

پگیلاسیون هورمون رشد انسانی توسط پلی اتیلن گلیکول متوکسی سوکسینیمیدیل کربنات و بررسی نیمه عمر و پایداری آن

رضا غفاری: کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
***محمد علی نصیری خلیلی:** استادیار، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران (*نویسنده مسئول).
 manasiri@alumni.ut.ac.ir
سیروس خدادادی: استادیار، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
غلامحسین ریاضی: استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۹

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: هورمون رشد انسانی به دلیل فعالیت‌های زیستی مهم و متنوع هورمون رشد، استفاده از آن برای درمان بیماری‌های چاقی، کوتاهی قد، سوختگی و نیز اهمیت این هورمون برای ورزشکاران در حال افزایش است. امروزه نیمه عمر پایین هورمون رشد انسانی یک چالش بزرگ در ارتباط با توسعه این دارو در دنیا است. پگیلاسیون یک رویکرد موثر جهت افزایش نیمه عمر و پایداری پروتئین‌های زیست دارویی است. پلی اتیلن گلیکول (PEG-Polyethylene glycol) به دلیل انحلال پذیری بالا، به عنوان یک کاندید چند منظوره برای کانژوگاسیون پروتئین‌های دارویی در نظر گرفته می‌شود. بر این اساس، در این پژوهش به بررسی پگیلاسیون هورمون رشد انسانی و مطالعه بر روی نیمه عمر پلاسمایی آن پرداخته شده است.

روش کار: هورمون رشد انسانی توسط پلی اتیلن گلیکول متوکسی سوکسینیمیدیل کربنات (mPEG-SC) در دمای ۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شد. در این پژوهش به منظور بررسی تأیید واکنش پگیلاسیون از SDS-PAGE، پراکنندگی دینامیکی نور (DLS) و ELISA استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از SDS-PAGE راندمان بالای پگیلاسیون هورمون رشد را در شرایط آبی نشان داد. پتانسیل زتای هورمون رشد انسانی پگیله شده به عنوان شاخص بار سطحی و پایداری هورمون رشد به وسیله تکنیک DLS آنالیز شد. یافته‌های ELISA بیانگر افزایش نیمه عمر فرم پگیله هورمون رشد انسانی تا ۱۲ برابر می‌باشد.

نتیجه گیری: در این پژوهش مشخص گردید، پگیلاسیون در جایگاه اختصاصی ریشه‌های هیستیدین و یا لیزین هورمون رشد انسانی به صورت معناداری باعث افزایش نیمه عمر آن می‌شود.

کلیدواژه‌ها: هورمون رشد انسانی، پگیلاسیون، نیمه عمر پلاسمایی، پایداری، پلی اتیلن گلیکول

مقدمه

عوارض ناشی از سندرم ترنر و نارسایی مزمن کلیه، حائز اهمیت می‌باشد. هورمون رشد انسانی بر رشد و بلوغ بدن، تکثیر و تمایز سلولی، متابولیسم پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها موثر است و باعث افزایش میزان فاکتور رشد شبه انسولین (Insulin like growth factor) در خون می‌شود. با افزایش جمعیت و شیوع این بیماری‌ها، استفاده از هورمون رشد انسانی در جهان امری اجتناب ناپذیر شده و بنابراین تقاضا برای تولید این پروتئین در حال افزایش است.

هورمون رشد با نام سوماتوتروپین، در دهه‌ی ۱۹۵۰ کشف و برای اولین بار در سال ۱۹۵۶ از غده هیپوفیز جدا گردید. این هورمون، پلی پپتیدی

برخی از بیماری‌های انسان مانند دیابت، کوتاهی قد، تالاسمی، انعقاد خون و ... ناشی از کمبود یا نقص پروتئین است که تاکنون راه‌حل درمانی توسط ژن درمانی، ارائه نشده است. بهترین انتخاب برای درمان این بیماری‌های رایج، تولید پروتئین‌های دارویی می‌باشد. تاکنون، حدود ۶۵۰ پروتئین دارویی در سراسر جهان مورد تایید قرار گرفته است که حدود ۴۰۰ مورد از آن به روش نو ترکیب، تولید شده‌اند (۱). شایان ذکر است که از ۱۰ داروی پرفروش در ایران، هورمون رشد انسانی (Human growth hormone) به دلیل استفاده برای درمان کندذهنی، کوتاهی قد و کاهش

glycol نام دارد. پگلیاسیون با اتصال کووالان پلی اتیلن گلیکول به یک مولکول زیستی، انجام می‌شود. مولکول پلی اتیلن گلیکول یک پلیمر غیر سمی و غیر ایمنوزن است که به عنوان یک رویکرد برای غلبه بر مشکلات برخی از داروهای زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پلی اتیلن گلیکول با فرمول عمومی $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ و وزن ملکولی بین ۵۰۰ تا ۲۰۰۰۰ دالتون، پلیمری محلول در آب و بیشتر حلال‌های آلی است. از منظر حالت فیزیکی، بر حسب وزن ملکولی به صورت مایع شفاف (پلی اتیلن گلیکول‌های با وزن پایین) تا جامد مومی (پلی اتیلن گلیکول‌های با وزن بالا) شکل دیده می‌شود. پلی اتیلن گلیکول به ازای هر واحد اتیلن اکسید، سه پیوند هیدروژنی با آب داشته و بنابراین در آب محلول است (۴، ۵).

