

بررسی پایداری مولکولی مهارکننده‌های نسل دوم EGFR در تعامل با پروتئین نوع وحشی: یک مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

سید صادق محمدی موسوی^۱، سید شهریار عرب^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تهران، ایران
sh.arab@modares.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۲

چکیده

در این مطالعه، تأثیر مهارکننده‌های نسل دوم EGFR شامل Afatinib، Dacomitinib و Neratinib و کاندیداهای دارویی Canertinib و Pozotinib بر پروتئین EGFR نوع وحشی با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) بررسی شد. پارامترهای مختلفی نظیر RMSD، شعاع ژیراسیون (Rg)، SASA و پیوندهای هیدروژنی برای بررسی پایداری کمپلکس‌ها محاسبه شدند. نتایج تحلیل MMPBSA نشان داد که Neratinib با کمترین انرژی آزاد اتصال (ΔG)، تمایل اتصال بیشتری به EGFR دارد و در طول شبیه‌سازی پایداری بالاتری از خود نشان داده است. همچنین، تحلیل مؤلفه‌ی اصلی (PCA) نشان داد که کمپلکس EGFR-Neratinib دینامیک کمتری داشته و فضای فاز کمتری را اشغال می‌کند که نشان‌دهنده پایداری بیشتر این کمپلکس است. این نتایج نشان می‌دهد که Neratinib می‌تواند به‌عنوان قوی‌ترین مهارکننده در مقایسه با سایر ترکیبات مورد بررسی، شناخته شود و پتانسیل بالایی برای استفاده در درمان‌های ترکیبی علیه EGFR دارد.

کلیدواژگان: EGFR نوع وحشی، مهارکننده‌های نسل دوم EGFR، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، تحلیل MMPBSA، Neratinib

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، باز نشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

۱- مقدمه

گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTKs) گیرنده‌های سطح سلولی هستند که به فاکتورهای رشد مختلف متصل شده و در فرایندهای مهم سلولی از جمله تکثیر، تمایز، بقا، متابولیسم و کنترل چرخه سلولی نقش دارند [۱ و ۲]. ساختار این گیرنده‌ها از سه بخش خارج سلولی برای اتصال به لیگاند، ماریپیچ گذرنده از غشا و بخش سیتوپلاسمی تشکیل شده است. ناحیه سیتوپلاسمی شامل دومین تیروزین کیناز (TKD) می باشد که رزیجوی تیروزین را روی پروتئین‌ها فسفریله می کند. ساختار RTKها در طول تکامل حفظ شده‌اند و جهش در آنها باعث بروز اختلالات مختلف می شود [۳].

یکی از گیرنده‌های تیروزین کینازها، گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی EGFR می باشد. EGFR یک گلیکو پروتئین ۱۷۰ کیلو دالتونی است که در دهه ۱۹۷۰ توسط کارپنتر شناسایی شد [۴]. ساختار اعضای خانواده HER در حوزه‌ی تیروزین کیناز مشابه‌اند اما در حوزه‌های دیگر تفاوت‌هایی مشاهده می شود [۵ و ۶].

۱-۱ EGFR و سرطان

بیان بیش از حد پروتئین EGFR و یا جهش در این گیرنده با بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان ریه، سینه و سر و گردن در ارتباط است [۷]. جهش‌ها براساس تغییرات ساختاری به هشت دسته تقسیم می شوند که شایع ترین جهش نوع EGFRvIII می باشد که باعث تغییرات در دومین خارج سلولی شده و مانع از اتصال لیگاند به پروتئین می شود اما همچنان سیگنال دهی درون سلولی پایدار است [۴ و ۳].

داروهای ضد EGFR به دو دسته اصلی تقسیم می شوند: الف) آنتی بادی‌های مونوکلونال که مانع از اتصال لیگاند به دومین خارج سلولی می شوند.

ب) مهارکننده‌های تیروزین کیناز (TKIs) که مانع از فعالیت دومین تیروزین کیناز می شوند [۸ و ۴]. TKIs برای اتصال به دومین تیروزین کیناز با ATP رقابت برگشت پذیر دارند که مانع از فعال سازی تیروزین کیناز و مهار مسیرهای سیگنال دهی می شود [۹]. این مهارکننده‌ها به چهار نسل تقسیم می شوند که نسل دوم مانند Afatinib و Dacomitinib به EGFR و دیگر اعضای HER^۱ متصل می شوند [۱۱ و ۱۰]. داده‌های بالینی نشان می دهد که استفاده از EGFR-TKIها برای بیماران مبتلا به سرطان ریه غیر سلول کوچک^۲ (NSCLC) دارای EGFR نوع وحشی، که تحت شیمی درمانی قرار گرفته‌اند می تواند مزایای بقایی فراهم کند که براین اساس توصیه می شود EGFR-TKI برای درمان خط دوم برای بیماران با EGFR نوع وحشی استفاده شود [۱۲].

