

اثر طول و توالی لینکر بر ساختار و پایداری پروتئین همجوشی mGLP-1-DARPin برای درمان دیابت نوع ۲: یک مطالعه محاسباتی

مریم احساسات وطن^۱، بهرام باغبان کهنه‌روز^{۲*}

۱-دکتری تخصصی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲-دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

یافته / دوره ۲۵ / شماره ۲ / تابستان ۱۴۰۲ / مسلسل ۹۶

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۵/۱۴

مقدمه: پپتید شبه گلوکاگون-۱ (GLP-1) یک پپتید امیدوارکننده برای درمان دیابت نوع-۲ (T2DM) است. با این حال، پتانسیل استفاده درمانی از GLP-1 به دلیل نیمه‌عمر بسیار کوتاه آن محدود شده است. در این تحقیق، یک پروتئین همجوشی متشکل از پپتید شبه گلوکاگون-۱ تغییر یافته مقاوم به پروتئاز (mGLP-1) و دارپین متصل شونده به آلبومین سرم انسانی (HSA-DARPin) که با استفاده از لینکرهای انعطاف‌پذیر و لینکرهای سخت ماریپج به یکدیگر متصل شده‌اند برای افزایش نیمه‌عمر این پپتید دارویی طراحی گردید. مواد و روش‌ها: ساختارهای اولیه و ثانویه پروتئین‌های همجوشی طراحی شده به روش محاسباتی با ابزارهای بیوانفورماتیکی مطالعه و ویژگی‌های اساسی آنها پیش‌بینی شد. مدل سه‌بعدی با استفاده از سرور TrRosetta از پروتئین‌های همجوشی ایجاد و داکینگ مولکولی بین پروتئین همجوشی و گیرنده‌های مورد نظر با استفاده از سرور ClusPro انجام شد. یافته‌ها: بررسی ساختارهای حاصل نشان داد که لینکر EAAAK3 بهترین ساختار و پایداری را به پروتئین همجوشی طراحی شده می‌دهد، و پروتئین همجوشی می‌تواند ساختار اصلی مولکول‌های GLP-1 و دارپین را حفظ کند. نتایج داکینگ پروتئین-لیگاند تأیید کننده اتصال بین پروتئین همجوشی طراحی شده با گیرنده‌های مورد نظر بود. بحث و نتیجه‌گیری: در تولید پروتئین‌های همجوشی جدید، نمایش و تأیید این که هر دمین از ساختار طراحی شده باید به اندازه همولوگ طبیعی آن پایدار و به طور مؤثر کارآمد باشد ضروری به نظر می‌رسد. نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین همجوشی mGLP-1-DARPin (EAAAK)3 می‌تواند در مهندسی پایداری و افزایش نیمه‌عمر داروی پپتیدی GLP-1 در ترکیب با دارپین متصل شونده به آلبومین سرم انسانی بطور مؤثر مورد استفاده قرار گیرد. واژه‌های کلیدی: پپتید شبه گلوکاگون ۱، پروتئین همجوشی، دارپین، دیابت نوع ۲، سرم آلبومین انسانی.

*آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی.

پست الکترونیک: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

مقدمه

طراحی و ساخت پروتئین‌های همجوشی نو ترکیب به عنوان نسل جدید مولکول‌های زیستی، به‌طور گسترده‌ای برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب چند دمینی و تسهیل خالص‌سازی پروتئین‌ها انجام می‌شود. همچنین، اتصال دو یا چند دمین پروتئینی می‌تواند منجر به افزایش فعالیت زیستی پروتئین‌ها و یا ایجاد ترکیبات عملکردی جدید با طیف وسیعی از کاربردهای بیوتکنولوژیکی و بیودارویی شود (۱).

ساخت موفقیت‌آمیز یک پروتئین همجوشی نو ترکیب پایدار و زیست-فعال بستگی به دو عنصر ضروری شامل دمین‌های پروتئینی و لینکرها دارد (۲). انتخاب دمین‌های پروتئینی بر اساس عملکرد مورد نظر محصول پروتئین همجوشی انجام‌شده و در اکثر موارد نسبتاً ساده است ولی انتخاب یک لینکر مناسب برای اتصال دمین‌های پروتئینی به یکدیگر پیچیده بوده و نمی‌تواند در طراحی پروتئین‌های همجوشی نادیده گرفته شود.

طراحی لینکر می‌تواند بر ساختار و پویایی پروتئین‌های همجوشی تأثیر بسزایی داشته باشد. در اغلب موارد، اتصال مستقیم دمین‌های عملکردی بدون لینکر می‌تواند منجر به پیامدهای نامطلوب زیادی از جمله تا خوردگی اشتباه پروتئین همجوشی (۱)، بازده کم تولید پروتئین (۳)، یا اختلال در فعالیت زیستی (۴)، (۵) شود. بنابراین، انتخاب یا طراحی منطقی یک لینکر برای اتصال دمین‌های پروتئین همجوشی، یک حوزه مهم در فناوری پروتئین همجوشی نو ترکیب است.

روند صعودی ابتلا به دیابت در جهان، آن را تبدیل به یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر و بیماری با عوارض بالا کرده است (۶). دیابت یک بیماری متابولیک سیستمیک مزمن است که در نتیجه اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها به دلیل کمبود نسبی انسولین ایجاد می‌شود. اکثر بیماران دیابتی مبتلا به دیابت نوع ۲

هستند که همراه با ترکیبی از اختلالات متابولیک مرتبط، از جمله هایپرگلیسمی مداوم، مقاومت به انسولین محیطی، و کاهش عملکرد سلول‌های β پانکراس مشخص می‌شوند (۷). اگرچه درمان‌های مختلفی مانند رژیم غذایی، ورزش، داروهای ضد دیابت و تزریق زیر جلدی انسولین در دسترس است، اما در حال حاضر هیچ درمان قطعی برای دیابت نوع ۲ وجود ندارد. پپتید شبه گلوکاگون ۱ (GLP-1) یک هورمون طبیعی اینکرتینی کوچک (۳۰ اسیدآمیننه) است که از سلول‌های L روده باریک در پاسخ به هضم مواد غذایی ترشح می‌شود (۸).

این پپتید هورمونی می‌تواند هموستازی گلوکز را از طریق اتصال به گیرنده GLP-1 (GLP-1R) حفظ کند. GLP-1 دارای اثرات پلیوتروپیک و درمانی بر دیابت، مانند تحریک ترشح انسولین وابسته به گلوکز، افزایش حساسیت به انسولین، مهار ترشح گلوکاگون، تحریک تکثیر سلول‌های β پانکراس، و کمک به بازیابی عملکرد طبیعی سلول‌های β است. در عین حال، GLP-1 نقش مهمی در به تأخیر انداختن تخلیه معده، کاهش اشتها و کاهش مصرف غذا دارد که در نهایت منجر به کاهش وزن نیز می‌شود (۹،۱۰). این ویژگی‌ها GLP-1 را تبدیل به یک نامزد درمانی ایده‌آل برای درمان دیابت نوع ۲ کرده است.

یکی از چالش‌های اساسی در تولید و کاربرد دارویی GLP-1، کوتاه بودن نیمه‌عمر فیزیولوژیکی آن در گردش خون (حدود ۱-۲ دقیقه) است که به برش سریع پیوند آمیدی آسیدآمینه آلانین در موقعیت ۸ (Ala8) توسط دی‌پپتیدیل پپتیداز ۴ (DPP-IV) و متعاقب آن، پاکسازی توسط کلیه نسبت داده می‌شود (۱۱)، و این امر کاربرد بالینی مستقیم این پپتید را محدود می‌کند. علاوه بر این، GLP-1 دارای مکان‌های برشی پروتئولیتیک برای پروتئازهای گوارشی از جمله پپسین، تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز نیز است (۱۲).

بالا نسبت به پروتئین‌های هدف هستند می‌توانند به- عنوان داربست‌های پروتئینی استفاده شوند (۲۱). دارپین‌ها بطور طبیعی از میل ترکیبی بالا نسبت به HSA برخوردارند و بر همین اساس می‌توانند برای افزایش نیمه عمر فیزیولوژیکی GLP-1 با ایجاد مقاومت در برابر فعالیت پروتئاز می‌توان از تزریق زیرجلدی مکرر که سهولت استفاده از آن را برای بیمار محدود می‌کند رهایی یافت (۱۴).

همانطور که ذکر شد، یکی از معایب اصلی GLP-1 نیمه عمر پایین آن در شرایط فیزیولوژیکی است که منجر به تلاش‌های بسیاری برای رفع این محدودیت و تولید پپتیدهای طولانی اثر شده است (۱۵،۱۶). از کارآمدترین رویکردهای فعلی در مهندسی پپتیدهای دارویی، جایگزینی اسیدهای آمینه طبیعی با اسیدهای آمینه غیرمعمول برای حفاظت از مکان‌های آسیب‌پذیر پروتئولیتیک و همچنین لیپیداسیون برای افزایش امکان اتصال برگشت‌پذیر به پروتئین سرم جهت افزایش نیمه‌عمر و کاهش پاکسازی کلیوی می‌باشد. علاوه بر جایگزینی اسیدهای آمینه مستعد برش پروتئولیتیک و افزودن زنجیره‌های اسید چرب، نیمه عمر GLP-1 را می‌توان از طریق اتصال به پذیرنده‌های Fc جنینی (FcRn) و یا سرم آلبومین انسانی (HSA) به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد.

مواد و روش‌ها

طراحی پروتئین‌های همجوشی mGLP-1-DARPin

توالی آمینواسیدی دارپین اختصاصی سرم آلبومین انسانی (HSA-DARPin) (۲۳) و پپتید شبه گلوکاگون ۱ (اسیدهای آمینه ۷-۳۶) تغییر یافته (mGLP-1) با جایگزینی باقیمانده گلايسين به جای آلانین در موقعیت ۸ و جایگزینی باقیمانده‌های گلوتامین و آسپارتیک اسید به ترتیب، به جای لیزین در موقعیت‌های ۲۶ و ۳۴ (۲۴) به طور مستقیم و یا با استفاده از لینکرهای انعطاف‌پذیر و سخت مارپیچ به هم متصل شد. با در نظر گرفتن اینکه انتهای آمینی GLP-1 برای فعالیت زیستی آن ضروری است، در طراحی پروتئین‌های همجوشی توالی HSA-DARPin در انتهای کربوکسیلی این پپتید قرار گرفت.

این آنزیم‌ها مواد مغذی پروتئینی را برای جذب در روده کوچک به دی و تری پپتید هضم می‌کنند، و یک چالش جدی برای تحویل خوراکی داروهای مبتنی بر پروتئین محسوب می‌شوند (۱۳). بطور عمومی با افزایش نیمه عمر فیزیولوژیکی GLP-1 با ایجاد مقاومت در برابر فعالیت پروتئاز می‌توان از تزریق زیرجلدی مکرر که سهولت استفاده از آن را برای بیمار محدود می‌کند رهایی یافت (۱۴).