اندازه پلیمر مورد استفاده می‌تواند از ۱۰۰۰ دالتون تا ۵۰-۴۰ کیلودالتون به فرم خطی و شاخه‌ای تغییر کند. اولیگومرهای سبک پلی اتیلن گلیکول (کوچک‌تر از ۴۰۰ دالتون) در بدن توسط الکل دهیدروژنازها، تبدیل به متابولیت‌های سمی می‌شوند. این درحالی است که فقدان سمیت و تحریک‌کنندگی پلی اتیلن گلیکول‌های بزرگ‌تر از ۱۰۰۰ دالتون در طی چندین سال استفاده در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی آشکار شده است. تولید آنتی‌بادی علیه پلی اتیلن گلیکول در مورد انسان مشاهده نشده است. پلی اتیلن گلیکول بدون تغییر ساختمانی به سهولت از بدن حذف می‌گردد. شدت حذف آن با وزن ملکولی پلیمر متناسب است. در وزن‌های کمتر از حدود ۲۰ کیلو دالتون، از طریق ادرار حذف شده و در وزن‌های مولکولی بالاتر، طی روندی آهسته‌تر، از طریق ادرار و مدفوع حذف می‌شود.

متداول‌ترین شکل پلی اتیلن گلیکول جهت اصلاح سطحی پروتئین‌ها، ساختار متوکسیله‌ی آن با نام متوکسی پلی اتیلن گلیکول (mPEG)، با فرمول $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ است که تنها یک گروه هیدروکسیله داشته و از اتصالات متقاطع بین ملکول‌های PEG جلوگیری می‌کند. mPEG نیز غیر ایمنوزن بوده و در

متشکل از ۱۹۱ ریشه آمینواسیدی است که در ساختمان آن دو پیوند دی‌سولفیدی بین ریشه‌های Cys^{53-165} و $\text{Cys}^{152-189}$ وجود دارد. این هورمون عضوی از خانواده هورمون‌هایی نظیر پرولاکتین، اریتروپویتین و لاکتوژن است که در شرایط فیزیولوژیک، توسط غده هیپوفیز قدامی ترشح می‌شود. انتقال پیام به درون سلول توسط تمامی اعضای این خانواده با واسطه‌ی گیرنده‌های غشایی گلیکوپروتئینی که واجد سه ناحیه درون، خارج سلولی و درون غشایی است، صورت می‌گیرد؛ از این رو عملکرد مشابهی دارند (۲، ۳).

همان‌طور که قبلاً اشاره گردید؛ یکی از مشکلات اصلی هورمون رشد نو ترکیب انسانی، پایین بودن نیمه عمر پلاسمایی و پایداری آن می‌باشد. برای حل چنین مشکلی، تاکنون از راهکارهای متنوعی مانند مهندسی پروتئین، استفاده از افزودنی‌های پایدارکننده و انواع مدیفیکاسیون‌های شیمیایی بهره‌گیری شده است. استفاده از روش مهندسی پروتئین نیازمند اخذ مجوزهای لازم از سازمان‌ها و نهادهای صلاحیت دار مانند FDA می‌باشد که وقت و هزینه زیادی را در بر دارد. استفاده از افزودنی‌های پایدارکننده، تا حدودی توانسته است پایداری این پروتئین را بهبود ببخشد، ولی رضایت‌بخش نبوده است.

همچنین، راهکارهای متفاوت دیگری برای غلبه بر عدم پایداری پروتئین‌ها از جمله روش محصور سازی پپتید درون نانوذرات، ژل‌ها یا لیپوزوم‌ها، تعویض ژنتیکی ریشه‌های آمینواسیدی برای پایداری ساختار و کاهش ایمنوزنیسیته و همچنین اصلاح سطحی پروتئین‌ها با اتصال کووالان ترکیباتی مانند عوامل آسیله‌کننده ساده، قندها یا پلیمرها ارائه شده است. امروزه، به کارگیری ترکیبات ایمن‌تر مانند استرپتوکیناز (برای انحلال لخته خون) برای اتصال به پلیمر سنتزی دکستران نیز روش مناسبی برای افزایش پایداری و نیمه عمر زیست داروها محسوب می‌شود.

در این میان، ترکیب ایمن دیگری که در صنعت داروسازی به شدت مورد توجه قرار گرفته است، پلی اتیلن گلیکول (PEG-Polyethylene)

شد. جهت دستیابی به شرایط بهینه و راندمان بالای پگیلاسیون، قبلاً نسبت‌های مولی متفاوتی از PEG و هورمون رشد انسانی در زمان‌های مختلفی مورد آزمایش قرار گرفتند.

الکتروفورز SDS-PAGE: جهت تایید واکنش پگیلاسیون و بررسی راندمان آن، ژل الکتروفورز ۱۲٪ SDS-PAGE تهیه شد و ۱۵ µL از نمونه‌های پگیله و غیر پگیله به درون چاهک‌های جداگانه‌ای از ژل تزریق شدند.

پراکنندگی دینامیکی نور (Dynamic -DLS Light Scattering): پتانسیل زتا به عنوان شاخص بار سطحی و پایداری هورمون رشد انسانی به وسیله‌ی تکنیک DLS مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ۱۵۰۰ میکرو لیتر از نمونه‌های پگیله و غیر پگیله هورمون رشد انسانی با غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد.

