

بررسی تعاملات مولکولی و پایداری ساختاری مهارکننده‌های تیروزین کیناز ALK: 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

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۲

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۷

چکیده

کیناز لنفوم آناپلاستیک (ALK) یکی از اهداف مهم در درمان سرطان، به ویژه سرطان ریه غیرکوچک (NSCLC) با بازآرایی ژنی است. در این پژوهش، به بررسی و مقایسه اثرات سه مهارکننده تیروزین کیناز (TKI) شامل Crizotinib، Ceritinib و Alectinib بر دومین تیروزین کیناز ALK با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) پرداخته شد. از تجزیه و تحلیل های مختلفی نظیر RMSD، شعاع ژیراسیون (RG)، سطح قابل دسترس حلال (SASA)، تعداد پیوند هیدروژنی (Hbond)، تجزیه تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) و MMPBSA در این مطالعه استفاده شد. شبیه سازی دینامیک مولکولی به مدت ۱۰۰ نانوثانیه نشان داد که Alectinib منجر به پایداری ساختاری، و کاهش سطح قابل دسترس حلال (SASA) در مقایسه با Crizotinib و Ceritinib و فشردگی بیشتر پروتئین می شود. همچنین، نتایج MMPBSA بیانگر انرژی آزاد اتصال کمتر و تمایل اتصال بالاتر Alectinib به ALK بود که اثربخشی آن را تقویت می کند. استفاده از Alectinib به دلیل توانایی بالا در عبور از سد خونی-مغزی و تأثیر بر متاستازهای مغزی، می تواند موجب بهبود اثربخشی درمان و کاهش مقاومت دارویی شود. این نتایج و یافته نشان می دهد که Alectinib می تواند گزینه ای برای خط اول درمان باشد.

کلید واژگان: کیناز لنفوم آناپلاستیک (ALK)، مهارکننده تیروزین کیناز (TKI)، شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD)، Alectinib، MMPBSA.

کپی رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه ای کپی، بازنشر 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

کینوم سرطان شامل بیش از ۵۰۰ پروتئین کیناز است، یک هدف قدرتمند برای درمان سرطان است که تعداد کمی از آنها فعالیت درمانی دارند [۱].

گیرنده های تیروزین کیناز نقش مهمی در سیگنالینگ سلولی دارند. کیناز لنگوم آناپلاستیک (ALK)، گیرنده بسیار حفاظت شده در ابر خانواده گیرنده انسولین است که برای توسعه و عملکرد سیستم عصبی ضروری است، در سال ۱۹۹۴ شناسایی شد. ALK از یک دومین خارج سلولی، یک ناحیه گذر غشایی و یک دومین تیروزین کیناز درون سلولی تشکیل شده است. زمانی که لیگاند مانند هپارین به دومین خارج سلولی متصل می شود آن را فعال و منجر به دایمر شدن و اتوفسفوریلاسیون و آغاز آبشار سیگنالینگ درون سلول که برای تکثیر، بقا و تمایز سلولی حیاتی اند، مانند مسیرهای JAK-STAT، MAPK، و PI3K/AKT می شود [۲-۴].

سرطان ریه غیرکوچک (NSCLC) عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان است. جهش های نقطه ای ALK و همجوشی ژن EML4-anaplastic lymphoma kinase (ALK) با فعال سازی بیش از حد دومین تیروزین کیناز ALK سرطان زایی را ترویج می کند. در سال ۲۰۰۷ در بیماران NSCLC ژن ترکیبی EML4-ALK گزارش شد که هدف جدیدی در جهت درمان NSCLC معرفی شد [۵-۷] و [۲].

پروتئین فیوژن EML4-ALK در دیگر سرطان ها، مانند سرطان سینه نیز شناسایی شده است. تا به امروز ۱۵ نوع از پروتئین فیوژن EML4-ALK شناسایی شده است. در همه ی آنها دومین تیروزین کیناز ALK می باشد ولی در نقطه همجوشی با ژن EML4 متفاوت هستند [۸].

در حضور شرکای همجوشی، پروتئین های همجوشی ALK منجر به دایمریزاسیون مستقل از لیگاند و در نتیجه فعال سازی مداوم گیرنده می شود [۹].

پروتئین طبیعی دارای حوزه های خارج سلولی و ترانس غشایی است اما پروتئین های ALK بازآرایی شده درون سلولی هستند و فاقد ناحیه گذر غشایی هستند و به غشای پلاسمایی متصل نیستند [۴ و ۲].

۱-۱ مهارکننده های ALK

در دهه اخیر، استراتژی های درمانی به سمت شخصی سازی درمان، با هدف بهبود اثربخشی و کاهش عوارض جانبی، متمرکز شده اند. این درمان ها به طور هدفمند مولکول های مرتبط با رشد و تکثیر سلول های توموری را هدف قرار می دهند [۱].