این اتصال منجر به افزایش حجم هیدرودینامیکی شده و در نتیجه پاکسازی کلیوی کندتر می‌شود (۱۷،۱۸). نیمه عمر HSA در گردش خون به طور متوسط ۱۹ روز است و به طور گسترده‌ای برای بهبود ویژگی‌های فارماکوکینتیک پپتیدها و یا پروتئین‌های دارویی استفاده شده است (۱۹،۲۰). دارپین‌ها (DARPin) که پروتئین‌های طراحی شده مشتق از پروتئین‌های تکرار آنکرینی طبیعی با پایداری دمایی و ترمودینامیکی بالا و همچنین اختصاصیت و میل ترکیبی

ژئومتری مدل‌های پیش‌بینی‌شده برای پروتئین‌های همجوشی طراحی شده به‌عنوان یک پروتئین طبیعی با استفاده از سرور ProSA انجام شد.

PROCHECK کیفیت استرئوشیمیایی ساختار پروتئین را بررسی کرده و نتایج را در قالب نمودارهای پست اسکریپت برای آنالیز ژئومتری کلی ساختار و جزئی هر اسیدآمینه ارائه می‌کند (۲۸). ProSA ابزاری است که به‌طور گسترده برای بررسی خطاهای احتمالی مدل‌های بعدی ساختارهای پروتئینی استفاده می‌شود. دامنه کاربرد آن شامل تشخیص خطا در ساختارهای آزمایشی تعیین شده، مدل‌های نظری و پروتئین‌های مهندسی شده است. نمره کلی کیفیت محاسبه‌شده توسط ProSA برای یک ساختار ورودی خاص در نموداری نشان داده می‌شود که نمرات تمام زنجیرهای پروتئینی که به روش آزمایشی تایید شده و در داده‌پایگاه‌های پروتئین موجود هستند در آن نمودار به نمایش درآمده است (۲۹).

مقایسه ساختاری

برای بررسی‌های تطبیقی، ساختارهای سه‌بعدی GLP-1 و دارپین اختصاصی سرم آلبومین انسانی روی ساختارهای پیش‌بینی‌شده پروتئین‌های همجوشی طراحی شده قرار گرفت تا نسبت شباهت ساختارهای مدل‌سازی شده با ساختارهای تجربی مورد ارزیابی قرار گیرد. به این منظور ساختار سه‌بعدی GLP-1 با شماره دسترسی 1D0R در بانک اطلاعات پروتئینی و دارپین اختصاصی HSA با شماره دسترسی 4GRG در بانک اطلاعات پروتئینی از سرور PDB RCBS دانلود و هم‌دیفی ساختارهای سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده پروتئین‌های همجوشی طراحی شده با ساختارهای مذکور توسط نرم‌افزار PyMOL انجام شد.

آنالیز ساختاری پروتئین‌های همجوشی -1-mGLP

DARPin

ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی پروتئین‌های همجوشی طراحی شده شامل وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک نظری، شاخص پایداری، شاخص آلیفاتیک و GRAVY پروتئین با استفاده از ابزار ProtParam از سرور ExPasy بررسی گردید. ProtParam ابزاری است که امکان محاسبه پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مختلف برای یک پروتئین معین ذخیره‌شده در داده‌پایگاه‌های پروتئینی و یا توالی پروتئین واردشده توسط کاربر را فراهم می‌کند (۲۵).

ساختار دوم پروتئین‌های همجوشی طراحی شده شامل ترکیب ماریچ‌های آلفا، صفحات بتا، کویل‌ها و پیچ‌های بتا با استفاده از ابزار SOMPA از سرور NPS@ تعیین شد. SOMPA ابزاری برای پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین بر اساس ساختار اولیه آن است. SOMPA از روش همولوگ برای پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین استفاده می‌کند. بر این اساس، توالی‌های کوتاه آمینواسیدی تمایل به تشکیل ساختار ثانویه مشابه دارند (۲۶).

پیش‌بینی و اعتبارسنجی مدل سه بعدی پروتئین‌های

همجوشی

پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین با استفاده از سرور آنلاین trRosetta انجام گرفت. trRosetta الگوریتمی برای پیش‌بینی سریع و دقیق ساختار پروتئین است. در این ابزار می‌توان از الگوهای همولوگ برای افزایش دقت پیش‌بینی ساختار پروتئین بهره گرفت (۲۷). ساختار سه بعدی پروتئین‌های همجوشی طراحی شده با استفاده از PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System; Version 2.3.2_81) تصویرسازی شد. پس از انتخاب بهترین مدل با بالاترین TM-score، آنالیز و اعتبارسنجی آن با استفاده از ترسیم پلات رام‌چاندران توسط PROCHECK از سرور SAVES نسخه ۶ و تأیید ساختار

داکینگ پروتئین همجوشی با سرم آلبومین انسانی

و گیرنده GLP-1

بهترین ساختار از پروتئین‌های همجوشی طراحی شده به‌عنوان مولکول هدف‌گیر و ساختارهای سرم آلبومین انسانی و گیرنده GLP-1 به عنوان مولکول هدف برای انجام آنالیزهای داکینگ استفاده شدند. ابتدا، به‌منظور به حداقل رساندن انرژی ساختار سه بعدی پروتئین همجوشی طراحی شده از نرم‌افزار UCSF Chimera نسخه ۱،۱۶ (۳۰) استفاده و فرآیند داکینگ بین این پروتئین‌ها با استفاده از سرور ClusPro 2.0 (۳۶) انجام گرفت. این سرور قادر به پیش‌بینی میان‌کنش‌های پروتئین-پروتئین بوده و مدل‌ها را بر اساس برهمکنش‌های الکترواستاتیک و انرژی حلال‌زدایی محاسبه می‌کند.

به این منظور ابتدا داکینگ بین بهترین ساختار از پروتئین‌های همجوشی طراحی شده با سرم آلبومین انسانی با شماره دسترسی 1A06 در بانک اطلاعات پروتئینی (PDB) انجام و پس از انتخاب بهترین مدل با کمترین میزان انرژی آزاد اتصال، داکینگ کمپلکس پروتئین همجوشی-سرم آلبومین انسانی با دمین خارج سلولی گیرنده GLP-1 با شماره دسترسی 3IOL انجام شد. از سرور PRODIGY برای محاسبه انرژی آزاد اتصال (ΔG) در آنالیزهای داکینگ مولکولی استفاده شد.

PRODIGY یک سرور مبتنی بر وب برای پیش‌بینی سریع و دقیق انرژی اتصال و میل ترکیبی در کمپلکس‌های زیستی با استفاده از پارامترهایی چون مساحت سطح قابل دسترس حلال (SASA) و شعاع اتمی است (۳۱). بهترین ساختار با منفی‌ترین انرژی اتصال و در نتیجه بیشترین تمایل برای اتصال توسط نرم‌افزار PyMOL تصویرسازی و اسیدهای آمینه درگیر در برهمکنش بین پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار LigPlot نسخه ۲،۲،۵ مورد بررسی قرار گرفت و نمودار دو بعدی برهم‌کنش‌ها ترسیم گردید. LigPlot ابزاری برای نمایش

شما تیک دوبعدی برهمکنش کمپلکس‌های پروتئینی با استفاده از یک فایل استاندارد PDB به‌عنوان ورودی است. خروجی نرم‌افزار یک فایل پست اسکریپت با نمایشی ساده از برهمکنش‌های بین مولکولی و قدرت اتصال آنها است (۳۲).

یافته‌ها

آنالیز ساختاری پروتئین‌های همجوشی mGLP-1-DARPin

ساختار کریستالوگرافی GLP-1 (PDB ID: 1D0R) و دارپین اختصاصی HSA (PDB ID: 4GRG) به ترتیب در شکل ۱A و ۱B نشان داده شده است. پپتید GLP-1 از ۳۰ اسید آمینه تشکیل شده است و آنالیز NMR در میسل‌های دودسیل فسفوکولین برای GLP-1 نشان داده است که، اسیدهای آمینه ۷ تا ۱۳ در انتهای آمینی بدون ساختار دوم هستند و بقیه پپتید از دو مارپیچ در موقعیت‌های ۱۳ تا ۲۰ و ۲۴ تا ۳۵ تشکیل شده است که توسط یک لینکر حاوی اسیدآمینه گلیسین در موقعیت ۲۲ از هم جدا شده‌اند (۳۳).

دارپین اختصاصی HSA نیز از چهار تکرار شامل تکرار سرپوش‌دار انتهای آمینی، دو تکرار داخلی و تکرار سرپوش‌دار انتهای کربوکسیلی تشکیل شده است. هر تکرار داخلی از ۳۳ باقی‌مانده اسیدآمینه ساخته شده است که ۲۷ باقی‌مانده چارچوب آن و ۶ باقی‌مانده جایگاه اتصال پروتئین را تشکیل می‌دهند. هر تکرار، یک واحد ساختاری شامل یک پیچ β و سپس دو مارپیچ غیرموازی α و یک حلقه بدون ساختار که به پیچ β بعدی متصل می‌شود را تشکیل می‌دهد، و تکرارهای سرپوش‌دار انتهای آمینی و انتهای کربوکسیلی برای تاخوردگی صحیح و عدم تجمع در هنگام بیان پروتئین ضروری هستند (۳۴).

توالی آمینو اسیدی HSA-DARPin به‌طور مستقیم و یا توسط لینکرهای انعطاف‌پذیر و سخت مارپیچ به mGLP-1 متصل شد تا دمین‌های عملکردی این پروتئین

سخت مارپیچ 3(EAAAK) و 7LAA(KEAAA) به منظور اتصال HSA-DARPin به GLP-1 استفاده شد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مختلف ساختار اولیه پروتئین‌های همجوشی طراحی شده تعیین شدند (جدول ۱).