درمان‌های ترکیبی اغلب مؤثرتر از دیگر روش‌های درمانی هستند [۱۳]. اما به دلیل تداخلات دارویی، درمان با داروهایی که بر روی چندین هدف اثر می گذارند نتایج بهتری از خود نشان داده‌اند [۷]. اکثر بیماران NSCLC که دارای EGFR نوع وحشی هستند، از مزایای درمان ترکیبی برخوردار نمی شوند و فقط داروهای ضد سرطان عمومی با سمیت بالا دریافت می کنند [۱۴ و ۱۱].

با توجه به نقش کلیدی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) در انواع سرطان‌ها و اهمیت درمان ترکیبی، و تأکید بر استفاده از داروهایی که بر چندین هدف اثرگذارند، در این پژوهش به بررسی اثر مهارکننده‌های نسل دوم EGFR از جمله Afatinib، Dacomitinib و Neratinib و کاندیدهای دارویی نسل دوم Canertinib و Pozotinib بر EGFR پرداخته شد. این مطالعه با استفاده از شبیه سازی‌های دینامیک مولکولی (MD) انجام شد تا تأثیر این داروها در مهار EGFR به طور دقیق ارزیابی شود.

۲- مواد و روش‌ها

^۲ Non-small Cell Lung Cancer^۱ Human Epidermal Receptor

اساس مدل‌های فیزیکی صورت می‌گیرند که تعاملات بین اتم‌ها را توصیف می‌کنند. شبیه‌سازی‌های MD قادر به تصویرسازی فرایندهای زیست‌مولکولی مهمی همچون تغییرات ساختاری، اتصال لیگاند و تاخوردگی پروتئین هستند [۲۱].

در این پژوهش، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی کمپلکس‌های EGFR با مهارکننده‌های نسل دوم، از جمله EGFR-Afatinib، EGFR-Dacomitinib، EGFR-Neratinib و EGFR-Pozotinib انجام شد. این شبیه‌سازی‌ها در دمای ۳۱۰ کلوین و غلظت ۰٫۱ مولار با استفاده از نرم‌افزار GROMACS 2018.8 اجرا شدند. توپولوژی ترکیبات و پارامترهای میدان نیرو با کمک سرور CGENFF تولید شد. اتم‌های ترکیبات اضافی به فایل‌های توپولوژی کمپلکس اضافه شده و پارامترهای تمامی ترکیبات در توپولوژی سیستم اضافه شدند. این شبیه‌سازی‌ها با هدف بررسی پایداری کمپلکس‌های EGFR با مهارکننده‌های نسل دوم انجام شد. نتایج حاصل می‌تواند به درک عمیق‌تری از مکانیسم‌های تعامل این داروها با EGFR کمک کند [۲۲].

کمپلکس‌های EGFR-Afatinib، EGFR-Neratinib و EGFR-Pozotinib در یک جعبه دوازده‌وجهی با محیطی آبی قرار داده شدند. برای تعریف شرایط مرزی جعبه از ماژول gmx editconf و برای فرایند حلال‌سازی از ماژول gmx solvate استفاده شد. فاصله لبه‌های جعبه از مولکول‌های موجود، ۱ نانومتر در نظر گرفته شد. برای حلال‌سازی پروتئین‌ها از مدل آب TIP3P^۲ بهره‌برداری شد.

برای متعادل‌سازی بارهای سیستم، یون‌های Na⁺ و Cl⁻ به غلظت فیزیولوژیک (۰٫۱ مولار) با استفاده از ماژول gmx genion اضافه شدند. در فایل پارامترهای دینامیک مولکولی (mdp)، گروه‌های انرژی برای تحلیل دقیق

این پژوهش با استفاده از یک کلاستر محاسباتی با ۱۲۸ هسته پردازشی و ۸ ترابایت فضای ذخیره‌سازی داخلی انجام شد. برای انجام این پژوهش، از چندین ابزار محاسباتی استفاده شد. نرم‌افزار Hyperchem جهت بهینه‌سازی ساختار داروها و کاندیداهای دارویی استفاده شد. برای تحلیل ساختارهای مولکولی، از نرم‌افزارهای YASARA و PYMOL استفاده شد.

علاوه بر این، از وب‌سرورها و منابع آنلاین نظیر NCBI، PDB، پایگاه داده ZINC، DrugBank و PubChem برای بازیابی، ارزیابی و تجزیه و تحلیل داده‌های بیولوژیکی و شیمیایی بهره گرفته شد. این مجموعه ابزارها و منابع محاسباتی امکان تحلیل دقیق و بهینه‌سازی ساختارهای مولکولی و دارویی را فراهم کردند.

۲-۱ داکینگ مولکولی

ابتدا ساختارهای دارویی استخراج‌شده از پایگاه داده DrugBank با استفاده از نرم‌افزار Hyperchem بهینه‌سازی شدند. سپس، فرایند داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار Vina و دومین تیروزین کیناز EGFR انجام شد که با کد 1M14 از پایگاه داده RCSB دانلود شده بود [۲۰-۱۵].