Crizotinib، نخستین مهارکننده ALK تأیید شده توسط FDA، با جلوگیری از اتصال ATP به ALK و مهار اتوفسفوریلاسیون آن عمل می کند. این دارو در درمان NSCLC نتایجی بهتر از شیمی درمانی نشان داده است که آپوپتوز سلولی را تحریک می کند. از عوارض شایع آن می توان به اختلال بینایی و اسهال اشاره کرد [۴].

با این حال، اکثر بیمارانی که با Crizotinib درمان می شوند، ظرف یک سال به دلیل نفوذ ضعیف به سیستم عصبی مرکزی (CNS) و یا مقاومت اکتسابی با پیشرفت بیماری مواجه می شوند [۶].

Ceritinib یکی از مهارکننده هاست که توسط سازمان FDA برای درمان NSCLC تأیید شده است. عوارض جانبی Ceritinib شامل افزایش سه برابری آنزیم های مرتبط با مسمومیت کبدی، اسهال، تهوع، استفراغ می باشد [۱۱ و ۴].

Alectinib که در سال ۲۰۱۵ توسط سازمان FDA تأیید شد، برای بیماران مبتلا به NSCLC طراحی شده که به Crizotinib مقاوم شده اند یا نمی توانند آن را تحمل کنند. این دارو به طور انتخابی و خاص ALK را مهار می کند. هدف اصلی Alectinib، مهار اتوفسفوریلاسیون ALK است، که در NSCLC دارای EML4-ALK می باشد [۴].

Alectinib یک مهار کننده تیروزین کیناز ALK قوی و بسیار انتخابی است که به CNS نفوذ می کند و فعالیت بالایی را در برابر تومورهای داخل جمجمه نشان می دهد. که برای بیماران مبتلا به متاستازهای مغزی در NSCLC اهمیت ویژه ای دارد [۴ و ۱۲].

عوارض جانبی مربوط به Alectinib قابل کنترل است و شایع ترین آن ها کم خونی، افزایش بیلی روبین خون و افزایش وزن می باشد. از نظر عوارض جانبی، Alectinib بهترین رتبه ایمنی را برای عوارض جانبی داشت، و پس از آن Crizotinib و Ceritinib قرار گرفتند [۱۱ و ۱۶].

همه ALK-TKI ها به صورت خوراکی تجویز می شوند که باعث انعطاف پذیری و راحتی تجویز می شود و کیفیت زندگی را بهبود می بخشد [۱۳].

۲-۱ درمان ترکیبی

در درمان ترکیبی استفاده همزمان چندین روش درمانی باعث افزایش PFS می شود. ترکیبی از ALK-TKI با شیمی درمانی، رادیوتراپی و یا مهارکننده های EGFR موجب غلبه بر مقاومت و همچنین درمان موثرتری می شود [۳، ۹ و ۱۴].

۳-۱ مکانیسم های مقاومت در برابر مهارکننده های ALK
تحت فشار دارویی، سلول های سرطانی با تکامل دارویی، مکانیزم های مقاومتی بی پایانی ایجاد می کنند که به پیشرفت بیماری کمک می کند. در درمان سرطان ریه با مهارکننده های ALK، اکثر بیماران در نهایت به دلیل ایجاد مقاومت دارویی با پیشرفت بیماری مواجه می شوند [۳ و ۱۵].

مقاومت اکتسابی زمانی رخ می دهد که سلول های تومور که در ابتدا به درمان حساس بودند، مکانیزم هایی را برای مقاومت توسعه می دهند. این مقاومت از طریق مسیرهای مختلفی ظاهر می شود و چالشی اساسی در درمان هدفمند ایجاد می کند [۱۰].

مکانیسم های مقاومت به دو دسته ی وابسته به ALK و مستقل از ALK تقسیم می شوند. مکانیسم های مقاومت وابسته به ALK، شامل تقویت ALK و جهش در ALK است [۴ و ۵].

مکانیسم های مقاومت مستقل از ALK شامل فعال شدن مسیرهای سیگنال دهی جایگزین است. که به آن مقاومت ناشی از سیگنال جایگزین می گویند. در مورد ALK، فعال سازی مسیرهای سیگنال دهی از طریق EGFR، HER2 و HER3 بدون جهش های ثانویه ALK مشاهده شده است [۴ و ۵].

Crizotinib هم به عنوان در مان خط اول و هم به عنوان درمان خط بعدی در بیمارانی که قبلاً با Crizotinib درمان نشده اند توصیه می شود. با این حال، مشخص شده است که بیماران مبتلا به NSCLC که درمان Crizotinib را دریافت می کنند، طی یک یا دو سال پس از درمان عود می کنند مکانیسم مقاومت به Crizotinib به دو صورت تقویت ALK و فعال شدن مسیرهای جایگزین در بیماران مشاهده شده است. همچنین، همانند Crizotinib، فعال شدن مسیرهای جایگزین در بیماران و مدل های پیش بالینی که به Ceritinib و Alectinib مقاوم هستند، مشاهده شده است [۹ و ۱۲].