در عین حفظ پایداری و عملکرد زیستی خود، از یکدیگر دور نگه داشته شوند (۳۵-۳۸). در این تحقیق از سه لینکر غنی از گلاسیسین 8(G)، (GGGG) و 3(GGGGS) و دو لینکر غنی از پرولین و ترونین 3(PT)3T(PT)3T(PT) و 7(PT)4T(PT) به عنوان لینکرهای انعطاف‌پذیر و دو لینکر

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌های همجوشی طراحی شده تعیین شده در سرور ProtParam

گراوی	اختلاف II و AI	شاخص آلیفاتیک (AI)	شاخص ناپایداری (II)	نقطه ایزوالکتریک	وزن مولکولی (Da)	پروتئین همجوشی
-۰/۱۶۷	۹۳/۴	۱۰۰/۹۲	۷/۵۲	۴/۹۴	۱۶۲۷۳/۲۴	GLP-1-DARPin
-۰/۱۷۷	۸۸/۳۱	۹۷/۷۲	۹/۴۱	۴/۹۴	۱۶۵۸۸/۵۳	GLP-1-(GGGG)-DARPin
-۰/۱۷۸	۸۳/۴۲	۹۵/۹۰	۱۲/۴۸	۴/۹۴	۱۶۷۲۹/۶۶	GLP-1-(G) ₈ -DARPin
-۰/۱۹۵	۷۸/۰۵	۹۱/۹۰	۱۳/۸۵	۴/۹۴	۱۷۲۱۹/۱۰	GLP-1-(GGGG) ₃ -DARPin
-۰/۲۷۵	۸۰/۳۳	۸۹/۲۵	۸/۹۲	۴/۹۴	۱۸۲۵۹/۴۵	GLP-1-(PT) ₃ T(PT) ₃ T(PT) ₃ -DARPin
-۰/۲۹۳	۷۸/۷۹	۸۷/۷۳	۸/۹۴	۴/۹۴	۱۸۵۵۴/۷۹	GLP-1-(PT) ₄ T(PT) ₇ -DARPin
-۰/۱۸۸	۸۹/۵۲	۹۷/۲۶	۷/۷۴	۵/۰۱	۱۷۶۸۴/۸۲	GLP-1-(EAAAK) ₃ -DARPin
-۰/۱۸۸	۸۶/۴	۹۴/۴۳	۸/۰۳	۵/۱۸	۱۹۹۵۰/۴۲	GLP-1-(KEAAA) ₇ LAA-DARPin

رتبه‌های بعدی قرار داشتند. کمترین مقدار شاخص ناپایداری (۷/۷۴) مربوط به پروتئین همجوشی mGLP-1-(EAAAK)₃-DARPin بود. با این حال، با توجه به اینکه شاخص ناپایداری محاسبه شده برای پروتئین همجوشی‌های طراحی شده کمتر از ۴۰ بود، همچنین به دلیل دارا بودن شاخص آلیفاتیک بالا تمام پروتئین‌های همجوشی طراحی شده در گروه پروتئین‌های پایدار طبقه‌بندی شدند (۴۰).

علاوه بر این، هرچه اختلاف بین شاخص ناپایداری و شاخص آلیفاتیک بیشتر باشد پروتئین مورد نظر پایدارتر است. بر این اساس، پروتئین‌های همجوشی حاوی لینکرهای سخت مارپیچ در گروه پایدارترین‌ها و بعد از آن پروتئین‌های همجوشی حاوی لینکرهای غنی از GS و PT به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در این رابطه نیز پروتئین همجوشی mGLP-1-(EAAAK)₃-DARPin دارای بیشترین اختلاف بین شاخص ناپایداری و شاخص

نقطه ایزوالکتریک (pI)، که برای انتخاب و بهینه‌سازی روش‌های خالص‌سازی پروتئین از جمله کروماتوگرافی تبادل یونی مفید است. برای تمام پروتئین‌های همجوشی طراحی شده حاوی لینکرهای انعطاف‌پذیر غنی از (GS) و یا (PT) ۴/۹۴، و برای پروتئین‌های همجوشی حاوی لینکر سخت مارپیچ بیش از ۵ محاسبه شد که نشان دهنده غالب بودن تعداد اسیدهای آمینه با بارهای منفی در تمام پروتئین‌های همجوشی طراحی شده است، با این حال تعداد اسیدهای آمینه با بار منفی در پروتئین‌های همجوشی حاوی لینکر سخت مارپیچ بیشتر است.

پایداری پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی با شاخص ناپایداری تخمین زده می‌شود. شاخص ناپایداری کمتر از ۴۰ به معنی پایداری ساختارهای پیش‌بینی شده است (۳۹). شاخص ناپایداری در پروتئین‌های همجوشی حاوی لینکرهای سخت مارپیچ کمترین مقدار و پس از آن پروتئین‌های همجوشی غنی از GS و PT به ترتیب در

الیفاتیک بود. همچنین GRAVY محاسبه شده برای تمام پروتئین‌های همجوشی طراحی شده الگوی آب‌دوستی با تعامل بهتر با آب را نشان می‌دهد. ساختار دوم پروتئین‌های همجوشی طراحی شده با استفاده از سرور آنلاین SOMPA پیش‌بینی شد و نتایج حاصل در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. پیش‌بینی و آنالیز ساختار دوم پروتئین همجوشی طراحی شده توسط GRO4 از سرور NPS

پیش‌بینی	کویل‌ها	صفحات بتا	مارپیچ آلفا	تعداد اسید آمینه	پروتئین همجوشی
٪ ۱۵/۶۹	٪ ۳۰/۰۷	٪ ۰	٪ ۴۶/۴۱	۱۵۳	GLP-1-DARPin
٪ ۱۵/۱۹	٪ ۳۱/۶۵	٪ ۰	٪ ۴۴/۳۰	۱۵۸	GLP-1-(GGGGS)-DARPin
٪ ۱۳/۰۴	٪ ۳۴/۱۶	٪ ۰	٪ ۴۴/۱۰	۱۶۱	GLP-1-(G) ₈ -DARPin
٪ ۱۳/۶۹	٪ ۳۴/۵۲	٪ ۰	٪ ۴۵/۲۴	۱۶۸	GLP-1-(GGGGS) ₃ -DARPin
٪ ۱۵/۶۱	٪ ۳۴/۶۸	٪ ۰	٪ ۴۱/۰۴	۱۷۳	GLP-1-(PT) ₃ T(PT) ₃ T(PT) ₃ -DARPin
٪ ۱۱/۳۶	٪ ۳۹/۷۷	٪ ۰	٪ ۴۴/۸۹	۱۷۶	GLP-1-(PT) ₄ T(PT) ₇ -DARPin
٪ ۱۲/۵۰	٪ ۲۷/۳۸	٪ ۰	٪ ۵۵/۳۶	۱۶۸	GLP-1-(EAAAK) ₃ -DARPin
٪ ۱۱/۵۲	٪ ۲۳/۵۶	٪ ۰	٪ ۵۹/۱۶	۱۹۱	GLP-1-(KEAAA) ₇ LAA-DARPin

در شکل مشخص است جدایی فضایی دمین‌های پروتئینی در پروتئین‌های همجوشی دارای لینکر سخت مارپیچ و یا لینکرهای انعطاف‌پذیر غنی از پرولین-ترئونین بیشتر از پروتئین‌های همجوشی دارای لینکر انعطاف‌پذیر غنی از GS است.

جدول ۳. TM-score پروتئین‌های همجوشی طراحی شده مدل‌سازی شده توسط TrRosetta

TM-score	پروتئین همجوشی
۰/۹۶۱	GLP-1-DARPin
۰/۸۹۴	GLP-1-(GGGGS)-DARPin
۰/۸۸۵	GLP-1-(G) ₈ -DARPin
۰/۸۹۵	GLP-1-(GGGGS) ₃ -DARPin
۰/۹۰۰	GLP-1-(PT) ₃ T(PT) ₃ T(PT) ₃ -DARPin
۰/۹۰۶	GLP-1-(PT) ₄ T(PT) ₇ -DARPin
۰/۹۸۶	GLP-1-(EAAAK) ₃ -DARPin
۰/۹۴۱	GLP-1-(KEAAA) ₇ LAA-DARPin

تأیید و اعتبارسنجی ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌های همجوشی mGLP-1-DARPin

برای اعتبارسنجی مدل‌های پیش‌بینی شده سه‌بعدی، پلات رامچاندران ترسیم و Z-score توسط ProSA تعیین شد. پلات رامچاندران، روشی بسیار پرکاربرد برای مطالعه

پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های همجوشی mGLP-1-DARPin

ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های همجوشی طراحی شده توسط trRosetta، که الگوریتمی برای پیش‌بینی سریع و دقیق ساختار پروتئین است، پیش‌بینی گردید (۴۱). سرور trRosetta پنج مدل نهایی را بر اساس انرژی گزارش می‌کند. دقت هر مدل به صورت کمی توسط TM-score تخمینی (eTM-score) ارزیابی می‌شود. TM-score بین صفر تا یک تخمین زده می‌شود و TM-score بالاتر از ۰/۵ اغلب مدلی با توپولوژی صحیح پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد.

در میان مدل‌های پیش‌بینی شده مدلی که بالاترین TM-score را داشته باشد به‌عنوان بهترین مدل انتخاب می‌شود. بهترین مدل‌های پیش‌بینی شده از هر پروتئین همجوشی طراحی شده در شکل ۱ (C-J) و مقادیر eTM-score هر یک از آنها در جدول ۳ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود در مدل‌های پیش‌بینی شده، پروتئین‌های همجوشی طراحی شده شامل دو دمین مجزا متصل شده توسط یک لینکر کوتاه بوده و GLP-1 و HSA-DARPin از نظر فضایی از هم جدا هستند. همان‌طور که

از لحاظ نوع و مکان قرارگیری زوایای موجود در آن قابل قبول هستند (شکل ۲). همچنین، Z-score تخمین زده شده توسط ProSA برای مدل‌های پیش‌بینی شده بین ۵/۲۸- تا ۶/۲۳- بود (شکل ۳). بنابراین، این نتایج تأیید کننده ساختار مدل‌های پیش‌بینی شده برای پروتئین‌های همجوشی طراحی شده حاوی توالی‌های لینکر متفاوت است.