بررسی نیمه عمر پلاسمایی به روش ELISA: در جریان خون، آنزیم‌های سرین پروتئازها مانند تریپسین، ترومبین، پلاسمین، کلاژناز، سوبتیلیسین، کیموتریپسین و ... بر هورمون رشد اثر گذاشته و باعث تجزیه آن می‌شود (۷، ۸). به منظور بررسی نیمه عمر فیزیولوژیکی فرم‌های طبیعی و پگیله هورمون رشد انسانی و تجزیه آن‌ها توسط آنزیم‌های فوق از کیت الایزای هورمون رشد انسانی استفاده شد.

ابتدا ۲۰ میلی لیتر نمونه خون انسانی تهیه شد، و پلاسمای آن با سه بار سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جدا گردید. سپس در ۲۴ عدد ویال ۵۰۰ میکرو لیتری به صورت مساوی ۱۸۰ میکرو لیتر پلازما ریخته شد. ویال‌ها به ۲ گروه تقسیم شدند: یک گروه برای انکوبه کردن فرم طبیعی هورمون رشد و گروه دیگر برای انکوبه کردن فرم پگیله هورمون رشد مورد استفاده قرار گرفتند. سپس هورمون رشد انسانی به ویال‌های مربوطه افزوده شد تا غلظت نهایی هورمون رشد درون هر ویال ۵۰ میکرو واحد بر میلی لیتر باشد. ویال‌ها درون شیکری انکوباتور با دور ۴۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در زمان‌های ۰، ۲۵ دقیقه، ۴ ساعت و ۲۴ ساعت از هر گروه ۳ ویال به فریز -۲۰ درجه

اندازه‌های مختلف قابل تهیه است و به دلیل داشتن یک گروه فعال هیدروکسیل، عموماً برای اتصال به پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این حالت همگن بودن پیوندها بیشتر شده و از تشکیل اتصالات عرضی (Cross link) جلوگیری می‌گردد.

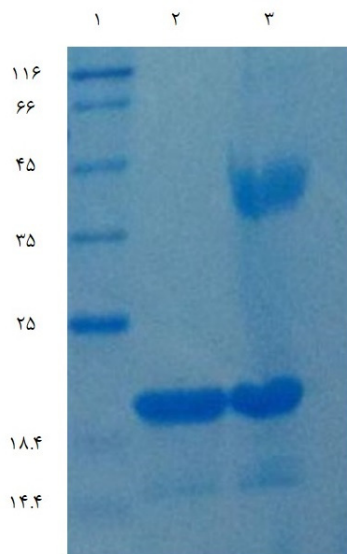
پگیلاسیون منجر به تغییر در خواص فیزیکوشیمیایی مولکول‌های زیست دارویی از قبیل؛ تغییر آرایش فضایی، اتصال الکترواستاتیکی و هیدروفوبیسیته می‌شود که این امر در نهایت منجر به بهبود رفتار فارماکوکینتیکی دارو می‌شود (۶).

از اینرو در این پژوهش، پگیلاسیون هورمون رشد انسانی نو ترکیب با استفاده از پلی اتیلن گلیکول متوکسی سوکسینیمیدیل کربنات (mPEG-SC) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

مواد مورد نیاز: پلی اتیلن گلیکول متوکسی سوکسینیمیدیل کربنات (mPEG-SC) خطی با وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون، هورمون رشد انسانی نو ترکیب (Recombinant human growth hormone) ۴ واحدی (International Unit-IU) با نام تجاری Eutropin و کیت الایزای هورمون رشد انسانی به ترتیب از شرکت‌های JenKem و LG (life science) آمریکا تهیه شدند.

روش پگیلاسیون: بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۶,۵ تهیه شد و ویال‌های هورمون رشد انسانی نو ترکیب (r-hGH) به طوری که غلظت محلول پروتئینی ۱ میلی گرم بر میلی لیتر باشد، در این بافر حل گردید. سپس پلی اتیلن گلیکول متوکسی سوکسینیمیدیل کربنات با نسبت مولی ۲۰ برابر غلظت هورمون رشد انسانی به محلول پروتئینی اضافه شد. انکوباسیون در دمای ۸ سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انجام گردید. سپس جهت کاهش تولید فرم‌های چندگانه پگیله، گلیسین با نسبت مولی ۵۰ برابر غلظت PEG به بافر پروتئینی اضافه شد و واکنش متوقف گردید. محصول نهایی در دمای ۴ سانتی گراد نگهداری



شکل ۱- نتایج حاصل از SDS-PAGE قبل از بهینه سازی نسبت‌های مولی PEG و هورمون رشد انسانی (۱) مارکر وزن مولکولی بر حسب کیلو دالتون (۲) نمونه غیر پگیله هورمون رشد انسانی (۳) نمونه پگیله شده هورمون رشد انسانی

نیمه عمر پلاسمایی فرم‌های طبیعی و پگیله هورمون رشد انسانی در زمان‌های ۰، ۲۵ دقیقه، ۴ ساعت و ۲۴ ساعت توسط کیت الایزا بررسی شد. با رسم منحنی استاندارد محلول‌های کیت الایزا، می‌توان مقدار جذب OD را به واحد غلظت استاندارد تبدیل نمود. بعد از جذب OD نمونه‌های پلاسمای خون انسانی مشخص گردید که غلظت هورمون رشد نمونه خون انسانی (غلظت آن) تقریباً برابر ۵ میکرو واحد بر میلی لیتر می‌باشد. بنابراین غلظت اولیه هورمون رشد انسانی بعد از انکوباسیون درون هر ویال تقریباً برابر ۵۵ میکرو واحد بر میلی لیتر می‌باشد. در مورد فرم طبیعی هورمون رشد، بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، غلظت آن به نصف کاهش می‌یابد ولی در مورد فرم پگیله هورمون رشد، این زمان حدود ۴ ساعت می‌باشد. نتایج حاصله، بیانگر ۱۲ برابر شدن نیمه عمر پلاسمایی فرم پگیله می‌باشد.