به دلیل ایجاد مقاومت برخی در دستیابی به درمان مورد انتظار شکست خورده اند و به دلیل بیماری پیشرونده زودهنگام نیاز به کاهش مدت زمان درمان داشته اند. انتقال قوی ترین بازدارنده ALK به خط اول ممکن است ظهور مقاومت روی هدف را سرکوب کرده یا به تاخیر بیاندازد و مدت زمان پاسخ را طولانی تر کند [۲ و ۱۶].

هیچ نتیجه گیری قطعی در مورد توالی درمان وجود ندارد و تحقیقات بیشتری مورد نیاز است [۵ و ۱۲].

بدین منظور در این پژوهش اثر گذاری سه مهارکننده ی ALK را بر روی دومین تیروزین کیناز ALK با استفاده از

ابزارهای بیوانفورماتیکی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی و مقایسه می‌کنیم.

۲- مواد و روش‌ها

این مطالعه با استفاده از سیستم محاسباتی ۳۲ هسته‌ای پردازشی با ۲ ترابایت فضای ذخیره‌سازی انجام شد. در این پژوهش از ابزارهای مختلفی، مانند Hyperchem برای بهینه‌سازی ساختار داروها، نرم‌افزارهای YASARA و PyMol برای مطالعه ساختارهای مولکولی و همچنین وب سرورهای آنلاین مانند NCBI، RCSB، پایگاه داده DrugBank برای بازیابی و ارزیابی داده‌ها استفاده شد.

۲-۱ داکینگ مولکولی

ساختار داروها که از پایگاه داده‌ی DrugBank و RCSB به دست آمد با استفاده از Hyperchem بهینه‌سازی شدند و برای داکینگ مولکولی آماده شدند. ساختار دومین تیروزین کیناز ALK (ALK-TD) موجود در پایگاه داده‌ی RCSB دارای گپ‌ها و رزجیوهای از دست رفته متعدد بودند. به همین دلیل از ساختار آلفا فولد که در پایگاه داده Uniprot معرفی شده بود، برای داکینگ استفاده شد [۲۰-۱۷]. داکینگ مولکولی با استفاده از نرم‌افزار متن باز Vina به صورت Blind و با پنج مرتبه تکرار انجام شد، تا محل مناسب اتصال دارو و ALK-TD شناسایی شود. نتایج داکینگ با اطلاعات موجود که محل اتصال مهارکننده‌ها را در جایگاه اتصال ALK-ATP نشان می‌دهند، مطابقت داشت [۲۱-۲۲].

۲-۲ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) برای پیش‌بینی حرکت هر اتم در طول زمان در سیستم‌های مولکولی به کار می‌رود که براساس مدل‌های فیزیکی و تعاملات بین اتم‌ها انجام می‌شود. MD فرایندهای زیست مولکولی مانند تغییرات ساختاری و اتصال لیگاند را به تصویر می‌کشد.

MD بر روی پروتئین ALK به تنهایی و همراه با مهارکننده‌های Crizotinib، Ceritinib و Alectinib انجام شد. دمای این شبیه‌سازی‌ها مانند دمای بدن ۳۱۰ کلوین و با غلظت فیزیولوژیکی ۰٫۱ مولار تنظیم شد. MD با استفاده از نرم‌افزار متن باز GROMACS 2022.6 و تولید توپولوژی‌های لازم و پارامترهای میدان نیرو با استفاده از وب سرور CGENFF انجام شد. در ادامه فایل کمپلکس تشکیل شد و پارامترهای ضروری در توپولوژی سیستم درج شد [۲۳].

این شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با هدف بررسی پایداری و رفتار دینامیک مولکولی کمپلکس‌های ALK-TKIs انجام شد تا به درک عمیق‌تری از تعامل مهارکننده‌ها با ALK برسیم. کمپلکس‌های ALK-Crizotinib، ALK-Ceritinib و ALK-Alectinib و پروتئین ALK در یک جعبه‌ی دوازده‌وجهی که با مولکول‌های آب از مدل TIP3P^۱ پر شده بود، قرار داده شدند. برای ایجاد شرایط مرزی، لبه جعبه در فاصله ۱ نانومتری از محیط مولکول تنظیم شد.

بارهای کمپلکس‌ها با افزودن یون‌ها Na⁺ و Cl⁻ در غلظت فیزیولوژیکی (۰٫۱ مولار) تنظیم شدند. از گروه‌های انرژی^۲ برای بررسی برهمکنش‌های بین ALK و ترکیبات استفاده شد و روش مش ذره‌ای والد (PME) برای محاسبه برهمکنش‌های الکتروستاتیکی به کار گرفته شد. سپس، سیستم MD با استفاده از روش تندترین فرود^۳ تا ۱۵۰۰ پله به حداقل انرژی رسید. دما نیز از ۲۸۰ تا ۳۱۰ کلوین (دمای بدن) در طول دوره تعادل ۱۰۰ پیکوثانیه تحت شرایط مرزی دوره‌ای و در حجم ثابت افزایش یافت تا سیستم به حالت پایدار برسد.