زوایای چرخشی پروتئین و ارزیابی کیفیت استرئوشیمیایی ساختار مدل‌سازی شده است. بر اساس پلات‌های رامانچاندران همه مدل‌های پیش‌بینی شده از پروتئین‌های همجوشی طراحی شده، اغلب اسیدهای آمینه در نواحی مطلوب و تعداد کمی نیز در نواحی مجاز واقع شده‌اند و در هیچ‌کدام از پلات‌ها، اسیدآمینه‌ای در نواحی غیرمجاز وجود ندارد (جدول ۴). بنابراین، مدل‌های پیش‌بینی شده

جدول ۴. آنالیز پلات رامانچاندران پروتئین‌های همجوشی طراحی شده

نواحی غیر مجاز	نواحی مجاز	نواحی مطلوب	پروتئین همجوشی
٪ ۰	٪ ۶/۷	٪ ۹۳/۳	GLP-1-DARPin
٪ ۰	٪ ۷/۴	٪ ۹۲/۶	GLP-1-(GGGS)-DARPin
٪ ۰	٪ ۸/۲	٪ ۹۱/۸	GLP-1-(G) ₈ -DARPin
٪ ۰	٪ ۷/۳	٪ ۹۲/۷	GLP-1-(GGGS) ₃ -DARPin
٪ ۰	٪ ۵/۵	٪ ۹۴/۵	GLP-1-(PT) ₃ T(PT) ₃ T(PT) ₃ -DARPin
٪ ۰	٪ ۶/۲	٪ ۹۳/۸	GLP-1-(PT) ₄ T(PT) ₇ -DARPin
٪ ۰	٪ ۶	٪ ۹۴	GLP-1-(EAAAK) ₃ -DARPin
٪ ۰	٪ ۴/۶	٪ ۹۵/۴	GLP-1-(KEAAA) ₇ LAA-DARPin

هم‌دیفی ساختاری

بررسی برهمکنش پروتئین-پروتئین استفاده شد. محاسبات داکینگ مولکولی توسط سرور آنلاین ClusPro صورت گرفت. از آنجایی که پروتئین همجوشی طراحی شده به دو هدف اختصاصی متصل می‌شود، ابتدا محاسبات داکینگ با استفاده از پروتئین همجوشی طراحی شده به-عنوان لیگاند و پروتئین سرم آلبومین انسانی به‌عنوان گیرنده انجام شد. هر چه انرژی تمایل (kcal/mol) لیگاند به پروتئین هدف کمتر باشد تمایل لیگاند به جایگاه اتصال بیشتر است و بالعکس. بر این اساس، بهترین مدل با بالاترین تمایل اتصال ($\Delta G = -10/8$ kcal/mol) انتخاب و برای مرحله دوم داکینگ با دمین خارج سلولی گیرنده پروتئین همجوشی (ECD-GLP-1R) انجام شد. تمایل اتصال پروتئین همجوشی طراحی شده با دمین خارج سلولی گیرنده پروتئین همجوشی نیز $-7/7$ kcal/mol برآورد شد. مدل نهایی حاصل از داکینگ با هر دو گیرنده توسط نرم‌افزار PyMOL تصویرسازی شد. نتایج داکینگ مولکولی نشان می‌دهد که پروتئین همجوشی mGLP-1-(EAAAK)₃

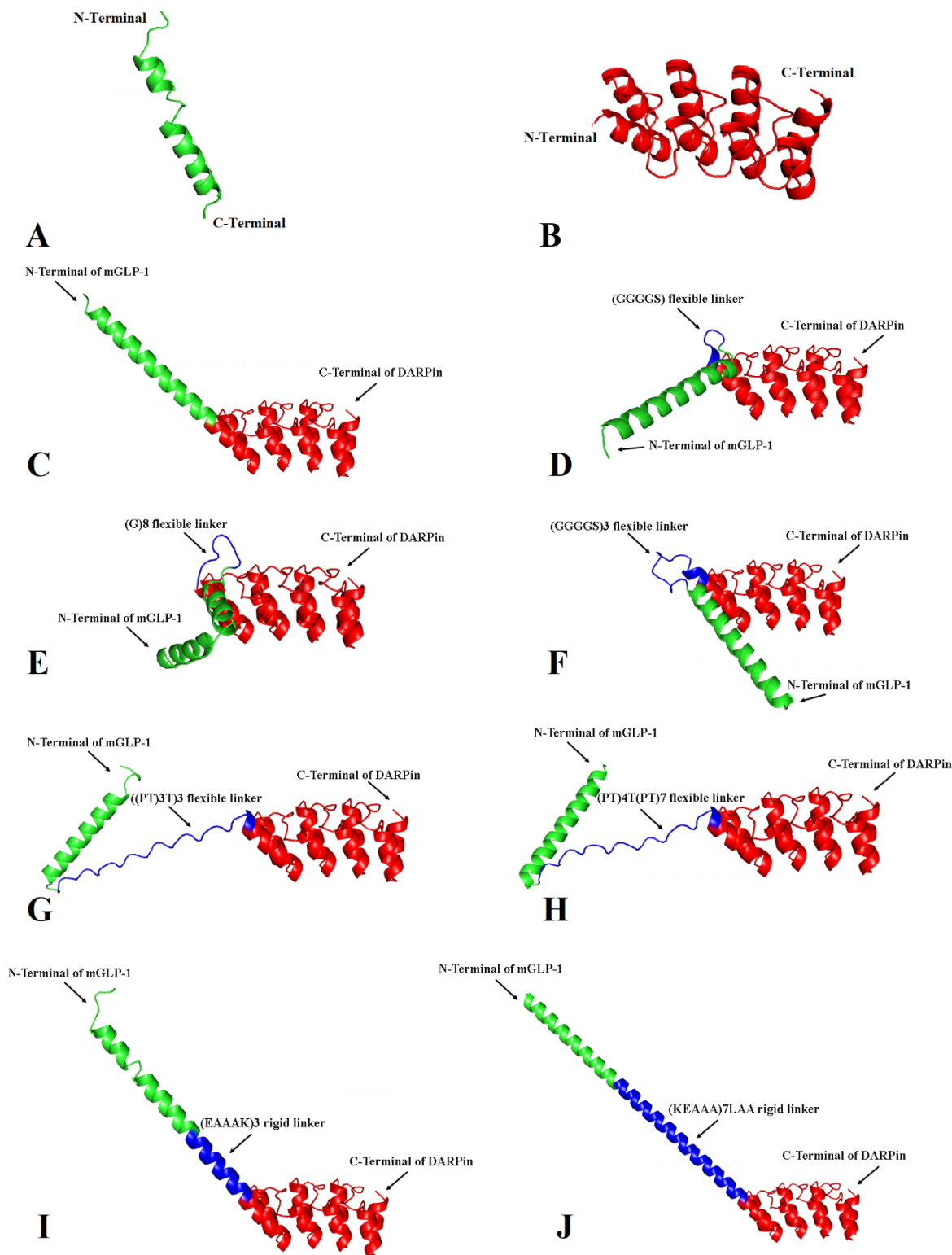
هم‌دیفی ساختاری مدل‌های پیش‌بینی شده از پروتئین‌های همجوشی طراحی شده با ساختار کریستالوگرافی GLP-1 و HSA-DARPin برای مقایسه ساختار هر یک از دمین‌های تشکیل دهنده پروتئین همجوشی با پروتئین‌های مذکور انجام شد (شکل ۴). تاخوردگی HSA-DARPin در تمام مدل‌های پیش‌بینی شده به طور صحیح انجام شده است. با این حال، در پروتئین همجوشی mGLP-1-(G)₈-DARPin تاخوردگی GLP-1 به طور معنی‌داری متفاوت است. همان‌طور که مشاهده می‌شود پروتئین همجوشی mGLP-1-(EAAAK)₃-DARPin بالاترین TM-score را داشته و در عین حال تنها مدلی است که ساختار صحیح GLP-1 شامل دو مارپیچ α در آن مشهود است (شکل ۱I و ۴G).

برهم‌کنش پروتئین-پروتئین

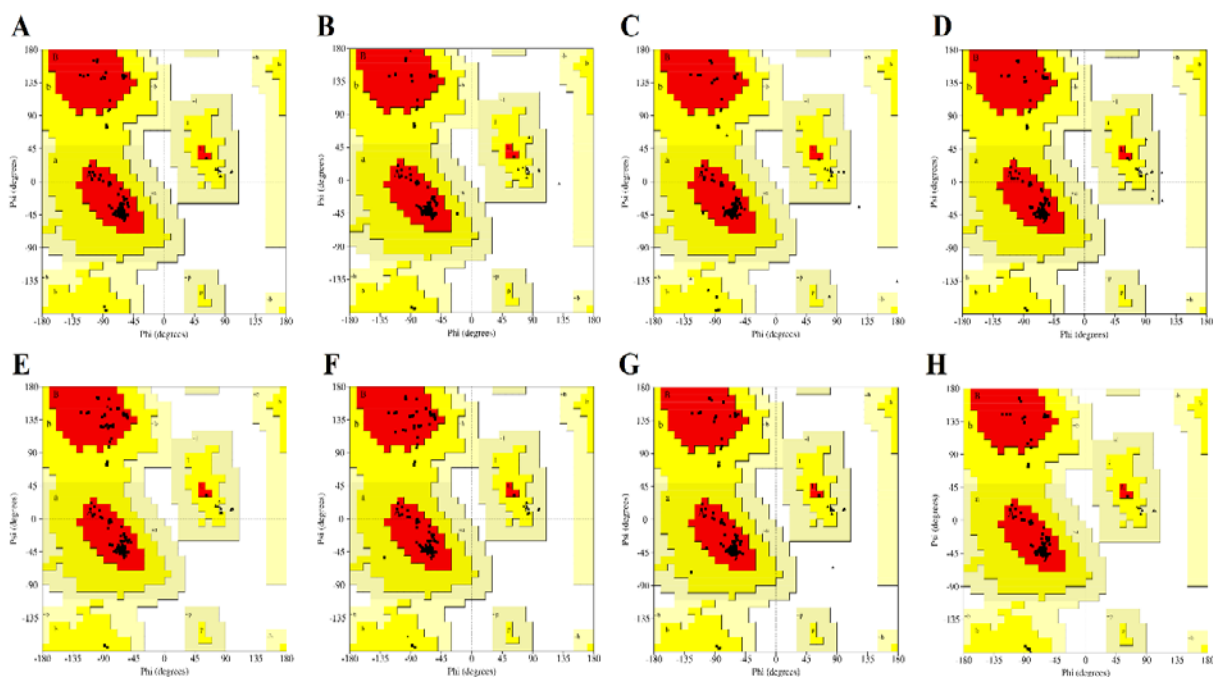
از پروتئین همجوشی mGLP-1-(EAAAK)₃-DARPin به عنوان بهترین ساختار طراحی شده برای

اتصال به ECD-GLP-1R نسبت داد. نمودار دو بعدی برهم‌کنش بین پروتئین همجوشی و سرم آلبومین انسانی و گیرنده GLP-1 نیز در شکل ۶ نشان داده شده است.