در روش دیگری؛ نمونه‌های پگیله و غیر پگیله هورمون رشد انسانی به رت‌های ماده تزریق شدند و بعد از خونگیری از موش‌های ماده، غلظت هورمون رشد درون خون آن‌ها مورد سنجش قرار گرفت. به طور مشابهی نتایج به‌دست آمده تصدیق‌کننده یافته‌های مذکور می‌باشد.

سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس غلظت هورمون رشد درون ویال‌های مربوطه، با استفاده از کیت الایزا مربوطه در نانومتر $OD = 450$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت اعتبار سنجی بیشتر داده‌ها، هر آزمایش ۳ بار تکرار شد. همچنین به منظور بررسی میزان غلظت هورمون رشد درون نمونه پلاسمای خون انسانی (قبل از انکوبه کردن هورمون رشد) با ۳ بار تکرار، غلظت آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

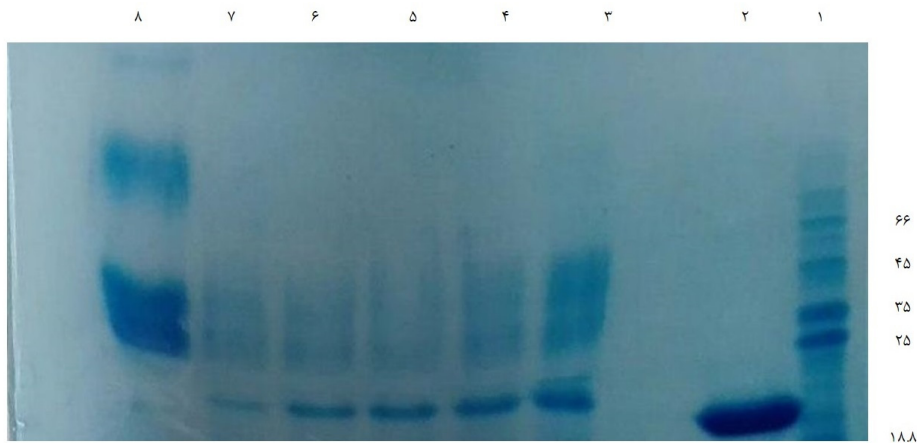
یافته‌ها

با اتصال پلیمر PEG به پروتئین، وزن مولکولی آن افزایش می‌یابد. با توجه به شکل (۱) مشخص می‌شود که اتصال پلیمر PEG به هورمون رشد انسانی باعث افزایش وزن مولکولی آن از ۲۲ کیلو دالتون به ۴۰ کیلو دالتون می‌شود. نتایج SDS-PAGE بیانگر افزایش وزن مولکولی فرم‌های پگیله هورمون رشد انسانی و تأیید واکنش پگیلاسیون می‌باشد.

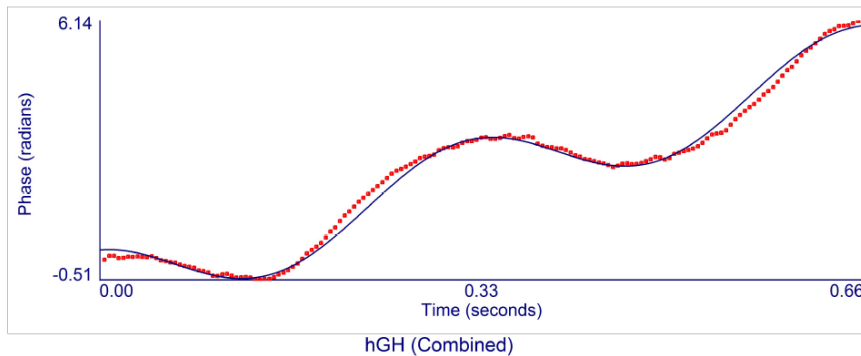
با توجه به شکل (۲) مشخص می‌شود بهینه سازی نسبت‌های مولی PEG و هورمون رشد انسانی، میزان راندمان پگیلاسیون را به مقدار قابل توجهی افزایش داده است. همچنین باندهای مربوط به فرم پگیله هورمون رشد به طور قابل توجهی پهن و گسترده شده‌اند.

پتانسیل زتای هورمون رشد انسانی به عنوان شاخص بار سطحی و پایداری هورمون رشد به وسیله تکنیک DLS مورد بررسی قرار گرفت. اتصال پلیمر PEG به پروتئین‌ها سبب کاهش بار سطحی پروتئین‌ها و در نتیجه کاهش پتانسیل زتای می‌شود (۹). در این پژوهش پتانسیل زتای هورمون رشد غیر پگیله برابر ۱۴- میلی ولت، و برای هورمون رشد پگیله برابر ۶- میلی ولت می‌باشد، که بیانگر پگیلاسیون هورمون رشد انسانی نیز می‌باشد.