در مرحله تعادل، دو مرحله ثابت شامل مجموعه NVT (تعداد ذرات، حجم و دما) و مجموعه NPT (تعداد ذرات،

^۳ steepest descent

^۱ Transferable Intermolecular Potential 3P

^۲ energygrps

۳-۱ داکینگ مولکولی

برای تعیین بهترین محل اتصال هر مولکول، داکینگ مولکولی با پروتئین ALK پنج مرتبه تکرار شد. نتایج این فرایند در فایل های log و output که شامل امتیازهای میل ترکیبی و محل های اتصال برای هر ترکیب هستند، ثبت شد. سپس، نتایج به دست آمده از پنج مرتبه تکرار داکینگ مولکولی با پروتئین ALK با استفاده از نرم افزار PyMol به صورت گرافیکی نمایش داده شد. محل اتصال مهارکننده ها در هر پنج تکرار با داده های موجود از محل اتصال مطابقت داشت.

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 کل زمان شبیه سازی بود. این تحلیل ها با هدف ارزیابی پایداری و رفتار ساختاری سیستم در طول شبیه سازی انجام شدند. برای انجام سایر آنالیزها، ۳۰ نانوثانیه پایانی که سیستم در حالت تعادل بوده است، به طور خاص برای بررسی دقیق تر و ارزیابی رفتار پایدار سیستم استفاده شد.

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

اتصال مهارکننده ها به دومین تیروزین کیناز ممکن است باعث بروز تغییرات ساختاری در پروتئین شود. محاسبه ی انحراف میانگین مربع ریشه (RMSD) برای تعیین پایداری ساختار در طول شبیه سازی استفاده می شود. در تمام کمپلکس ها و پروتئین ALK نوساناتی در آنالیز RMSD پروتئین مشاهده می شود که این نوسانات عمدتاً در حدود ۰٫۱ نانومتر می باشد که طبیعی است. اتصال مهارکننده ها به ALK-TD باعث افزایش پایداری ساختاری و کاهش نوسانات RMSD در ۳۰ نانوثانیه پایانی شده است. از ۷۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه به عنوان نمونه برای انجام سایر آنالیزها مشخص شد (شکل ۱A). RMSD اتم های سنگین لیگاند با پروتئین نشان می دهد که Ceritinib نوسانات و تغییرات

فشار و دما) به مدت ۱۰۰ پیکوثانیه انجام شدند. سپس، در مرحله تولید نهایی که ۱۰۰ نانوثانیه به طول انجامید، دما به ۳۱۰ کلوین رسید. برای تجزیه و تحلیل مسیرهای دینامیک مولکولی (MD) از آنالیزهای rmsd و gyrate برای کل زمان شبیه سازی و از آنالیزهای covar، hbond، rmsf، anaig و sasa در بازه تعادل ۷۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه بهره گرفته شد. مدل های سه بعدی به دست آمده نیز با استفاده از نرم افزار PyMOL به صورت گرافیکی نمایش داده شدند [۲۴].

۳-۲ محاسبه MMPBSA

روش مکانیک مولکولی مساحت سطح پوا سون بولتزمن (MMPBSA) به عنوان یک رویکرد محاسباتی مؤثر شناخته می شود که برای بازتولید و تبیین یافته های تجربی و همچنین بهبود نتایج در پیش بینی های غربالگری مجازی و برهم کنش های مولکولی استفاده می شود. برای تخمین انرژی های آزاد اتصال با استفاده از روش MMPBSA، از یک مسیر کوتاه شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) در بازه زمانی پایدار ۷۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه برای هر سیستم انتخاب شد. سپس، انرژی های اتصال از طریق روش ها MMPBSA و با استفاده از بسته نرم افزاری g_mmpbsa محاسبه شد. این انرژی اتصال با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

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

ΔG_{binding}: انرژی اتصال

G_{complex} : انرژی کل مجموعه پروتئین-لیگاند

G_{receptor} : انرژی پروتئین بدون لیگاند

G_{ligand} : انرژی لیگاند بدون پروتئین

این محاسبات به درک بهتر تعاملات مولکولی کمک کرده و فرایندهای غربالگری مجازی را بهینه می کند [۲۵ و ۲۶].

۱-نتایج

در این پژوهش، با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، مقایسه ای بین این سه مهارکننده برای ارزیابی تأثیر آنها بر ALK انجام می شود.

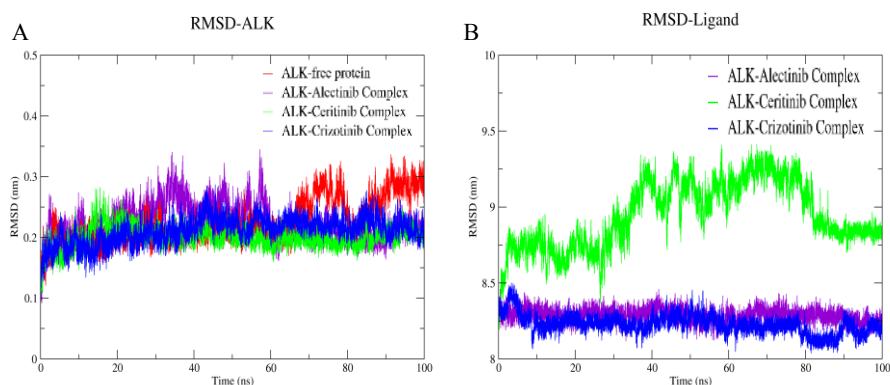
مکانی زیادی در جایگاه اتصال خود دارد اما سایر مهارکننده‌ها در طول زمان شبیه‌سازی وضعیت اتصال خود را حفظ کرده‌اند (شکل 1B).