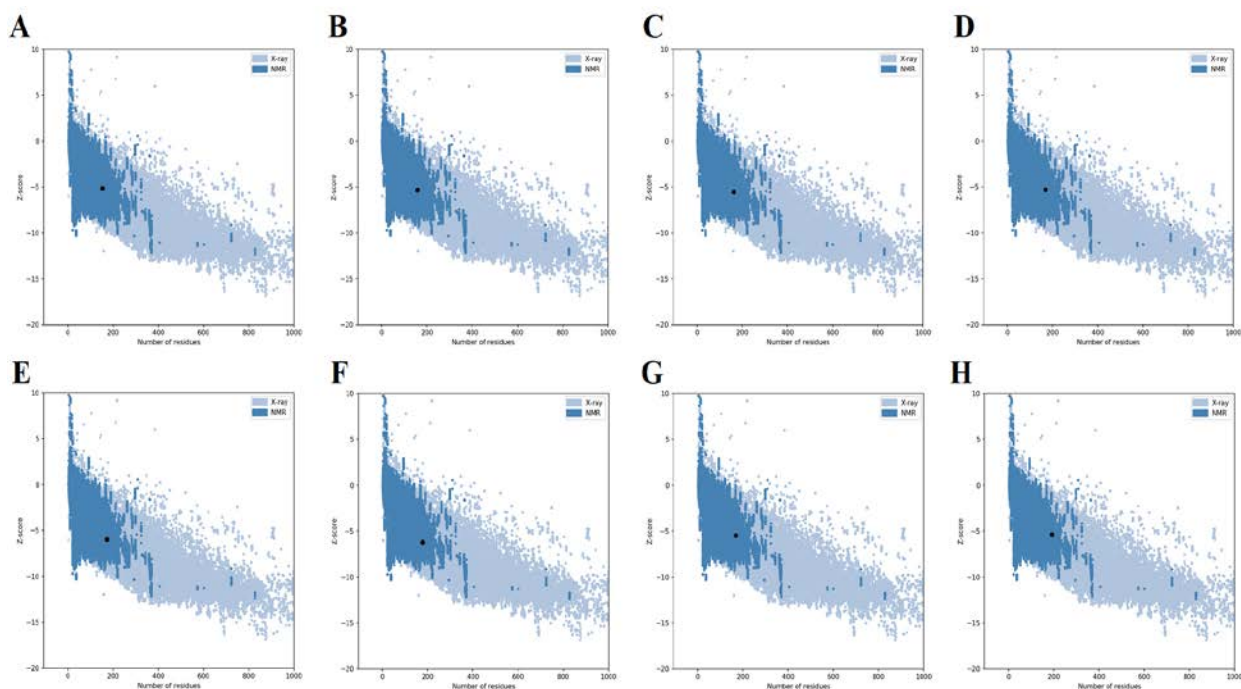
DARPin با سرم آلبومین انسانی و گیرنده GLP-1 تعاملات محکمی برقرار می‌کند (شکل ۵). میل ترکیبی بالاتر پروتئین همجوشی طراحی شده نسبت به HSA را می‌توان به تعداد پیوندهای هیدروژنی بالاتر در مقایسه با



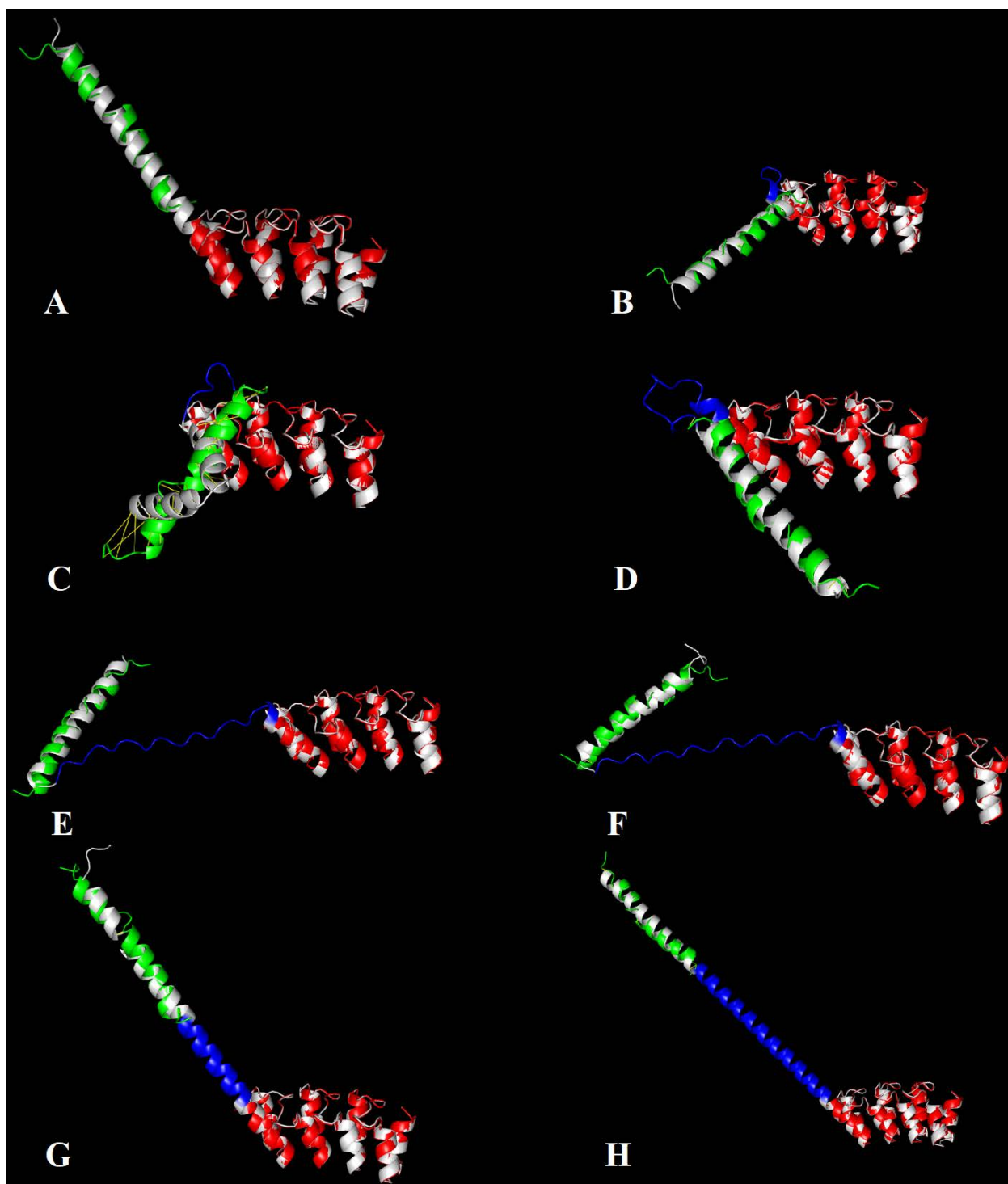
شکل (A-1) ساختار کریستالوگرافی mGLP-1، (B) دارپین اختصاصی سرم آلبومین انسانی و (C-J) ساختار سه بعدی پیش بینی شده پروتئین های همجوشی طراحی شده با استفاده از سرور TrRosetta.



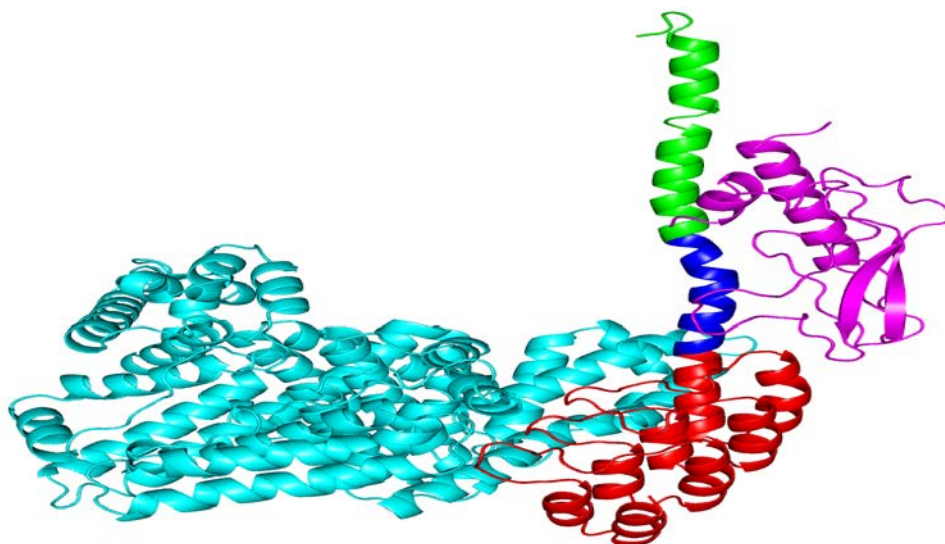
شکل ۲. پلات رامچاندران برای پروتئین‌های همجوشی طراحی شده (A) mGLP-1-DARPin (B) mGLP-1(GGGGS)-DARPin (C) mGLP-1(G)8-DARPin (D) mGLP-1(GGGGS)3-DARPin (E) mGLP-1-(PT)3T(PT)3T(PT)3-DARPin (F) mGLP-1-(PT)4T(PT)7-DARPin (G) mGLP-1-(EAAAK)3-DARPin (H) mGLP-1-(KEAAA)7LAA-DARPin. نواحی مختلف در پلات به صورت زیر مشخص شده‌اند: [A, B, L]: باقی‌مانده‌ها در نواحی مطلوب، [p, l, b, a]: باقی‌مانده‌ها در نواحی مجاز، [~p, ~l, ~b, ~a]: باقی‌مانده‌ها در نواحی کمتر مجاز. نواحی سفیدرنگ شامل نواحی غیر مجاز هستند. باقی‌مانده گلايسين به شکل مثلث نشان داده شده است.