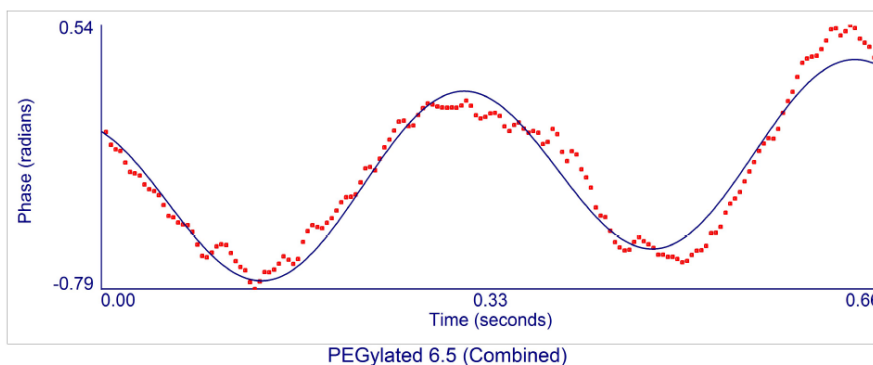
پلیمر PEG با پوشاندن بارهای سطحی و افزایش حجم هیدرودینامیکی پروتئین باعث کاهش تحرک الکتروفورتیکی فرم پگیله هورمون رشد و در نهایت منجر به کاهش پتانسیل زتای آن می‌شود.



شکل ۲- نتایج حاصل از SDS-PAGE بعد از بهینه سازی نسبت‌های مولی PEG و هورمون رشد انسانی در زمان‌های مختلف (۱) مارکر وزن مولکولی بر حسب کیلو دالتون (۲) نمونه غیر پگیله هورمون رشد انسانی (۳) فرم پگیله با نسبت مولی ۱:۱۰ (PEG/hGH) در ۴ ساعت (۴) فرم پگیله با نسبت مولی ۱:۱۰ در ۱ ساعت (۵) فرم پگیله با نسبت مولی ۱:۵ در ۴ ساعت (۶) فرم پگیله با نسبت مولی ۱:۵ در ۱ ساعت (۷) فرم پگیله با نسبت مولی ۱:۲ در ۱ ساعت (۸) فرم پگیله با نسبت مولی ۱:۲۰ به مدت ۱۲ ساعت (پگیلاسیون با راندمان بالا)



شکل ۳- پتانسیل زتای فرم طبیعی هورمون رشد طبیعی



شکل ۴- پتانسیل زتای فرم پگیله هورمون رشد انسانی

انجام گرفته و منطق حاکم بر ایده، ریشه‌ی هیستیدین در هورمون رشد انسانی جهت پگیلاسیون انتخاب گردید (۱۰).

دلایل انتخاب ریشه‌ی هیستیدین برای پگیلاسیون: یکی از معیارهای انتخاب ریشه‌ی هیستیدین، واکنش پذیری بالای این ریشه‌ی آمینو اسیدی برای واکنش پگیلاسیون است. در

بحث و نتیجه‌گیری

پلیمر PEG می‌تواند با اتصال کوالانسی به ریشه‌های آمینو اسیدی مختلفی در پروتئین متصل شود (۴). یکی از مباحث مهم در پگیلاسیون پروتئین‌ها، انتخاب ریشه‌ی مناسب جهت پگیلاسیون می‌باشد. بر اساس مطالعات

جدول ۱- پتانسیل زتای فرم طبیعی هورمون رشد انسانی

پتانسیل زتا (mV)	تحرك	اجرا
-۱۵,۰۳	-۱,۱۷	۱
-۱۶,۹۰	-۱,۳۲	۲
-۱۲,۲۷	-۰,۹۶	۳
-۱۴,۷۳	-۱,۱۵	میانگین

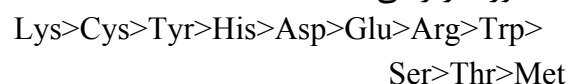
جدول ۲- پتانسیل زتای فرم پگیله هورمون رشد انسانی نوترکیب

پتانسیل زتا (mV)	تحرك	اجرا
-۶,۷۱	-۰,۵۲	۱
-۵,۱۸	-۰,۴۰	۲
-۷,۶۴	-۰,۵۸	۳
-۶,۴۵	-۰,۵۰	میانگین

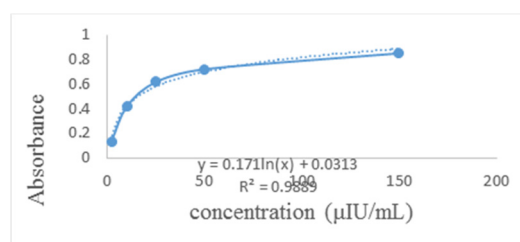
آمینو اسیدی برای پگیلاسیون، لیزین می باشد. ولی در این پروتئین تعداد ریشه های لیزین ۹ عدد می باشد که می تواند محصولات هتروژن زیادی را تولید کند. ریشه های مورد نظر ترجیحا باید در سطح پروتئین و در دسترس (PEG) باشد. با توجه با شکل سه بعدی هورمون رشد که در پایگاه PDB با کد 1HGU ثبت شده است، مشخص است که ریشه های هیستیدین در سطح پروتئین قرار دارند و برای انجام واکنش پگیلاسیون مناسب هستند. برای جلوگیری از کاهش چشمگیر فعالیت زیستی فرم پگیله هورمون رشد، دانستن «جایگاه فعال» این پروتئین بسیار مهم می باشد. ریشه های مورد نظر باید در اتصال پروتئین و گیرنده نقش پر رنگی نداشته باشد و تا جایی که امکان دارد در محدوده «جایگاه فعال» پروتئین قرار نداشته باشد.