داکینگ مولکولی به صورت blind اجرا شد تا محل اتصال بهینه دارو به EGFR شناسایی شود. برای اطمینان از دقت و صحت محل اتصال، این فرایند پنج مرتبه تکرار شد. با توجه به اینکه جایگاه اتصال داروهای تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA)^۱ و سایر مهارکننده‌های EGFR در ناحیه اتصال EGFR-ATP قرار دارد، نتایج داکینگ نیز با این یافته‌ها تطابق داشت و محل اتصال صحیح دارو را در همان ناحیه مشخص شد.

۲-۲ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی (MD) برای پیش‌بینی حرکت هر اتم در یک پروتئین یا سیستم مولکولی دیگر در طول زمان به کار گرفته می‌شوند. این پیش‌بینی‌ها بر

^۲ transferable intermolecular potential 3P

^۱ Food and Drug Administration

پروتئین و لیگاند با استفاده از رویکرد MMPBSA و به کمک بسته نرم افزاری g_mmpbsa محاسبه شد.

این انرژی اتصال طبق رابطه زیر تعیین شد:

$$\Delta G_{\text{binding}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{receptor}} + G_{\text{ligand}})$$

در این رابطه:

$\Delta G_{\text{binding}}$: انرژی اتصال

G_{complex} : انرژی کل مجموعه پروتئین-لیگاند

G_{receptor} : انرژی پروتئین بدون لیگاند

G_{ligand} : انرژی لیگاند بدون پروتئین

این محاسبات درک بهتری از تعاملات مولکولی فراهم کرده و باعث بهینه سازی فرایند غربالگری مجازی می شود [۲۴ و ۲۳].

برای محاسبه انرژی اتصال، از ۸۱ فریم استخراج شده از فاز پایدار، از ۶۰ تا ۸۰ نانوثانیه شبیه سازی MD، استفاده شد. نتایج MMPBSA به مقایسه و ارزیابی قدرت اتصال لیگاندهای مختلف به EGFR کمک می کند.

۳- نتایج

پروتئین EGFR نقشی حیاتی در پیشرفت انواع سرطانها ایفا می کند و تاکنون مهارکننده های متعددی برای تأثیر گذاری بر این پروتئین طراحی و توسعه یافته اند. مهارکننده های نسل دوم به طور خاص با هدف مهار جهش EGFR-T790M ایجاد شده اند، اما نمی توان نقش EGFR نوع وحشی را در مقاومت دارویی و تشکیل سرطانها نادیده گرفت. از سوی دیگر، رویکردهای نوین درمانی به استفاده از درمان های ترکیبی تأکید بیشتری دارند. مهارکننده های نسل دوم به دلیل توانایی هدف گیری چندین مسیر، می توانند گزینه ای مناسب برای درمان های ترکیبی باشند.

در این پژوهش، اثربخشی مهارکننده های نسل دوم شامل داروهای Afatinib، Dacomitinib و Neratinib، و همچنین کاندیداهای دارویی Canertinib و Pozotinib که در مراحل آزمایشگاهی هستند، بر روی EGFR نوع

برهم کنش های میان EGFR و مهارکننده ها تعیین شد. برای محاسبه برهم کنش های الکترواستاتیک، از روش مش ذره ای والد (PME) استفاده شد.

سپس، انرژی سیستم با استفاده از روش تندترین فرود (steepest descent) تا ۱۵۰۰ مرحله به حداقل ممکن کاهش یافت. دمای سیستم نیز در طی دوره تعادلی به مدت ۱۰۰ پیکوثانیه، از ۲۸۰ به ۳۱۰ کلوین (دمای بدن) افزایش داده شد. این فرایند تحت شرایط مرزی دوره ای و در حجم ثابت اجرا شد تا سیستم به یک وضعیت پایدار برسد.

در مرحله تعادل، دو مجموعه دینامیکی پایدار شامل NVT (تعداد ذرات، حجم و دما ثابت) و NPT (تعداد ذرات، فشار و دما ثابت) به مدت ۱۰۰ پیکوثانیه اجرا شدند. پس از این مراحل، فاز تولید نهایی شبیه سازی آغاز شد که به مدت ۱۰۰ نانوثانیه به طول انجامید و دما در این مرحله به ۳۱۰ کلوین رسید.

برای تجزیه و تحلیل دقیق مسیرهای شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) در کل مدت شبیه سازی، از ماژول های مختلف نرم افزار Gromacs، از جمله gmx و gmx rmsd، gyrate استفاده شد. علاوه بر این، در بازه تعادل (از ۶۰ تا ۸۰ نانوثانیه)، برای انجام تحلیل های پیشرفته تر از ماژول های gmx do_dssp، gmx hbond، gmx rmsf، gmx covar، gmx anaeig و gmx sasa استفاده شد. مدل های سه بعدی به دست آمده نیز با استفاده از نرم افزار PyMOL به صورت گرافیکی نمایش داده شدند [۱۹].