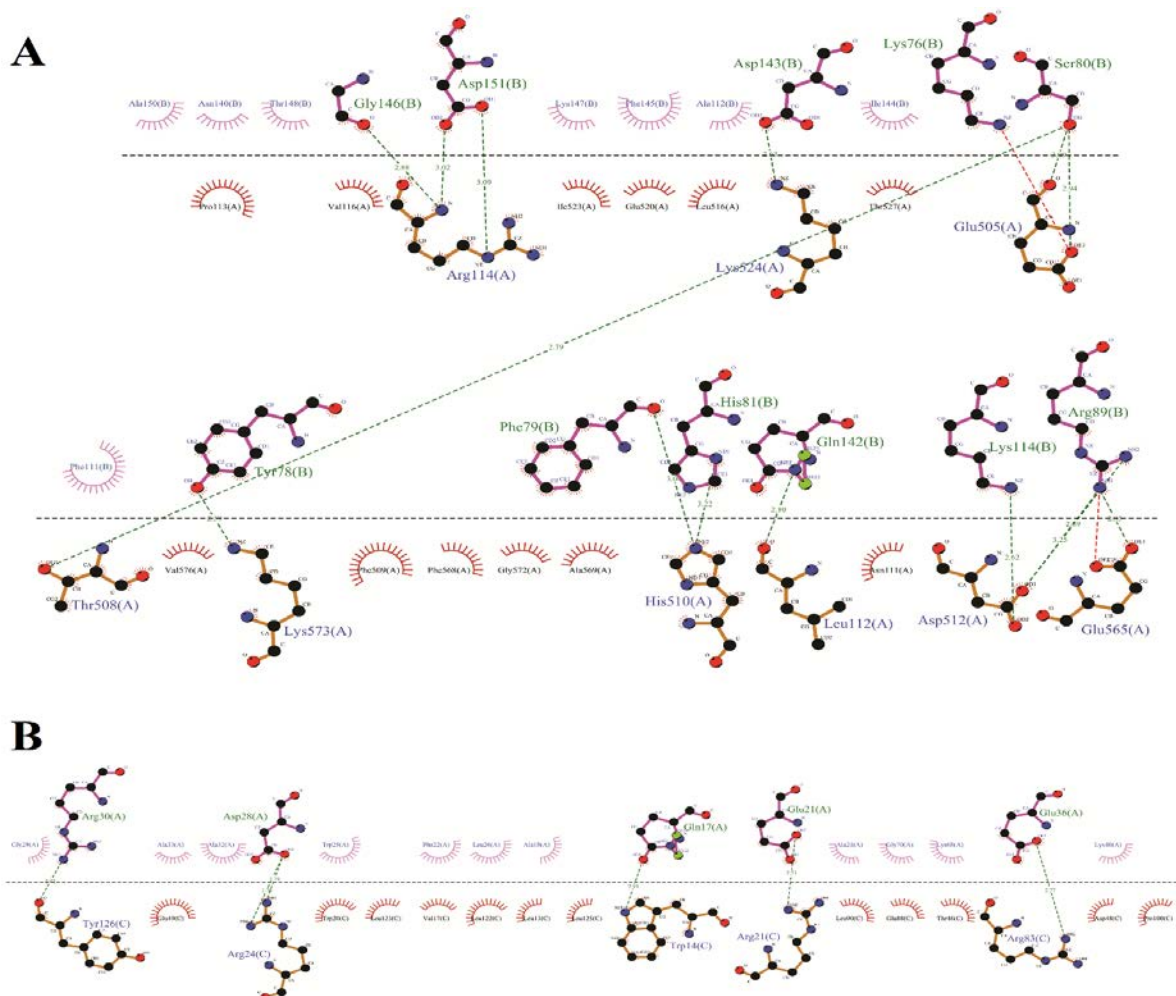
شکل ۳. نتایج ProSA برای پروتئین‌های همجوشی طراحی شده (A) mGLP-1-DARPin (B) mGLP-1(GGGGS)-DARPin (C) mGLP-1(G)8-DARPin (D) mGLP-1(GGGGS)3-DARPin (E) mGLP-1-(PT)3T(PT)3T(PT)3-DARPin (F) mGLP-1-(PT)4T(PT)7-DARPin (G) mGLP-1-(EAAAK)3-DARPin (H) mGLP-1-(KEAAA)7LAA-DARPin.



شکل ۴. هم‌دیفی ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده پروتئین‌های همجوشی طراحی شده (A) mGLP-1-DARPin (B) mGLP-1(GGGGS)-DARPin (C) mGLP-1-(G)8-DARPin (D) mGLP-1-(GGGGS)3-DARPin (E) mGLP-1-(PT)3T(PT)3T(PT)3-DARPin (F) mGLP-1-(PT)4T(PT)7- (G) mGLP-1-(EAAA)3-DARPin (H) mGLP-1-(KEAAA)7LAA-DARPin با ساختار سه‌بعدی دارپین اختصاصی HSA (قرمز، با شماره دسترسی 4GRG در بانک اطلاعات پروتئینی) و GLP-1 (سبز، با شماره دسترسی 1D0R در بانک اطلاعات پروتئینی). ساختار لینکر با رنگ آبی نشان داده شده است.



شکل ۵. داکینگ مولکولی پروتئین همجوشی طراحی شده (GLP-1) مدل سازی شده به رنگ سبز و دارپین به رنگ قرمز) با سرم آلبومین انسانی (آبی فیروزه‌ای) و گیرنده GLP-1 (بنفش).



شکل ۶. اسیدهای آمینه درگیر در برهم‌کنش بین پروتئین همجوشی و (A) سرم آلبومین انسانی و (B) گیرنده GLP-1 به صورت نمودار دوبعدی نشان داده شده است. در شکل A اسیدهای آمینه ردیف بالا مربوط به پروتئین همجوشی و اسیدهای آمینه ردیف پایین مربوط به سرم آلبومین انسانی است. در شکل B اسیدهای آمینه ردیف بالا مربوط به کمپلکس پروتئین همجوشی-سرم آلبومین انسانی و اسیدهای آمینه ردیف پایین مربوط به گیرنده GLP-1 است.

بحث و نتیجه‌گیری

از آنجایی که همواره اسیدآمینه آلانین در موقعیت ۸ از GLP-1 مورد حمله پروتئاز DPP-IV واقع می‌گردد، مطالعات زیادی روی تغییرات شیمیایی این اسیدآمینه انجام شده است. افزون بر روش شیمیایی یکی از رویکردهای مؤثر بیولوژیکی برای تولید این دارو، جایگزینی آلانین ۸ با گلیسین است که تنها منجر به کاهش جزئی در میل ترکیبی ولی با فعالیت آگونیستی مشابه و قابل مقایسه با GLP-1 شده و با ایجاد مقاومت در برابر فعالیت پروتئازی DPP-IV منجر به نیمه‌عمر طولانی‌تر این پپتید می‌شود (۴۲).

بنا به گزارش دیکن و همکاران (۴۳) که جایگزینی آلانین در موقعیت ۸ این پپتید را با ترئونین، گلیسین، سرین، و اسید ۲-آمینو ایزوبوتیریک (Aib) بررسی کردند، فقط [Aib8]-GLP-1 و [Gly8]-GLP-1 میل ترکیبی قابل مقایسه با GLP-1 را نشان دادند، در حالی که سه آنالوگ دیگر در معرض تخریب پروتئولیتیک قرار می‌گیرند. علاوه بر این، GLP-1 دارای مکان‌های برشی پروتئولیتیک برای پروتئازهای گوارشی از جمله پپسین، تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز است (۱۲).

این آنزیم‌ها مواد مغذی پروتئینی را برای جذب در روده کوچک به دی و تری پپتید هضم می‌کنند، و یک چالش جدی برای تحویل خوراکی داروهای مبتنی بر پروتئین ایجاد می‌کنند (۴۴). به تازگی، سماگلوتید به عنوان یک نسخه خوراکی از این آگونیست پپتیدی -GLP-1R برای درمان دیابت نوع ۲ توسط FDA تأیید شده است. این ترکیب با یک تقویت کننده جذب، سدیم -N (۸-۲-هیدروکسی بنزوئیل [آمینو] کاپریلات (SNAC) فرموله شده است که از این پپتید در برابر اثر پروتئولیتیک pH پایین معده محافظت می‌کند (۴۵). همچنین برای محافظت در برابر DPP-IV، آلانین ۸ این پپتید با α -متیل-L-آلانین جایگزین شده و یک مونولیپید به

باقیمانده‌های لیزین در موقعیت‌های ۲۶ و ۳۴ آن اضافه شده است.

علی‌رغم این تغییرات، سماگلوتید هنوز در معرض تخریب سریع پروتئولیتیک در دستگاه گوارش است (۴۶) و مطالعاتی برای تولید آنالوگ‌های مقاوم به پروتئاز از این پپتید با جایگزینی اسیدهای آمینه مستعد برش‌های پروتئولیتیک در حال انجام است (۲۴). بر همین اساس و در این تحقیق، برای مطالعه اثر لینکرهای متنوع برای طراحی تولید بیولوژیک این پروتئین همجوشی از نسخه مقاوم به پروتئازهای DPP-IV و تریپسین GLP-1 که شامل جایگزینی اسیدآمینه گلیسین به جای آلانین در موقعیت ۸ و اسیدهای آمینه گلوتامین و آسپارتیک اسید به جای لیزین به ترتیب در موقعیت‌های ۲۶ و ۳۴ استفاده شد.

افزون بر حساسیت پروتئازی، یکی از چالش‌های اساسی در افزایش کارآمدی GLP-1، رفع محدودیت نیمه‌عمر پایین آن است تا دوره اثربخشی آن در گردش خون در درمان دیابت نوع ۲ بطور مؤثر افزایش یابد. برای رفع این محدودیت، فناوری پروتئین‌های همجوشی انتخاب شد و برای مدل‌سازی محاسباتی و شبیه‌سازی آن-ها از ابزارهای بیوانفورماتیک و سرورهای آنلاین استفاده گردید. یکی از حوزه‌های مهم بیوانفورماتیک، طراحی دارو بر اساس شبیه‌سازی ساختاری مولکول‌های زیستی از جمله پروتئین‌های همجوشی با دمین‌های عملکردی مختلف و لینکرهای پپتیدی است (۴۷).

عملکرد پروتئین توسط ساختار آن و ساختار پروتئین توسط توالی اسیدهای آمینه آن تعیین می‌شود. از بیوانفورماتیک می‌توان برای پیش‌بینی ساختار و عملکرد پروتئین‌های ناشناخته بر اساس دانش موجود از توالی، ساختار و عملکرد پروتئین استفاده کرد (۴۸). این موضوع در بررسی ساختاری پروتئین‌هایی با ساختارهای PDB غیرقابل دسترس از اهمیت زیادی برخوردار است.

انعطاف‌پذیر 3(GGGGS) طراحی و در سیستم بیان باکتریایی تولید کردند.

یافته‌های آنها نشان داد که پروتئین همجوشی تولید شده منجر به افزایش نیمه عمر GLP-1 در گردش خون شده و به‌طور قابل‌توجهی سطح گلوکز خون را برای حداقل ۴۸ ساعت کاهش می‌دهد. با این حال با توجه به تنوع و اهمیت عملکردی لینکرها، ما در این مطالعه انواع لینکرهای انعطاف‌پذیر و سخت مارپیچ را برای تعیین بهترین ساختار پروتئین همجوشی با استفاده از ابزارهای محاسباتی بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار دادیم. استفاده از لینکر برای به‌دست آوردن یک مولکول فعال زیستی از جهات گوناگون حائز اهمیت است.

در این میان، اندازه و پیچیدگی لینکرها از عوامل تعیین‌کننده فعالیت زیستی پروتئین همجوشی است. در طراحی پروتئین همجوشی، بهینه‌سازی لینکر نه تنها منجر به بهبود بازده بیان می‌شود، بلکه به تاخوردگی صحیح و فعالیت زیستی همگام دمین‌های مختلف پروتئین همجوشی کمک می‌کند (۲،۴۸). فانگ و همکاران (۵۵) آنتی‌بادی‌های تک زنجیره دوکاره را با استفاده از آنتی‌بادی ضد CD3 ScFv، آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن OC183B2 ScFv و لینکرهای مختلف طراحی و تولید نمودند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که لینکرهای پپتیدی می‌توانند فعالیت اتصال به آنتی‌ژن و پایداری آنتی‌بادی در داخل بدن را تحت تاثیر قرار دهند.