برهمکنش های هیدروفوبی، پیوندهای هیدروژنی و پل های نمکی نقش مهمی را در اتصال بین هورمون رشد و گیرنده آن ایفا می کنند (۱۰، ۱۱). ریشه های زیادی از گیرنده در برهمکنش هیدروفوبی با هورمون رشد نقش دارند. ریشه های آرژنین ۴۳، گلوتامیک اسید ۴۴، ایزولوسین ۹۳، تریپتوفان ۱۰۴، ایزولوسین ۱۰۵، پرولین ۱۰۶، ایزولوسین ۱۶۴، آسپارتیک اسید ۱۶۵ و تریپتوفان ۱۶۹ از گیرنده هورمون رشد نقش مهمتری نسبت به بقیه ریشه ها دارند. در میان اینها، ریشه های تریپتوفان ۱۰۴ و ۱۶۹ نقش پررنگتری نسبت به سایر ریشه های ذکر شده دارند و اصلاحا به آنها «نقاط داغ» می گویند.

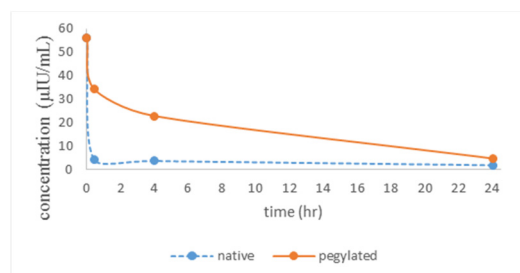
سال ۱۹۷۱ Feene و Means قابلیت واکنش پذیری ریشه های مختلف آمینواسیدی جهت واکنش پگیلاسیون را با یکدیگر مقایسه کردند که به صورت زیر می باشد.



در این مقایسه، قابلیت ریشه های هیستیدین برای واکنش پگیلاسیون، مناسب می باشد. جهت جلوگیری از تشکیل محصولات هتروژن، باید تعداد ریشه های آمینو اسیدی مورد نظر در توالی پروتئینی کم باشد. تعداد ریشه های هیستیدین در هورمون رشد انسانی ۳ عدد می باشد. معمول ترین ریشه های



نمودار ۱- نمودار منحنی استاندارد محلول های کیت الایزا



نمودار ۲- نیمه عمر پلاسمایی فرم های طبیعی و پگیله هورمون رشد انسانی بر اساس واحد بین المللی (IU)

جدول ۳- پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی درگیر در اتصال بین هورمون رشد و گیرنده آن

ریشه‌های هورمون رشد انسانی	ریشه‌های گیرنده هورمون رشد انسانی	فاصله بین ریشه‌های آمینو اسیدی هورمون رشد و گیرنده آن (بر حسب آنگستروم)
Lys ⁴¹ Nζ	Glu ¹⁷² Oε2	۲٫۹
Gln ⁴⁶ Nε2	Glu ¹²⁰ Oε2	۳٫۳
Pro ⁶¹ O	Ile ¹⁰³ N	۲٫۹
Arg ¹⁶⁷ Nη1	Glu ¹²⁷ Oε1	۳٫۲
Arg ¹⁶⁷ Nη2	Glu ¹²⁷ Oε1	۲٫۹
Lys ¹⁶⁸ Nζ	Trp ¹⁰⁴ O	۳٫۱
Asp ¹⁷¹ Oδ2	Arg ⁴³ Nη2	۳٫۲
Thr ¹⁷⁵ Oγ1	Arg ⁴³ Nη1	۳٫۲
Arg ¹⁷⁸ Nη2	Ile ¹⁶⁵ O	۲٫۹
Asn ¹² Oδ1	Arg ⁴³ Nη2	۲٫۹
Asn ¹² Oδ2	Asp ¹²⁶ Oδ2	۳٫۰
Arg ¹⁶ Nη1	Glu ⁴⁴ Oε2	۳٫۱
Arg ¹⁹ Nη2	Gln ¹⁶⁶ Oε1	۳٫۰

در داروی تجاری با نام PEG-interferon مورد استفاده قرار گرفته است که در آن، ریشه‌ی هیستیدین شماره ۳۴ پروتئین interferon-α-2b پیگله شده است.

همان طور که در شکل (۱) مشهود است، وزن مولکولی فرم پیگله هورمون رشد تقریباً معادل ۴۰ کیلو دالتون است که نسبت به فرم طبیعی هورمون رشد انسانی، دارای وزن مولکولی بالاتری می‌باشد. درجه آب پوشی بالا و حرکت زیاد پلی اتیلن گلاکول در محیط آبی باعث می‌شود، شعاع هیدرودینامیکی این پلیمر بزرگ تر از یک پروتئین محلول با وزن مشابه باشد. همچنین افزایش حجم هیدرودینامیکی پروتئین نیز باعث کاهش تحرک الکتروفورتیکی فرم‌های پیگله هورمون رشد می‌شود که به همین دلیل باندهای فرم پیگله هورمون رشد در ژل الکتروفورز پهن و گسترده شده و وزن‌های مولکولی کاذبی را از خود نشان می‌دهند (۱۲).