۲-۳ محاسبه MMPBSA

روش مکانیک مولکولی مساحت سطح پواسون بولتزمن (MMPBSA) یک رویکرد مؤثر برای بازتولید و تفسیر نتایج تجربی اتصال لیگاند است. برای محاسبه MMPBSA، یک مسیر کوتاه از دینامیک مولکولی (MD) در ناحیه پایدار هر سیستم استخراج شد. انرژی اتصال

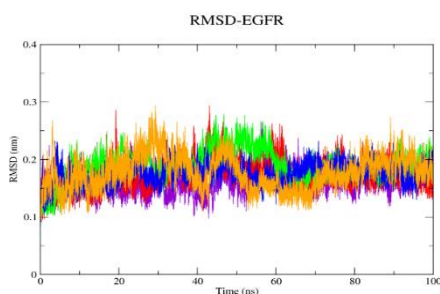
بررسی دقیق تر رفتار سیستم و ارزیابی پایداری ساختاری آن استفاده شد.

۳-۲-۱ آنالیز (RMSD) Root mean square deviation

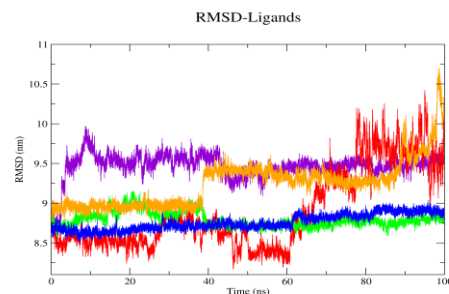
اتصال یک ترکیب به پاکت کاتالیزوری پروتئین می تواند باعث تغییرات ساختاری قابل توجهی در پروتئین شود. یکی از معیارهای کلیدی برای ارزیابی پایداری پروتئین و حفظ نزدیکی آن به ساختار اولیه آزمایشی، انحراف میانگین مربعات (RMSD) است.

در تمامی کمپلکس ها نوساناتی مشاهده شد، اما این تغییرات عمدتاً در حدود ۰٫۱ نانومتر بوده که نوساناتی طبیعی محسوب می شوند. بازه زمانی ۶۰ تا ۸۰ نانوثانیه به عنوان دوره تعادل در نظر گرفته شده و برای نمونه برداری و انجام سایر تحلیل ها انتخاب شد (شکل ۱-الف).

بررسی RMSD اتم های سنگین لیگاند نسبت به پروتئین نشان داد که ترکیب Canertinib نوسانات زیادی داشته است، که این نوسانات نشان دهنده تغییرات مکانی ترکیب در ارتباط با پروتئین است. دیگر مهارکننده ها در این بازه زمانی نوسانات کمتری داشتند. از طرفی، Neratinib کمترین نوسان را در طول شبیه سازی ۱۰۰ نانوثانیه ای داشت، که این موضوع نشان دهنده پایداری و حفظ وضعیت اتصال آن به پروتئین در طول شبیه سازی است (شکل ۱-ب).



(الف)



(ب)

شکل ۱ الف) RMSD پروتئین. ب) RMSD لیگاندها. بنفش EGFR-Afatinib قرمز EGFR-Canertinib سبز EGFR-Dacomitinib آبی EGFR-Neratinib نارنجی EGFR-Pozotinib.

وحشی بررسی شد تا بهترین داروی نسل دوم شناسایی شود.

۳-۱ داکینگ مولکولی

برای تعیین بهترین محل اتصال هر مولکول، فرایند داکینگ مولکولی با پروتئین EGFR پنج مرتبه تکرار شد. نتایج این فرایند در فایل های log و output ثبت شدند که شامل امتیازهای میل ترکیبی و مکان های اتصال هر ترکیب هستند. سپس، این داده ها با استفاده از نرم افزار PyMol به صورت گرافیکی نمایش داده شدند. بررسی نتایج نشان داد که مکان های اتصال تمام ترکیبات در هر پنج تکرار با محل های اتصال داروهای تأیید شده توسط FDA تطابق داشت. این هماهنگی نشان دهنده صحت و دقت روش داکینگ مولکولی در شناسایی محل های اتصال معتبر است.

۳-۲ تجزیه و تحلیل داده های شبیه سازی MD

تجزیه و تحلیل داده های شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) شامل بررسی تغییرات ریشه میانگین مربعات انحراف (RMSD) و شعاع ژیراسیون (Rg) در طول شبیه سازی بود. این تحلیل ها با هدف ارزیابی پایداری و تغییرات ساختاری سیستم در طول شبیه سازی انجام شدند. برای انجام سایر تحلیل ها، بازه ای ۲۰ نانوثانیه ای از دوره زمانی که سیستم در حالت تعادل قرار داشت، به عنوان نمونه انتخاب شد. این بازه زمانی به طور خاص برای