در گزارش دیگری، لیو و همکاران (۱۳) نشان دادند که لینکرهای طولانی‌تر باعث حفظ تاخوردگی صحیح و فعالیت زیستی بهتر دو پروتئین متصل شده می‌شوند. با این حال، بایستی در نظر گرفت که لینکرهای طولی بیشتر در معرض برش‌های پروتئولیتیک توسط پروتئازهای میزبان قرار می‌گیرند. در حالی که لینکرهای بسیار کوتاه هم تاثیر منفی بر تاخوردگی صحیح پروتئین داشته و

پروتئین همجوشی طراحی‌شده در این مطالعه محصول اتصال پپتید GLP-1 تغییر یافته به یک دارپین اختصاصی و با میل ترکیبی بالا نسبت به سرم آلبومین انسانی است. پروتئین‌های تکرار آنکرین طراحی‌شده (دارپین‌ها) که پروتئین‌های طراحی‌شده مشتق از پروتئین‌های تکرار آنکرینی طبیعی با وزن مولکولی کمتر از ۲۰ کیلو دالتون و پایداری دمایی و ترمودینامیکی بالا و همچنین اختصاصیت و میل ترکیبی بالا نسبت به پروتئین‌های هدف هستند می‌توانند به عنوان جایگزینی برای داربست‌های مبتنی بر آنتی‌بادی استفاده شوند (۲۱). دارپین‌ها به شکل محلول و با عملکرد بالا در سیستم‌های بیانی باکتری (۴۹)، مخمر (۵۰) و گیاه (۵۱) قابل بیان و تولید هستند. تاکنون دارپین‌های بسیاری برای اهداف مختلف طراحی و ساخته شده‌اند، با این حال، در حال حاضر سه دارپین در حال گذراندن مراحل مختلف آزمایشات بالینی برای استفاده در آنکولوژی و چشم پزشکی و تعداد بیشتری تحت مطالعات پیش بالینی هستند. دارپین‌ها با میل ترکیبی بالا نسبت به HSA می‌توانند برای افزایش نیمه عمر پپتیدها و همچنین پروتئین‌های همجوشی استفاده شوند (۲۲).

دارپین MP0250 که VEGF و فاکتور رشد هیپاتوسیت (HGF) را هدف قرار می‌دهد، و هم اکنون در فاز ۲ مطالعات بالینی برای درمان سرطان ریه غیرسلولی کوچک با جهش در EGFR (NSCLC) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (۵۲)، شامل ۲ دارپین متصل شونده به آلبومین است که منجر به افزایش نیمه عمر سرم و افزایش بالقوه نفوذ به تومور این دارپین چندکاره می‌شود (۵۳). در یک مطالعه تجربی، تان و همکاران (۵۴) یک آنالوگ از GLP-1 را با ادغام ژنتیکی GLP-1 تغییر یافته با جایگزینی گلیاسین به جای آلانین در موقعیت ۸ به دارپین متصل شونده به سرم آلبومین انسانی (HSA) به واسطه یک لینکر

یکدیگر نسبت داده شده است. تحت این شرایط، لینکرهای سخت می‌توانند برای حفظ فاصله فضایی بین زمین‌ها و تضمین عملکرد مستقل آنها استفاده شوند. لینکرهای سخت با ساختار ماریپیج حدود دو دهه پیش برای کنترل فاصله بین زمین‌های پروتئینی و کاهش تداخل آنها طراحی شدند (۵۹). پس از آن لینکرهای ماریپیج به طور گسترده در طراحی و ساخت پروتئین‌های همجوشی برای بهبود بیان و فعالیت زیستی آنها استفاده شده‌اند (۵، ۶۰، ۶۱).

در همین راستا ژائو و همکاران (۶۱) تاثیر سه نوع لینکر شامل لینکر انعطاف‌پذیر (GGGGGS)، لینکر سخت غنی از پرولین (PAPAP) و لینکر سخت ماریپیج (AEAAAKEAAKA) را بر بیان و پایداری پروتئین همجوشی HSA و IFN- α 2b بررسی کردند، نتایج این محققین نشان داد که فعالیت ضدویروسی این پروتئین همجوشی با استفاده از لینکر انعطاف‌پذیر ۳۹٪، با لینکر غنی از پرولین ۶۸٪ و با لینکر سخت ماریپیج ۱۱۵٪ نسبت به پروتئین همجوشی که شامل اتصال دو پروتئین بدون لینکر است افزایش می‌یابد.

بر همین اساس، ما نیز در این مطالعه از لینکرهای متنوع برای اتصال دارپین به GLP-1 استفاده کردیم، چرا که مطالعات قبلی با آلبیگوتید به عنوان یک آنالوگ از GLP-1 نشان داده بود که حضور آلبومین مستقیماً در کنار GLP-1 می‌تواند فعالیت آن را به شدت محدود کند (۶۲). یوسف‌پور و همکاران (۶۳) نشان دادند که در پروتئین همجوشی GLP-1-ABD که شامل پپتید GLP-1 و یک زمین متصل شونده به آلبومین (ABD) است، لینکر بلند با ساختار ماریپیج نسبت به یک لینکر انعطاف‌پذیر کوتاه و بدون ساختار مشخص باعث تحریک بیشتر گیرنده GLP-1 در موش می‌شود.

این نشان‌دهنده این است که پروتئین متصل شده با لینکرهای کوتاه و بدون ساختار باعث ایجاد ممانعت

باعث ایجاد ممانعت فضایی برای هر یک از زمین‌ها برای اتصال به گیرنده و یا مولکول هدف می‌شوند (۵۶، ۵۷).

در مطالعات مرتبط با پروتئین همجوشی، به طور عمده از لینکرهای انعطاف‌پذیر و یا سخت استفاده می‌شود (۲، ۵۶). لینکرهای انعطاف‌پذیر معمولاً زمانی استفاده می‌شوند که زمین‌های پروتئینی متصل شده نیاز به تحرک و برهمکنش داشته باشند. این لینکرها معمولاً از توالی‌های کوتاه شامل گلايسين-سرين (لینکرهای GS) و یا پرولین-ترئونین (لینکرهای PT) تشکیل شده‌اند. لینکرهای GS شامل توالی‌های ۶ تا ۸ تایی از اسید آمینه گلايسين و یا یک تا چهار توالی پشت سرهم از (GGGGGS) هستند.

اندازه کوچک این لینکرها و عدم ممانعت فضایی زنجیره‌های جانبی گلايسين منجر به انعطاف‌پذیری آنها شده، اسید آمینه سرین نیز پایداری لینکر را تضمین می‌کند و بعلاوه توالی گلايسين منجر به پایداری در برابر هضم پروتئولیتیک و تاخوردگی صحیح پروتئین در داخل بدن می‌شود (۲). وجود پرولین در لینکرهای غیرماریپیج می‌تواند سختی لینکر را افزایش دهد و امکان جدایش فضایی زمین‌های پروتئینی را فراهم کند (۵۸).

همچنین وجود ترئونین در این لینکرها می‌تواند با تشکیل پیوندهای هیدروژنی با مولکول‌های آب، موجب حفظ پایداری لینکر در محلول‌های آبی شود و از این طریق برهمکنش نامطلوب بین لینکر و بخش‌های پروتئینی را کاهش دهد. علاوه‌براین، لینکرهای غنی از پرولین-ترئونین، O-گلیکوزیله می‌شوند که آن‌هم منجر به افزایش مقاومت لینکر در برابر تخریب پروتئولیتیک می‌گردد (۳۸). برخی از مطالعات نشان‌دهنده ناکارآمدی لینکرهای انعطاف‌پذیر در رابطه با فعالیت زیستی و یا کارایی بیان پروتئین‌های همجوشی هستند (۳).

در این موارد، ناکارآمدی لینکرهای انعطاف‌پذیر به جداسازی ناکارآمد زمین‌های پروتئینی یا تداخل آنها با

فضایی برای اتصال GLP-1 به گیرنده خود می‌شود، درحالی‌که استفاده از لینکرهای سخت و با طول بیشتر با ساختار مارپیچ می‌تواند GLP-1 و ABD را به اندازه کافی از هم دور نگه دارد، به طوری که اتصال آلبومین به ABD در توانایی GLP-1 برای اتصال به گیرنده خود تداخلی ایجاد نمی‌کند. بانو و همکاران (۳۵) نیز کارایی لینکر سخت مارپیچ (KEAAA)7LAA را در پروتئین همجوشی دارای دمین پروتئینی GLP-1 و دمین آنتی‌بادی متصل شونده به سرم آلبومین نشان دادند.

طبق نتایج این تحقیق و با توجه به آنالیزهای محاسباتی و ساختاری لینکر سخت مارپیچ 3(EAAAK) می‌تواند بهترین انتخاب برای پروتئین همجوشی دارای دو دمین پروتئینی mGLP-1 و HSA-DARPin باشد. بر اساس نتایج حاصله، استفاده از دارپین متصل به mGLP-1 به عنوان یک رویکرد جدید و اولین گام در تولید بیولوژیکی یک آنالوگ تغییر یافته ژنتیکی جدید از GLP-1 با نیمه عمر افزایش یافته برای استفاده در درمان دیابت نوع ۲ معرفی می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح پسا دکتری دانشگاه تبریز با شماره قرارداد ۴۸۲۹/ص استخراج گردیده است. از آزمایشگاه مهندسی ژنتیک دانشگاه تبریز و پژوهشگاه اطلاعات و مدارک علمی ایران (ایران-داک) بخاطر تامین امکانات لازم برای اجرای این تحقیق قدردانی می‌گردد.