ذرات در داخل سیال دارای بارهای سطحی هستند و همواره در اطراف سطح ذره‌ای که درون سیال قرار گرفته، افزایش غلظت یون‌های با بار مخالف دیده می‌شود. بنابراین یک لایه اضافی از این یون‌ها سطح ذره را احاطه می‌کند و لایه اضافی دیگری در دور ذره به وجود می‌آید. این لایه به وجود آمده دور ذره را می‌توان به دو قسمت

ریشه‌ی تریپتوفان ۱۰۴ گیرنده با ریشه‌های آسپارتیک اسید ۱۷۱، لیزین ۱۷۲، ترئونین ۱۷۵ و لیزین ۱۶۸ هورمون رشد؛ و ریشه‌ی تریپتوفان ۱۶۹ گیرنده با ریشه‌های آرژنین ۴۳ و آرژنین ۶۴ هورمون رشد در ارتباط هستند. همچنین ریشه‌ی پرولین ۱۰۶ گیرنده به صورت مستقیم با ریشه‌ی لوسین ۴۵ هورمون رشد در ارتباط هست.

جدول (۳) به پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی بین هورمون رشد و گیرنده آن، اشاره می‌کند.

بر اساس تحلیل پیش گفته، سعی شده است که ریشه‌ی انتخابی جهت پیگلاسیون هورمون رشد انسانی در طیف ریشه‌های آمینو اسیدی ذکر شده، قرار نگیرد.

حمله الکترون دوستی PEG به ریشه‌های آمینواسیدی، به طور گسترده ای وابسته به قدرت هسته دوستی هر ریشه‌ی آمینواسیدی می‌باشد. حمله نوکلئوفیلی تنها زمانی رخ می‌دهد که pH محلول پروتئینی، نزدیک یا بالاتر از pKa ریشه‌ی آمینو اسیدی باشد.

mPEG-SC دارای توانایی اتصال به ریشه‌های لیزین و هیستیدین است. اما از آنجایی که واکنش در pH= ۶٫۵ انجام می‌گیرد، احتمال پیگلاسیون ریشه‌های هیستیدین محتمل تر است. منطق حاکم در انتخاب ریشه هیستیدین برای پیگلاسیون، قبلاً

افزایش اندازه آن، منجر به کاهش فیلتراسیون کلیوی و کاهش تجزیه آن توسط آنزیم‌های پروتئولیتیکی مذکور می‌شود (۱۵، ۱۶) در این تحقیق نیز، نتایج بدست آمده بیانگر افزایش فوق العاده ی نیمه عمر پلاسمایی فرم پگیله هورمون رشد تا ۱۲ برابر نسبت به فرم طبیعی غیرپگیله می‌باشد.

از سویی دیگر نتایج این پژوهش با مطالعات سایر محققان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است؛ اینترفرون آلفا-2b (Intron® A) به تنهایی یا در ترکیب با ریبویرین یک درمان استاندارد برای بیماران مبتلا به عفونت ویروسی هپاتیت C مزمن شناخته شده است. پگیلاسیون اینترفرون آلفا-2b با استفاده از پلی اتیلن گلیکول متوکسی سوکسینیمیدیل کربنات (mPEG-SC) خطی با وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون منجر به تولید داروی Intron PEG شده است. بر اساس مطالعه‌ای که بر روی ۵۸ بیمار تیمار شده با PEG Intron انجام گرفته است، نیمه عمر سرمی فرم پگیله اینترفرون تا حدود ۱۰ برابر افزایش یافته است (۱۷).

در سال ۲۰۱۳ فریتاس و همکارانش پژوهشی بر روی پگیلاسیون هورمون رشد انسانی انجام دادند. آن‌ها با استفاده از PEG₂₀ kDa-آلدئیدی و PEG₂₀ kDa-NH₂ به ترتیب انتهای N-ترمینال و ریشه 141 Gln (به واسطه‌ی آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی) هورمون رشد انسانی را اصلاح شیمیایی کردند. مطابق انتظار، اتصال مولکول PEG به هورمون رشد باعث افزایش وزن مولکولی فرم‌های پگیله و همچنین حرکت الکتروفوریک کاذب آن‌ها در ژل الکتروفورز گردید. فرم‌های پگیله هورمون رشد، افزایش نیمه عمر ۴-۵ برابر در مقایسه با فرم طبیعی هورمون رشد نشان دادند. حال آنکه در این پژوهش نیمه عمر فرم پگیله هورمون رشد با استفاده از mPEG-SC خطی با وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون به حدود ۱۲ برابر افزایش یافته است (۱۸).

یکی از چالش‌ها و موانعی که بر سر راه پگیلاسیون پروتئین‌ها وجود دارد این است که در برخی مواقع مولکول PEG به جایگاه فعال یا

تقسیم نمود: لایه‌ی درونی و لایه‌ی بیرونی. در لایه‌ی درونی که به آن لایه‌ی استرن نیز می‌گویند، یون‌ها به شدت محدود هستند و به صورت کاملاً متراکم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. در لایه‌ی بیرونی یون‌ها تا حدودی از لایه قبلی آزادی بیشتری دارند و توانایی جا به جایی آن‌ها بیشتر از لایه‌ی قبلی است.