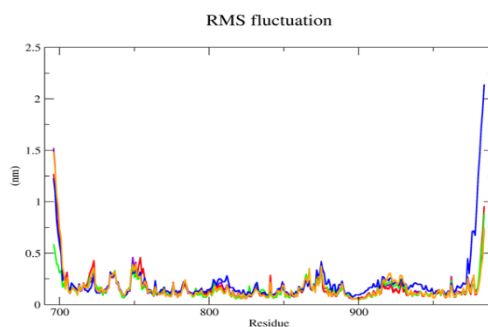
۲-۲-۳ Root mean square fluctuation (RMSF)

برای محاسبه میانگین نوسانات تمام باقی مانده‌ها در طول شبیه‌سازی، نوسان ریشه میانگین مربعات (RMSF) به عنوان تابعی از تعداد باقی مانده‌ها برای هر کمپلکس رسم شد. این تحلیل در بازه تعادلی ۶۰ تا ۸۰ نانوثانیه انجام شد. نتایج نمودار RMSF نشان داد که در چندین ناحیه از ساختار پروتئین، نوسانات قابل توجهی رخ می‌دهد. اتصال Afatinib و Dacomitinib منجر به کاهش قابل ملاحظه نوسانات در مقایسه با سایر کمپلکس‌ها شد،

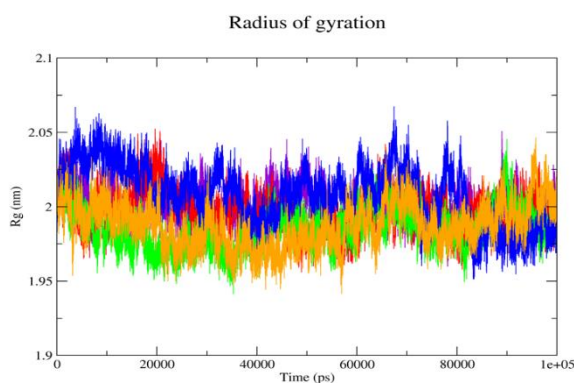
در حالی که اتصال Neratinib بیشترین نوسان را در مقایسه با سایر کمپلکس‌ها به همراه داشت (شکل ۲).

۳-۲-۳ Radius of gyration (Rg)

شعاع ژیراسیون (Rg) پارامتری است که به حجم ساختار سوم پروتئین مرتبط است و برای ارزیابی پایداری پروتئین در سیستم‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود. نمودار Rg نشان می‌دهد که پروتئین EGFR در هنگام اتصال با مهارکننده‌ها نوسانات بسیار کمی، در حدود ۰٫۱ نانومتر، دارد. این نوسانات کم نشان‌دهنده پایداری EGFR در طول زمان شبیه‌سازی است (شکل ۳).



شکل ۲ RMSF پروتئین در اتصال با لیگاندها. بنفش EGFR-Afatinib قرمز EGFR-Canertinib سبز EGFR-Dacomitinib آبی EGFR-Neratinib نارنجی EGFR-Poziotinib



شکل ۳ نمودار شعاع پروتئین EGFR در اتصال با لیگاندها. بنفش EGFR-Afatinib قرمز EGFR-Canertinib سبز EGFR-Dacomitinib آبی EGFR-Neratinib نارنجی EGFR-Poziotinib

۳-۲-۴ Solvent Accessible Surface Area (SASA)

سطح قابل دسترس حلال (SASA) به عنوان سطحی از پروتئین تعریف می شود که در تماس با مولکول های حلال قرار دارد. میانگین مقادیر SASA برای EGFR در اتصال با Canertinib، Neratinib، Dacomitinib، Afatinib و Poziotinib به ترتیب برابر با ۱۴۰،۰۴ نانومتر مربع، ۱۴۱،۵۹ نانومتر مربع، ۱۴۲،۱۱ نانومتر مربع، ۱۴۲،۴۱ نانومتر مربع و ۱۳۹،۰۵ نانومتر مربع است. مقادیر میانگین SASA نشان می دهد که Poziotinib کمترین سطح در دسترس حلال را دارد، در حالی که Neratinib و Canertinib مقادیر بیشتری از سطح قابل دسترس حلال دارند. هر چه مقدار SASA کمتر باشد، سطح تماس پروتئین با حلال کاهش می یابد که این می تواند نشانه ای از پایداری بیشتر پروتئین باشد. این نتایج حاکی از آن است که Poziotinib ممکن است باعث پایداری بیشتری در پروتئین EGFR شود (شکل ۴).

۳-۲-۵ Hydrogen Bonds Analysis

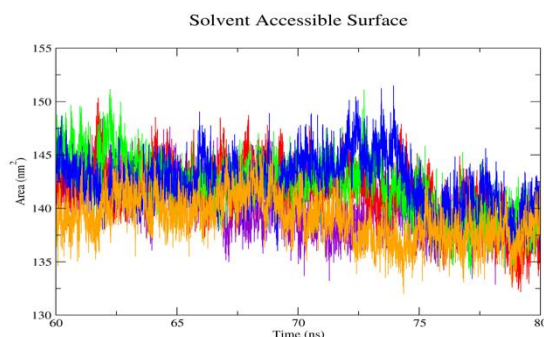
پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین و ترکیبات برای ارزیابی پایداری کمپلکس های متصل بررسی شدند. در این مطالعه، پیوندهای هیدروژنی در فاصله ۰،۳۵ نانومتر بین EGFR و لیگاندهای Afatinib، Canertinib، Dacomitinib، Neratinib و Poziotinib در یک محیط حلال، طی بازه

تعدالی ۶۰ تا ۸۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی محاسبه شدند.