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

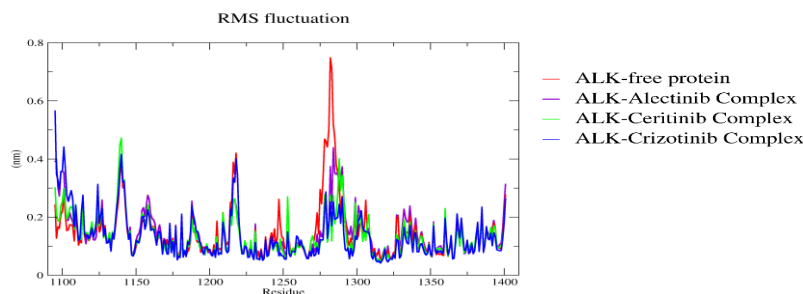
نوسان ریشه میانگین مربع (RMSF) برای میانگین نوسان تمام رزیدوها در طول شبیه‌سازی در کمپلکس‌ها به‌عنوان تابعی از رزیدوها محاسبه شد. RMSF در بازه تعادل ۷۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه سنجیده شد. میانگین مقادیر RMSF برای پروتئین ALK و کمپلکس‌های ALK در اتصال با Crizotinib، Ceritinib و Alectinib به‌ترتیب با: $0.09 \pm$ ، 0.13 ± 0.08 نانومتر، 0.13 ± 0.07 نانومتر، و 0.14 ± 0.08 نانومتر برابر است.

۳-۲-۳ Radius of gyration (Rg)

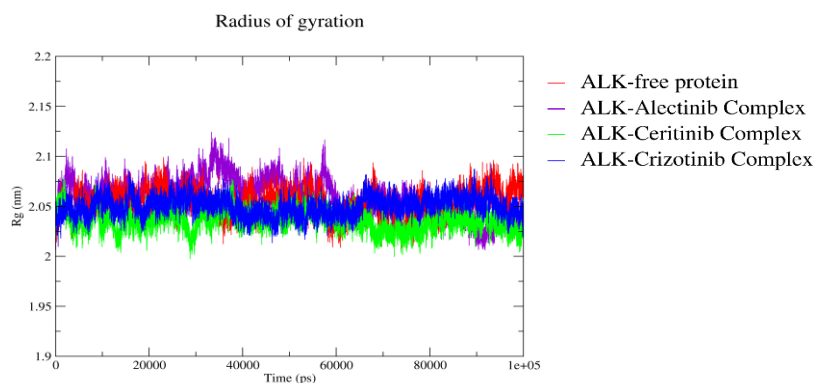
شعاع ژیراسیون (Rg) برای اندازه‌گیری و مقایسه حجم ساختار سوم پروتئین و همچنین برای ارزیابی پایداری پروتئین در یک سیستم بیولوژیکی استفاده می‌شود. تغییرات شعاع ژیراسیون پروتئین در تمام شبیه‌سازی‌ها در طول کل زمان شبیه‌سازی کمتر از یک آنگستروم می‌باشد که نشان می‌دهد سیستم به تعادل رسیده است (شکل ۳).



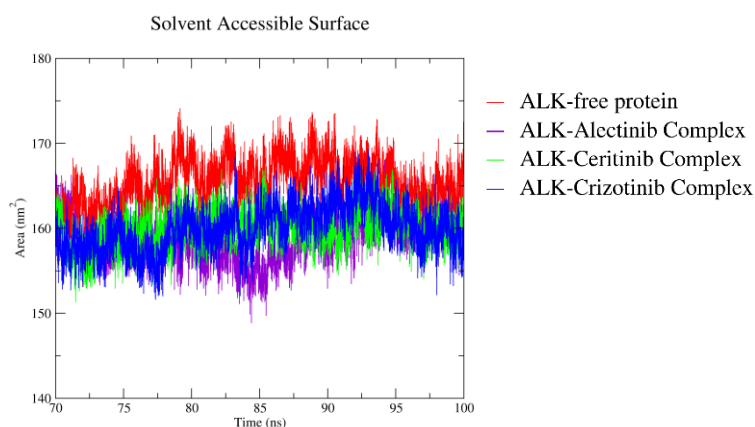
شکل ۱ (A) RMSD پروتئین. (B) RMSD لیگاند



شکل ۲ RMSF پروتئین تابعی از رزیدوها.



شکل ۳ نمودار تغییرات شعاع پروتئین در طی شبیه سازی دینامیک مولکولی.



