Drug discovery, 2008. 7(1): p. 21.

[5] Abuchowski, A., et al., Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. Journal of Biological Chemistry, 1977. 252(11): p. 3582-6.

[6] Caliceti, P. and F.M. Veronese, Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. 55(10): p. 1261-1277.

[7] Webster, R., et al., PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. PEGylated protein drugs: Basic science and clinical applications, 2009: p. 127-146.

[8] Harris, J.M. and R.B. Chess, Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nature reviews. Drug discovery, 2003. 2(3): p. 214.

[9] Bailon, P., et al., Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α-2a for the treatment of hepatitis C. Bioconjugate chemistry, 2001. 12(2): p. 195-202.

[10] Schlapschy, M., et al., PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. Protein Engineering, Design & Selection, 2013. 26(8): p. 489-501.

[11] Veronese, F.M. and G. Pasut, PEGylation, successful approach to drug delivery. Drug discovery today, 2005. 10(21): p. 1451-1458.

[12] Gabizon, A., et al., Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid–PEG conjugates. Advanced drug delivery reviews, 2004. 56(8): p. 1177-1192.

[13] Garay, R.P., et al., Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. 2012, Taylor & Francis.

[14] Greenwald, R.B., et al., Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. Advanced drug delivery reviews, 2003. 55(2): p. 217-250.

[15] Patri, A.K., J.F. Kukowska-Latallo, and J.R. Baker, Targeted drug delivery with dendrimers: comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. Advanced drug delivery reviews, 2005. 57(15): p. 2203-2214.

[16] Knop, K., et al., Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. Angewandte Chemie International Edition, 2010. 49(36): p. 6288-6308.

[17] Carlson, H.A. and J.A. McCammon, Accommodating protein flexibility in computational drug design. Molecular pharmacology, 2000. 57(2): p. 213-218.

[18] Lill, M.A. and M.L. Danielson, Computer-aided drug design platform using PyMOL. Journal of computer-aided molecular design, 2011. 25(1): p. 13-19.

[19] Yang, C., D. Lu, and Z. Liu, How PEGylation enhances the stability and potency of insulin: a molecular dynamics simulation. Biochemistry, 2011. 50(13): p. 2585-2593.

[20] Yang, H. and A.H. Elcock, Association lifetimes of hydrophobic amino acid pairs measured directly from molecular dynamics simulations. Journal of the American Chemical Society, 2003. 125(46): p. 13968-13969.

[21] Eun, C., Molecular dynamics simulations study of hydrophilic and hydrophobic interactions between nanoscale particles. 2010.

[22] Maiti, M., et al., Potential of mean force between hydrophobic solutes in the Jagla model of water and implications for cold denaturation of proteins. The Journal of chemical physics, 2012. 136(4): p. 044512.

[23] Samanta, U., R.P. Bahadur, and P. Chakrabarti, Quantifying the accessible surface area of protein

© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org

residues in their local environment. Protein engineering, 2002. 15(8): p. 659-667.
[24] Moelbert, S., E. Emberly, and C. Tang, Correlation between sequence hydrophobicity and surface-exposure pattern of database proteins. Protein Science, 2004. 13(3): p. 752-762.
[25] Moret, M. and G. Zebende, Amino acid hydrophobicity and accessible surface area. Physical Review E, 2007. 75(1): p. 011920.
[26] Aritomi, M., et al., Atomic structure of the GCSF-receptor complex showing a new cytokine-receptor recognition scheme. Nature, 1999. 401(6754): p. 713.

© Copyright 2018 ISBME, http://www.ijbme.org