References

1. Yu K, Liu C, Kim BG, Lee DY. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnol Adv.* 2015;33(1):155-64.
2. Chen X, Zaro JL, Shen W-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews.* 2013;65(10):1357-69.
3. Amet N, Lee HF, Shen WC. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins. *Pharm Res.* 2009;26(3):523-8.
4. Bai Y, Ann DK, Shen WC. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(20):7292-6.
5. Bai Y, Shen WC. Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization. *Pharm Res.* 20.21-2116:(9)23;6.
6. Tan SY, Wong JLM, Sim YJ, Wong SS, Elhassan SAM, Tan SH, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes & metabolic syndrome: clinical research & reviews.* 2019;13(1):364-72.
7. Saisho Y. β -cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes. *World journal of diabetes.* 2015;6(1):109.
8. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007;132.57-2131:(6).
9. Cho YM, Merchant CE, Kieffer TJ. Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacol Ther.* 2012;135(3):247-78.
10. Wang Y, Dilidaxi D, Wu Y, Sailike J, Sun X, Nabi XH. Composite probiotics alleviate type 2 diabetes by regulating intestinal microbiota and inducing GLP-1 secretion in db/db mice. *Biomed Pharmacother.* 2020;125:109914.
11. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 1995;136(8):3585-96.
12. Brayden DJ, Hill TA, Fairlie DP, Maher S, Mrsny RJ. Systemic delivery of peptides by the oral route: Formulation and medicinal chemistry approaches. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;157:2-36.
13. Liu Z, Lin J, Du Y, Yu W. Anti-proteolysis study of recombinant IIn-UK fusion protein in CHO cell. *PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS.* 2005;32(6):544-50.
14. Dibonaventura MD, Wagner JS, Girman CJ, Brodovicz K, Zhang Q, Qiu Y, et al. Multinational Internet-based survey of patient preference for newer oral or injectable Type 2 diabetes medication. *Patient Prefer Adherence.* 2010;4:397-406.
15. Eissa NG, Elsabahy M, Allam A. Engineering of smart nanoconstructs for delivery of glucagon-like peptide-1

- analogs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;597:120317.
16. Reed J, Bain S, Kanamarlapudi V. Recent advances in understanding the role of glucagon-like peptide 1. *F1000Res*. 2020;9.
 17. Kontermann RE. Half-life extended biotherapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(7):903-15.
 18. Strohl WR. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs*. 2015;29(4):215-39.
 19. Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release*. 2008;132(3):171-83.
 20. Yang B, Lim SI, Kim JC, Tae G, Kwon I. Site-Specific Albumination as an Alternative to PEGylation for the Enhanced Serum Half-Life in Vivo. *Biomacromolecules*. 2016;17(5):1811-7.
 21. Caputi AP, Navarra P. Beyond antibodies: ankyrins and DARPin. From basic research to drug approval. *Curr Opin Pharmacol*. 2020;51:93-101.
 22. Stumpp MT, Dawson KM, Binz HK. Beyond Antibodies: The DARPin® Drug Platform. *BioDrugs*. 2020;34(4):423-33.
 23. Binz HK, Bakker TR, Phillips DJ, Cornelius A, Zitt C, Göttler T, et al., editors. Design and characterization of MP0250, a tri-specific anti-HGF/anti-VEGF DARPin® drug candidate. *MAbs*; 2017: Taylor & Francis.
 24. Xu F, Wang KY, Wang N, Li G, Liu D. Modified human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) produced in *E. coli* has a long-acting therapeutic effect in type 2 diabetic mice. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181939.
 25. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*. 2005:571-607.
 26. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(3):147-50.
 27. Du Z, Su H, Wang W, Ye L, Wei H, Peng Z, et al. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nature protocols*. 2021;16(12):5634-51.
 28. Laskowski R, MacArthur M, Thornton J. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. 2006.
 29. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W407-10.
 30. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*. 2021;30(1):70-82.
 31. Xue LC, Rodrigues JP, Kastritis PL, Bonvin AM, Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics*. 2016;32(23):3676-8.

32. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 1995;8(2):127-34.
33. Thornton K, Gorenstein DG. Structure of glucagon-like peptide (7-36) amide in a dodecylphosphocholine micelle as determined by 2D NMR. *Biochemistry.* 1994;33(12):3532-9.
34. Steiner D, Merz FW, Sonderegger I, Gulotti-Georgieva M, Villemagne D, Phillips DJ, et al. Half-life extension using serum albumin-binding DARPin® domains. *Protein Eng Des Sel.* 2017;30(9):583-91.
35. Bao W, Holt LJ, Prince RD, Jones GX, Aravindhhan K, Szapacs M, et al. Novel fusion of GLP-1 with a domain antibody to serum albumin prolongs protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in the rat. *Cardiovascular Diabetology.* 2013;12(1):148.
36. Shamriz S, Ofoghi H, Moazami N. Effect of linker length and residues on the structure and stability of a fusion protein with malaria vaccine application. *Comput Biol Med.* 2016;76:24-9.
37. Arai R. Design of helical linkers for fusion proteins and protein-based nanostructures. *Methods Enzymol.* 2021;647:209-30.
38. Poon DK, Withers SG, McIntosh LP. Direct demonstration of the flexibility of the glycosylated proline-threonine linker in the *Cellulomonas fimi* Xylanase Cex through NMR spectroscopic analysis. *J Biol Chem.* 2007;282(3):2091-100.
39. Guruprasad K, Reddy BB, Pandit MW. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection.* 1990;4(2):155-61.
40. Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry.* 1980;88(6):1895-8.
41. Du Z, Su H, Wang W, Ye L, Wei H, Peng Z, et al. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nat Protoc.* 2021;16(12):5634-51.
42. Burcelin R, Dolci W, Thorens B. Long-lasting antidiabetic effect of a dipeptidyl peptidase IV-resistant analog of glucagon-like peptide-1. *Metabolism.* 1999;48(2):252-8.
43. Deacon C, Knudsen L, Madsen K, Wiberg F, Jacobsen O, Holst J. Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia.* 1998;41(3):271-8.
44. Mótýán JA, Tóth F, Tózsér J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules.* 2013;3(4):923-42.
45. Hughes S, Neumiller JJ. Oral Semaglutide. *Clin Diabetes.* 2020;38(1):109-11.
46. Knudsen LB, Lau J. The Discovery and Development of Liraglutide and

- Semaglutide. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:155.
47. Hajduk PJ, Huth JR, Tse C. Predicting protein druggability. *Drug Discov Today*. 2005;10(23-24):1675-82.
 48. Dietmann S, Aguilar D, Mader M, Oesterheld M, Ruepp A, Stuepfen V, et al. Resources and tools for investigating biomolecular networks in mammals. *Curr Pharm Des*. 2006;12(29):3723-34.
 49. Zahnd C, Amstutz P, Plückthun A. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nature methods*. 2007;4(3):269-79.
 50. Goldstein R, Sosabowski J, Livanos M, Leyton J, Vigor K, Bhavsar G, et al. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2015;42(2):288-301.
 51. Ehsasatvatan M, Kohnehrouz BB, Gholizadeh A, Ofoghi H, Shanebandi D. The production of the first functional antibody mimetic in higher plants: the chloroplast makes the DARPin G3 for HER2 imaging in oncology. *Biological Research*. 2022;55(1):1-18.
 52. Grząsko N, Knop S, Goldschmidt H, Raab MS, Dürig J, Bringham S, et al. The MP0250-CP201 mirror study: a phase 2 study update of MP0250 plus bortezomib and dexamethasone in relapse/refractory multiple myeloma (RRMM) patients previously exposed to proteasome inhibitors and immunomodulatory drugs. *Blood*. 2019;134:1899.
 53. Rodon J, Omlin A, Herbschleb KH, Garcia-Corbacho J, Steiner J, Dolado I, et al. Abstract B25: First-in-human Phase I study to evaluate MP0250, a DARPin blocking HGF and VEGF, in patients with advanced solid tumors. *AACR*; 2015.
 54. Tan H, Su W, Zhang W, Zhang J, Sattler M, Zou P. Generation of novel long-acting GLP-1R agonists using DARPins as a scaffold. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;607:121043.
 55. Fang M, Jiang X, Yang Z, Yin C, Li H, Zhao R, et al. Effects of interlinker sequences on the biological properties of bispecific single-chain antibodies. *Chinese Science Bulletin*. 2003;48(21):2277-83.
 56. Le Gall F, Reusch U, Little M, Kipriyanov SM. Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody. *Protein Eng Des Sel*. 2004;17(4):357-66.
 57. Gustavsson M, Lehtiö J, Denman S, Teeri TT, Hult K, Martinelle M. Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng*. 2001;14(9):711-5.
 58. McCormick AL, Thomas MS, Heath AW. Immunization with an interferon-gamma-gp120 fusion protein induces enhanced immune responses to human immunodeficiency virus gp120. *J Infect Dis*. 2001;184(11):1423-30.
 59. Arai R, Wriggers W, Nishikawa Y, Nagamune T, Fujisawa T. Conformations

- of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. *Proteins*. 2004;57(4):829-38.
60. Amet N, Wang W, Shen WC. Human growth hormone-transferrin fusion protein for oral delivery in hypophysectomized rats. *J Control Release*. 2010;141(2):177-82.
61. Zhao HL, Yao XQ, Xue C, Wang Y, Xiong XH, Liu ZM. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expr Purif*. 2008;61(1):73-7.
62. Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. *Diabetes*. 2004;53(9):2492-500.
63. Yousefpour P, Varanko A, Subrahmanyam R, Chilkoti A. Recombinant Fusion of Glucagon-Like Peptide-1 and an Albumin Binding Domain Provides Glycemic Control for a Week in Diabetic Mice. *Advanced Therapeutics*. 2020;3(10):2000073.

Effect of Linker's Length and Sequence on the Structure and Stability of mGLP-1-DARPin Fusion Protein for Treatment of Type 2 Diabetes: A Computational Study

Ehsasatvatan M¹, Baghban Kohnehrouz B^{2*}

1. PhD, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

Received: 2023/3/4

Accepted: 2023/8/5

Abstract

Background: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is a promising peptide for the treatment of type 2 diabetes mellitus. However, the potential for therapeutic use of native GLP-1 is limited due to its extremely short half-life (a few minutes). In this research, a modified protease-resistant glucagon-like peptide-1 (mGLP-1) and a human serum albumin-binding DARPin connected by flexible and helical rigid linkers were designed to increase the half-life of this therapeutic peptide.

Materials and Methods: In this study, the primary and secondary structures of designed fusion proteins were computationally studied, and some of their properties were predicted. The 3D model of the fusion proteins was created using the trRosetta server, and molecular docking between the fusion proteins and their respective receptors was conducted in the ClusPro server.

Results: The results showed that the helical rigid linker (EAAAK)₃ produced the best structure and stability for the designed fusion protein, and the fusion protein could preserve the original structure of the GLP-1 and DARPin molecules. The results of protein-ligand docking confirmed the interaction of fusion proteins with respectable receptors.

Conclusion: When developing new fusion proteins, displaying and validating the domains of the designed structure is essential for comparing the efficiency and functionality with its natural homolog. The results of this study demonstrated that the mGLP-1-(EAAAK)₃-DARPin fusion protein could be used in stability engineering to increase the half-life of the GLP-1 peptide drug in combination with HSA-binding DARPin.

Keywords: DARPin, Fusion protein, Glucagon-like peptide-1, Human serum albumin, Type 2 diabetes mellitus.

***Citation:** Ehsasatvatan M, Baghban Kohnehrouz B. Effect of Linker's Length and Sequence on the Structure and Stability of mGLP-1-DARPin Fusion Protein for Treatment of Type 2 Diabetes: A Computational Study. *Yafte*. 2023; 25(2):26-47.