شکل ۴ سطح قابل دسترس حلال (SASA)

است. پروتئین ALK بدون لیگاند بیشترین تعامل را با حلال دارد. این نتایج نشان می‌دهد Alectinib باعث بیشترین فشردگی در ALK در مقایسه با دیگر مهارکننده ها می‌شود (شکل ۴).

Hydrogen Bonds Analysis ۳-۲-۵

پیوندهای هیدروژنی در فاصله ۰/۳۵ نانومتر بین ALK و لیگاند های مختلف در یک محیط حلال، در طول بازه تعادل ۷۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه از شبیه سازی دینامیک مولکولی برای ارزیابی پایداری کمپلکس‌های متصل محاسبه شدند. نتایج نشان می‌دهند که مهارکننده های Ceritinib و

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

سطح قابل دسترس حلال (SASA) به‌عنوان سطحی از پروتئین تعریف می‌شود که با مولکول‌های حلال در تعامل است. میانگین مقادیر SASA برای پروتئین ALK و کمپلکس‌های ALK در اتصال با Ceritinib، Crizotinib و Alectinib به‌ترتیب برابر است با: $165 \pm 2/8$ نانومتر مربع، $160 \pm 2/2$ نانومتر مربع، و $159 \pm 2/7$ نانومتر مربع.

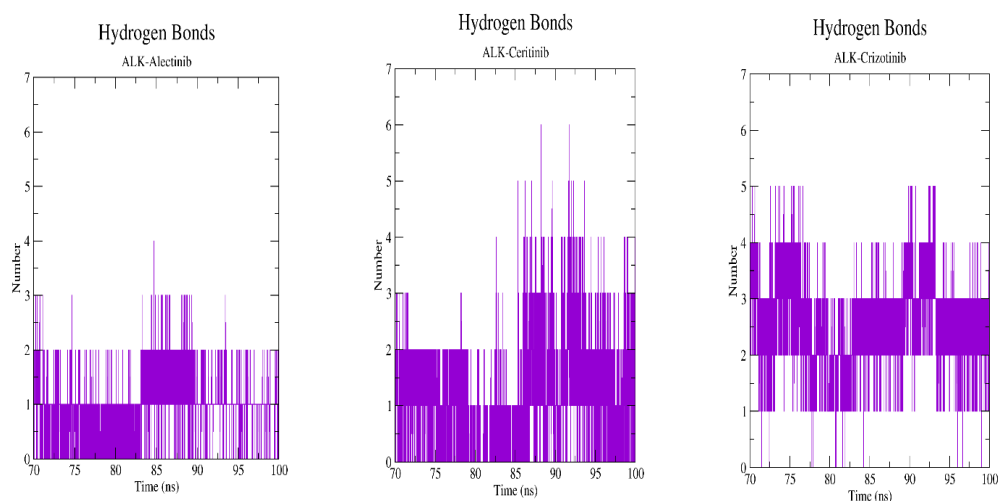
میانگین مقدار SASA برای ALK در اتصال با Alectinib کمترین مقدار و برای Crizotinib و Ceritinib بیشتر

داده‌ها توسط تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) منجر شد. نمایش تغییرات کلی پروتئین در طول شبیه‌سازی توسط PCA به درک بهتر رفتار پویای پروتئین کمک می‌کند. از ابزارهای covar و anaeig، در بازه تعادلی ۷۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه، به ترتیب برای بدست آوردن مقادیر ویژه^۱ و پیش‌بینی دوبعدی مسیرها برای پروتئین در تمام سیستم‌های شبیه‌سازی انجام شده، استفاده شد (شکل ۶).

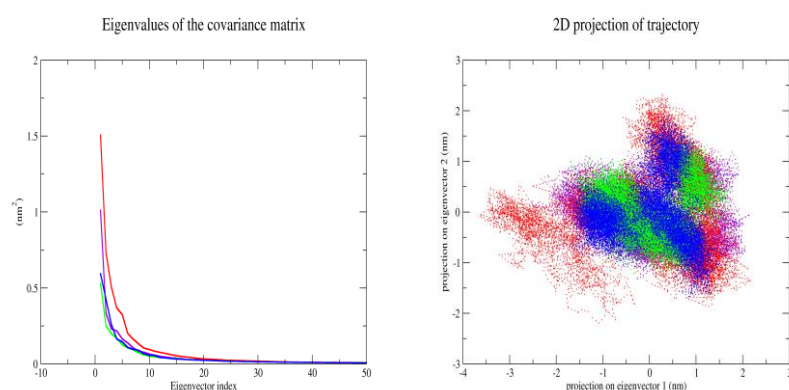
Crizotinib هر کدام با ۵ پیوند هیدروژنی و Alectinib با ۳ تا ۴ پیوند هیدروژنی به جایگاه فعال ALK متصل شده‌اند. این نتایج نشان‌دهنده پایداری بیشتر کمپلکس‌های Ceritinib و Crizotinib در مقایسه با Alectinib است (شکل ۵).

۳-۲-۶ Principal Component Analysis

استخراج غالب حرکات جمعی اتم‌های Ca پروتئین از مسیر شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به کاهش پیچیدگی



شکل ۳: تعداد پیوند هیدروژنی بین پروتئین و مهارکننده‌ها در جایگاه فعال ALK.