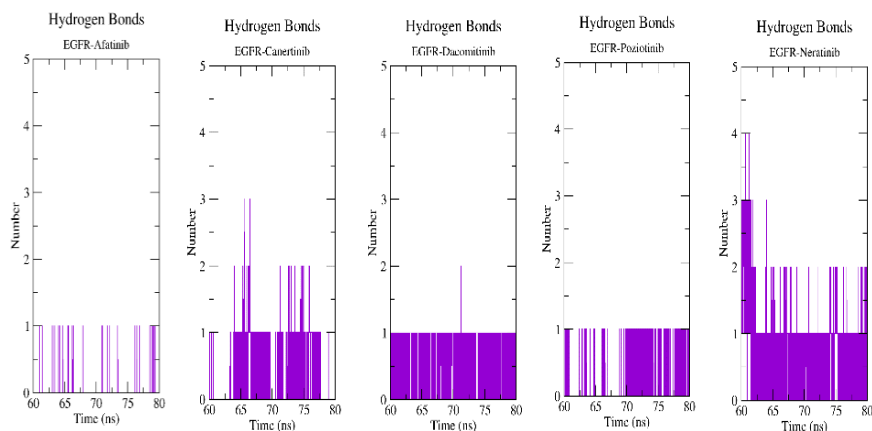
نتایج نشان دادند که مهارکننده Neratinib بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی با EGFR داشته و به طور پایدار به جایگاه فعال متصل شده است. در مقابل، Afatinib با کمترین تعداد پیوند هیدروژنی به جایگاه فعال متصل شد. این نتایج نشان دهنده پایداری بیشتر کمپلکس Neratinib در مقایسه با سایر کمپلکس ها است (شکل ۵).

۳-۲-۶ Principal Component Analysis

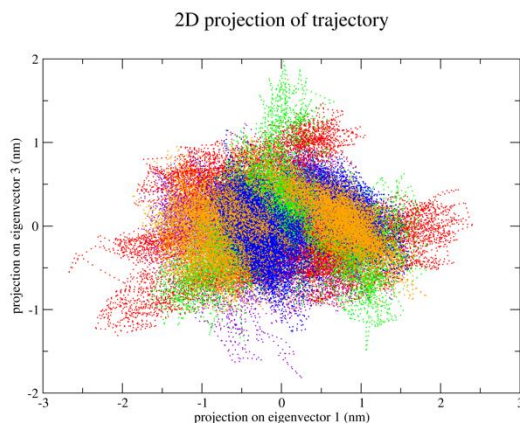
تجزیه و تحلیل مؤلفه های اصلی (PCA) یک روش مؤثر برای کاهش پیچیدگی داده های شبیه سازی دینامیک مولکولی است. این تکنیک با استخراج حرکات جمعی اتم های Cα به درک بهتری از پویایی پروتئین کمک می کند. PCA به ویژه برای بررسی پایداری کمپلکس ها مفید است، زیرا می تواند تغییرات کلی پروتئین در طول شبیه سازی را نشان دهد. در شکل ۶، پیش بینی دو بعدی مسیرهای دینامیک برای دو مؤلفه اصلی PC1 و PC2 نشان داد که کمپلکس های EGFR-Neratinib بیشترین پایداری را داشته و فضای فاز کمتری را اشغال کرده اند. این نتایج نشان دهنده تشکیل خوشه های کاملاً تعریف شده و پایداری بالا با کمترین تغییرات ساختاری در طول شبیه سازی است.



شکل ۴ سطح قابل دسترس حلال (SASA). بنفش EGFR-Afatinib قرمز EGFR-Canertinib سبز EGFR-Dacomitinib آبی EGFR-Neratinib نارنجی EGFR-Poziotinib



شکل ۵ تعداد پیوند هیدروژنی بین پروتئین و مهارکننده‌ها در جایگاه فعال.



شکل ۶ آنالیز PCA: نمودار پیش‌بینی دو بعدی مسیرهای دینامیک. بنفش EGFR-Afatinib قرمز EGFR-Canertinib سبز EGFR-EGFR-Pozotinib آبی EGFR-Neratinib نارنجی EGFR-Dacomitinib

نتایج حاصل از تحلیل MMPBSA نشان می‌دهد که مهارکننده Neratinib تمایل بسیار بیشتری به اتصال با EGFR نسبت به سایر مهارکننده‌ها دارد. این مسئله از آنجا ناشی می‌شود که مقدار انرژی آزاد اتصال (ΔG) محاسبه‌شده برای Neratinib کمتر از سایر مهارکننده‌ها است، که به معنای اتصال قوی‌تر و پایداری بیشتر کمپلکس EGFR-Neratinib در مقایسه با دیگر کمپلکس‌ها است.