شکل ۶: تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA). (A) مقادیر ویژه (eigenvalue): (B) پیش‌بینی دوبعدی مسیرهای دینامیک.

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

کمپلکس	Average Binding Energy (kJ/mol)
ALK-Crizotinib	-۱۷ +/- ۱/۹
ALK-Ceritinib	-۱۸ +/- ۴/۳
ALK-Alectinib	-۲۴ +/- ۱/۵

همچنین، نتایج MMPBSA تمایل بسیار بالا، نسبت به دیگر مهارکننده‌ها، به پروتئین را نشان می‌دهد. Alectinib که یک مهارکننده‌ی بسیار انتخابی است با نفوذ موثر بر CNS باعث افزایش جریان سد خونی مغزی می‌شود [۲۷]. با توجه به این نتایج و یافته‌ها و تمایل زیاد Alectinib به ALK-TD شاید بتوان Alectinib را به‌عنوان خط اول درمان انتخاب کرد.

۵- منابع

- [1] R. D. Jawarkar *et al.*, "QSAR, Molecular Docking, MD Simulation and MMGBSA Calculations Approaches to Recognize Concealed Pharmacophoric Features Requisite for the Optimization of ALK Tyrosine Kinase Inhibitors as Anticancer Leads," *Molecules*, vol. 27, no. 15, 2022. doi: 10.3390/molecules27154951.
- [2] J. L. Schneider, J. J. Lin, and A. T. Shaw, "ALK-positive lung cancer: a moving target," *Nature Cancer*, vol. 4, no. 3, pp. 330–343, 2023. doi: 10.1038/s43018-023-00515-0.
- [3] A. Desai and C. M. Lovly, "Strategies to overcome resistance to ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: a narrative review," *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 615–628, 2023, doi: 10.21037/TLCR-22-708/COIF).
- [4] K. Kielbowski, J. Żychowska, and R. Becht, "Anaplastic lymphoma kinase inhibitors—a review of anticancer properties, clinical efficacy, and resistance mechanisms," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 14, 2023. doi: 10.3389/fphar.2023.1285374.
- [5] T. Fukui, M. Tachihara, T. Nagano, and K. Kobayashi, "Review of Therapeutic Strategies for Anaplastic Lymphoma Kinase-Rearranged

۷-۲-۳ MMPBSA Binding Energy Analysis

با استفاده از روش MMPBSA مقادیر تخمینی انرژی آزاد اتصال (ΔG) برای کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند در بازه زمانی ۷۰ تا ۱۰۰ نانوثانیه با فاصله ۵۰ گام و در ۱۲۱ فریم محاسبه شده است که نتیجه‌ی آن در جدول ۱ گزارش شده است. این داده‌ها به بررسی و مقایسه پایداری و تمایل اتصال لیگاندها به ALK کمک می‌کنند و اطلاعات ارزشمندی برای ارزیابی کارایی این مهارکننده‌ها در تعامل با ALK ارائه می‌دهند. نتایج آنالیز MMPBSA نشان می‌دهد انرژی آزاد اتصال (ΔG) محاسبه‌شده برای Alectinib نسبت به دیگر مهارکننده‌ها کمتر است، که به معنای اتصال قوی‌تر و پایداری بیشتر این کمپلکس در مقایسه با کمپلکس‌های دیگر می‌باشد.

۴- بحث

در این مطالعه به پروتئین ALK و نقش آن در سرطان پرداخته شد و مقایسه‌ای بین سه مهارکننده‌ی آن با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) با Gromacs 2022.6 انجام شد. استفاده از مهارکننده‌ای با اثر بیشتر در خط اول درمان می‌تواند از بروز بسیاری از مشکلات مانند مقاومت دارویی پیشگیری کند یا آن را به تعویق بیندازد [۲].

در این پژوهش نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان داد که اتصال Alectinib باعث پایداری و فشردگی بیشتر پروتئین می‌شود. Alectinib در طول زمان شبیه‌سازی اتصال خود را به دومین تیروزین کیناز حفظ کرده است.

- (NSCLC): A Clinical and Preclinical Overview,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 10, May 2021, doi: 10.3390/CANCERS13102394.
- [15] F. Tabbò, M. L. Reale, P. Bironzo, and G. V. Scagliotti, “Resistance to anaplastic lymphoma kinase inhibitors: knowing the enemy is half the battle won,” *Transl. lung cancer Res.*, vol. 9, no. 6, pp. 2545–2556, Dec. 2020, doi: 10.21037/TLCR-20-372.
- [16] M. Herrera-Juárez, C. Serrano-Gómez, H. Bote-de-Cabo, and L. Paz-Ares, “Targeted therapy for lung cancer: Beyond EGFR and ALK,” *Cancer*, vol. 129, no. 12, pp. 1803–1820, Jun. 2023, doi: 10.1002/CNCR.34757.
- [17] C. Knox *et al.*, “DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 52, no. D1, pp. D1265–D1275, Jan. 2024, doi: 10.1093/NAR/GKAD976.
- [18] T. U. Consortium *et al.*, “UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 1, no. 1256879, pp. 13–14, 2013, doi: 10.1093/NAR/GKAE1010.
- [19] “RCSB PDB: Homepage.” <https://www.rcsb.org/> (accessed Dec. 14, 2024).
- [20] J. Jumper *et al.*, “Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold,” *Nat.* 2021 5967873, vol. 596, no. 7873, pp. 583–589, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- [21] 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/C11C00203_SI_002.ZIP.
- [22] 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, pp. 455–461, Jan. 2010, doi: 10.1002/JCC.21334.
- [23] “GROMACS 2022 Manual”, doi: 10.5281/ZENODO.6103568.
- [24] Schrödinger, LLC, “The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.8,” Nov. 2015.
- [25] 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, Non-Small Cell Lung Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 5, Mar. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14051184.
- [6] Y. Luo *et al.*, “Comparative safety of anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors in advanced anaplastic lymphoma kinase-mutated non-small cell lung cancer: Systematic review and network meta-analysis,” *Lung Cancer*, vol. 184, p. 107319, Oct. 2023, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2023.107319.
- [7] C. H. Chuang *et al.*, “Systematic review and network meta-analysis of anaplastic lymphoma kinase (Alk) inhibitors for treatment-naïve alk-positive lung cancer,” *Cancers*, vol. 13, no. 8. 2021. doi: 10.3390/cancers13081966.
- [8] S. R. Sabir, S. Yeoh, G. Jackson, and R. Bayliss, “EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients,” *Cancers (Basel)*, vol. 9, no. 9, p. 118, Sep. 2017, doi: 10.3390/CANCERS9090118.
- [9] B. Golding, A. Luu, R. Jones, and A. M. Vilorio-Petit, “The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC),” *Mol. Cancer*, vol. 17, no. 1, Feb. 2018, doi: 10.1186/S12943-018-0810-4.
- [10] A. Rina *et al.*, “The Genetic Analysis and Clinical Therapy in Lung Cancer: Current Advances and Future Directions,” *Cancers*, vol. 16, no. 16. 2024. doi: 10.3390/cancers16162882.
- [11] C. Gridelli *et al.*, “Sharing Experience with Anaplastic Lymphoma Kinase Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer: An Italian Expert Panel Discussion,” *Curr. Oncol.*, vol. 30, no. 11, pp. 10033–10042, Nov. 2023, doi: 10.3390/CURRONCOL30110729.
- [12] J. Paik and S. Dhillon, “Alectinib: A Review in Advanced, ALK-Positive NSCLC,” *Drugs*, vol. 78, no. 12, pp. 1247–1257, Aug. 2018, doi: 10.1007/S40265-018-0952-0.
- [13] D. Zhao, J. Chen, M. Chu, X. Long, and J. Wang, “Pharmacokinetic-Based Drug-Drug Interactions with Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors: A Review,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 14, pp. 1663–1681, 2020, doi: 10.2147/DDDT.S249098.
- [14] D. Antoni, H. Burckel, and G. Noel, “Combining Radiation Therapy with ALK Inhibitors in Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small Cell Lung Cancer

T1C00645_SI_001.PDF.

[27] S. Gadgeel *et al.*, “Alectinib versus crizotinib in treatment-naïve anaplastic lymphoma kinase-positive (ALK+) non-small-cell lung cancer: CNS efficacy results from the ALEX study,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 29, no. 11, pp. 2214–2222, Nov. 2018, doi: 10.1093/ANNONC/MDY405.

Sep. 2012, doi: 10.1021/CT300418H.

[26] 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/C

Investigation of molecular interactions and structural stability of ALK tyrosine kinase inhibitors: A molecular dynamics simulation study

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

1. 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: 2025/01/06

Accepted: 2025/06/02

Abstract

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) is an important target in the treatment of cancer, especially non-small cell lung cancer (NSCLC) with gene rearrangements. In this study, the effects of three tyrosine kinase inhibitors (TKIs) including Crizotinib, Ceritinib, and Alectinib on the ALK tyrosine kinase domain were investigated and compared using molecular dynamics (MD) simulations. Various analyses such as RMSD, radius of gyration (RG), solvent accessible surface area (SASA), hydrogen bond number (Hbond), principal component analysis (PCA), and MMPBSA were used in this study. Molecular dynamics simulations for 100 ns showed that Alectinib resulted in structural stability, reduced solvent accessible surface area (SASA) compared to Crizotinib and Ceritinib, and greater protein compaction. MMPBSA results also indicated a lower binding free energy and higher binding affinity of Alectinib to ALK, which enhances its efficacy. The use of Alectinib, due to its high ability to cross the blood-brain barrier and its effect on brain metastases, can improve treatment efficacy and reduce drug resistance. These results and findings indicate that Alectinib can be an option for first-line treatment.

Keywords: Anaplastic lymphoma kinase (ALK), tyrosine kinase inhibitor (TKI), molecular dynamics (MD) simulations, Alectinib, MMPBSA