۷-۲-۳ MMPBSA Binding Energy Analysis

مقادیر تخمینی انرژی آزاد اتصال (ΔG) برای کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند با استفاده از روش MMPBSA در بازه زمانی ۶۰ تا ۸۰ نانوثانیه و در ۸۱ فریم محاسبه شده است. این مقادیر ΔG تخمینی برای کمپلکس‌های EGFR در جدول ۱ آورده شده است. این داده‌ها به بررسی و مقایسه پایداری و تمایل اتصال لیگاندها به EGFR کمک کرده و اطلاعات ارزشمندی برای ارزیابی کارایی مهارکننده‌ها در تعامل با EGFR فراهم می‌کنند.

جدول ۱ نتایج آنالیز MMPBSA که بر حسب kJ/mol می‌باشند.

Complex	Average Binding Energy (kJ/mol)
EGFR-Afatinib	-46 +/- 14.9
EGFR-Canertinib	-37 +/- 42.2
EGFR-Dacomitinib	-59 +/- 16.5
EGFR-Neratinib	-99 +/- 15.2
EGFR-Poziotinib	-71 +/- 16.3

and M. Muchtaridi, "A systematic review: Molecular docking simulation of small molecules as anticancer non-small cell lung carcinoma drug candidates," © 2022 *J. Adv. Pharm. Technol. Res. | Publ. by Wolters Kluwer-Medknow*, 2022, doi: 10.4103/japtr.japtr_311_21.

[2] Y. Tian *et al.*, "Identification and expression analysis of 26 oncogenes of the receptor tyrosine kinase family in channel catfish after bacterial infection and hypoxic stress," *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics*, vol. 14, pp. 16–25, 2015, doi: 10.1016/J.CBD.2015.02.001.

[3] S. Talukdar, L. Emdad, S. K. Das, and P. B. Fisher, "EGFR: An essential receptor tyrosine kinase-regulator of cancer stem cells," *Adv. Cancer Res.*, vol. 147, pp. 161–188, Jan. 2020, doi: 10.1016/BS.ACR.2020.04.003.

[4] E. Levantini, G. Maroni, M. Del Re, and D. G. Tenen, "EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers," *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 2022. doi: 10.1016/j.semcan.2022.04.002.

[5] Helga Wecker and Cornelius F. Waller, "Afatinib.pdf." 2016.

[6] M. D. Ward and D. J. Leahy, "Kinase activator-receiver preference in ErbB heterodimers is determined by intracellular regions and is not coupled to extracellular asymmetry," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 3, pp. 1570–1579, Jan. 2015, doi: 10.1074/JBC.M114.612085.

[7] K. Shi *et al.*, "Emerging strategies to overcome resistance to third-generation EGFR inhibitors," *J. Hematol. Oncol.* 2022 151, vol.

۴- بحث

در این مطالعه، تأثیر مهارکننده‌های نسل دوم EGFR، شامل Afatinib، Dacomitinib و Neratinib و کاندیداهای دارویی Canertinib و Poziotinib، بر پایداری و تحایل اتصال آن‌ها به EGFR نوع وحشی مورد ارزیابی قرار گرفت. تحلیل‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) و پارامترهای مختلفی مانند Rg، RMSD، نشان دادند که مهارکننده Neratinib از پایداری بالاتری برخوردار است. همچنین، نتایج تحلیل MMPBSA مشخص کرد که Neratinib با کمترین انرژی آزاد اتصال (ΔG)، تحایل اتصال بسیار بیشتری به EGFR در مقایسه با سایر مهارکننده‌ها دارد.

پایداری بالا و تعداد بیشتر پیوندهای هیدروژنی در کمپلکس EGFR–Neratinib، همراه با نتایج تحلیل مؤلفه اصلی (PCA)، نشان دادند که این مهارکننده نه تنها اتصال قوی‌تری دارد، بلکه تغییرات ساختاری کمتری نیز در طول شبیه‌سازی ایجاد می‌کند. به طور کلی، نتایج به دست آمده بیانگر این است که Neratinib به عنوان قوی ترین مهارکننده در بین مهارکننده‌های نسل دوم مورد بررسی شناخته می‌شود و می‌تواند گزینه مناسبی برای توسعه درمان‌های هدفمند و ترکیبی علیه EGFR باشد.

۵- منابع

[1] S. Hidayat, F. Maulana Ibrahim, C. Suhandi,

- 10.1002/cam4.3635.
- [15] J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli, "AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 61, no. 8, pp. 3891–3898, Aug. 2021, doi: 10.1021/ACS.JCIM.1C00203/SUPPL_FILE/C1I00203_SI_002.ZIP.
- [16] D. S. Wishart *et al.*, "DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, pp. 901–906, 2008, doi: 10.1093/nar/gkm958.
- [17] "Chemistry Software, HyperChem, Molecular Modeling." <http://www.hypercubeusa.com/> (accessed Jan. 24, 2024).
- [18] O. Trott and A. J. Olson, "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading," *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, p. 455, Jan. 2010, doi: 10.1002/JCC.21334.
- [19] "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 4.6 Schrödinger, LLC." <https://pymol.org/2/> (accessed Jan. 27, 2024).
- [20] "RCSB PDB: Homepage." <https://www.rcsb.org/> (accessed Jan. 25, 2024).
- [21] S. A. Hollingsworth and R. O. Dror, "Molecular Dynamics Simulation for All," *Neuron*, vol. 99, no. 6, pp. 1129–1143, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.NEURON.2018.08.011.
- [22] "GROMACS 2024.2 Manual", doi: 10.5281/ZENODO.11148638.
- [23] M. S. Valdés-Tresanco, M. E. Valdés-Tresanco, P. A. Valiente, and E. Moreno, "Gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 17, no. 10, pp. 6281–6291, Oct. 2021, doi: 10.1021/ACS.JCTC.1C00645/SUPPL_FILE/C1I00645_SI_001.PDF.
- [24] B. R. Miller, T. D. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, and A. E. Roitberg, "MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 8, no. 9, pp. 3314–3321, Sep. 2012, doi: 10.1021/CT300418H.
- 15, no. 1, pp. 1–44, Jul. 2022, doi: 10.1186/S13045-022-01311-6.
- [8] V. Assadollahi, B. Rashidieh, M. Alasvand, A. Abdolahi, and J. A. Lopez, "Interaction and molecular dynamics simulation study of Osimertinib (AstraZeneca 9291) anticancer drug with the EGFR kinase domain in native protein and mutated L844V and C797S," *J. Cell. Biochem.*, vol. 120, no. 8, pp. 13046–13055, Aug. 2019, doi: 10.1002/jcb.28575.
- [9] M. A. Mansour, A. M. AboulMagd, S. H. Abbas, H. M. Abdel-Rahman, and M. Abdel-Aziz, "Insights into fourth generation selective inhibitors of (C797S) EGFR mutation combating non-small cell lung cancer resistance: a critical review," *RSC Adv.*, vol. 13, no. 27, pp. 18825–18853, 2023, doi: 10.1039/d3ra02347h.
- [10] H. Wecker and C. F. Waller, "Afatinib," *Recent Results Cancer Res.*, vol. 211, pp. 199–215, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-91442-8_14.
- [11] T. E. Stinchcombe, "The Use of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR Wild-Type Non-Small-Cell Lung Cancer," *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 17, no. 4, Apr. 2016, doi: 10.1007/S11864-016-0394-4.
- [12] W. Y. Hung *et al.*, "Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2 Retards Non-Small Cell Lung Cancer Progression Through Antagonizing MET and EGFR Activities," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 51, no. 1, pp. 337–355, Nov. 2018, doi: 10.1159/000495233.
- [13] B. Dai *et al.*, "Exogenous Restoration of TUSC2 Expression Induces Responsiveness to Erlotinib in Wildtype Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Lung Cancer Cells through Context Specific Pathways Resulting in Enhanced Therapeutic Efficacy," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, Jun. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0123967.
- [14] B. Kim, Y. S. Park, and Y. H. Kim, "Clathrin-mediated EGFR endocytosis as a potential therapeutic strategy for overcoming primary resistance of EGFR TKI in wild-type EGFR non-small cell lung cancer," no. May 2020, pp. 372–385, 2021, doi:

Molecular Stability Assessment of Second-Generation EGFR Inhibitors in Interaction with Wild-Type Protein: A Molecular Dynamics Simulation Study

Sayed Sadegh Mohammadi Mousavi¹ Seyed Shahriar Arab^{2*}

1. Master's degree, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

sh.arab@modares.ac.ir

Receipt: 2024/10/21

Accepted: 2025/06/02

Abstract

In this study, the effects of second-generation EGFR inhibitors, including Afatinib, Dacomitinib, and Neratinib, as well as the candidate drugs Canertinib and Poziotinib, on wild-type EGFR were investigated using molecular dynamics (MD) simulations. The parameters such as RMSD, radius of gyration (Rg), SASA, and hydrogen bonds were calculated to evaluate the stability of the protein-ligand complex. The results of the MMPBSA analysis showed that Neratinib, with the lowest free energy of binding (ΔG), has a higher binding affinity to EGFR and demonstrated greater stability during the simulation. Also, the principal component analysis (PCA) showed that the EGFR-Neratinib complex has less dynamics and occupies less phase space, which indicates more stability of this complex.

These results show that of all the compounds studied, Neratinib may be the most potent and promising candidate in advancing combination therapies against EGFR.

Keywords: EGFR Wild-Type, Second-Generation EGFR Inhibitors, Molecular Dynamics Simulation, MMPBSA Analysis, Neratinib