وقتی ذره درون سیال حرکت می‌کند، لایه‌های دورنی و بیرونی اطراف آن نیز به همراه ذره جا به جا می‌شوند و با ذره حرکت می‌کنند. بنابراین می‌توان یک فاصله فرضی بین ذره و محیط سیال تصور نمود که این فاصله فرضی همان لایه مضاعفی است که ذره را احاطه کرده است. این فاصله را در اصطلاح، فاصله هیدرودینامیکی می‌گویند و پتانسیلی که در این فاصله وجود دارد، به پتانسیل زتا معروف است. اندازه‌گیری پتانسیل زتا اطلاعات دقیقی درباره مکانیسم پراکندگی و پایداری بیومولکول‌ها ارائه می‌دهد (۱۳، ۱۴).

معادله‌ی زیر به معادله هنری معروف است، که برای محاسبه پتانسیل زتا کاربرد دارد. در این معادله؛ Z : پتانسیل زتا، U_E : تحرک الکتروفورتیکی، ϵ : ثابت دی‌الکتریک، η : ویسکوزیته و $f(ka)$: تابع هنری است که بر حسب نمونه می‌تواند ۱ یا ۱.۵ باشد.

معادله ۱:

$$U_E = \frac{2\epsilon z f(ka)}{3\eta}$$

همان‌طور که از معادله (۱) مشخص است، پتانسیل زتا با تحرک الکتروفورتیکی رابطه عکس دارد. پلیمر PEG با پوشاندن بارهای سطحی و افزایش حجم هیدرودینامیکی پروتئین باعث کاهش تحرک الکتروفورتیکی پروتئین پگیله شده می‌شود که در نهایت منجر به کاهش پتانسیل زتای پروتئین پگیله شده می‌شود.

در جریان خون آنزیم‌های سرین پروتئازها نظیر تریپسین، ترومبین، پلاسمین، کلاژناز، سوبتیلیسین، کیموترپسین و ... بر هورمون رشد انسانی اثر گذاشته و باعث تجزیه آن می‌شود. پیشتر ثابت شد که اتصال کووالان پلی اتیلن گلیکول به پروتئین هدف (پگیلاسیون) به واسطه

پگیلاسیون باعث تغییر در خواص فیزیکی و شیمیایی مولکول‌های زیست دارویی از قبیل تغییر آرایش فضایی، اتصال الکترواستاتیکی و هیدروفوبیسیته می‌شود که این امر در نهایت منجر به بهبود رفتار فارماکوکینتیکی دارو می‌شود. به علاوه پگیلاسیون باعث افزایش پایداری دارو و نیمه عمر در خون، کاهش پروتئولیز و دفع کلیه‌ای می‌شود (۱۵، ۱۶). که بنابراین کاهش دفعات تزریق و مصرف دُز تزریقی را به همراه دارد.

به عنوان نتیجه گیری کلی باید گفت که روش پگیلاسیون هورمون رشد و بهینه سازی فرآیند آن، یک دستاورد مهم در شیمی پروتئین‌های دارویی محسوب می‌شود. در این مطالعه با توجه به راندمان بالای پگیلاسیون هورمون رشد انسانی، مشخص شد پگیلاسیون ریشه‌های هیستیدین و/یا لیزین هورمون رشد انسانی به صورت معناداری باعث افزایش نیمه عمر پلاسمایی آن می‌شود. همچنین نشان داده شد که پگیلاسیون هورمون رشد، پتانسیل زتای آن را کاهش می‌دهد.

تقدیر و تشکر

از حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی مالک اشتر در تامین هزینه‌های مالی و همچنین از مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران در ارائه بخشی از امکانات آزمایشگاهی و آنالیز دستگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangues R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells. *Microb Cell Factor*; 2016.15:33.
2. Aloj S, Edelhoch H. The molecular properties of human growth hormone. *J Biolo Chemist*; 1972;247:1146-52.
3. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*; 1996.273:974-7.
4. Roberts M, Bentley M, Harris G. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanc Drug Deliver Rrev*; 2012.64:116-27.
5. Zalipsky S. Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanc Drug Deliver Rrev*; 1995.16:157-82.

ریشه‌های نزدیک جایگاه فعال پروتئین‌های دارویی و بیومولکول‌ها اتصال می‌یابد و در نتیجه باعث کاهش شدید فعالیت زیستی بیومولکول‌های دارویی می‌شود. مثلاً در پگیلاسیون اوریکاز اگر از PEG خطی استفاده شود، تنها حدود ۲٫۵ درصد فعالیت زیستی اولیه باقی می‌ماند (۱۹). از این رو انتخاب ریشه‌ی مناسب جهت اتصال مولکول PEG بسیار مهم می‌باشد.

به منظور بررسی کاهش فعالیت زیستی فرم پگیله هورمون رشد انسانی باید از روش کشت سلولی بهره برد که این روش خیلی زمان بر، حساس و هزینه بر است. در این پژوهش به منظور بررسی نیمه عمر پلاسمایی فرم‌های طبیعی و پگیله هورمون رشد انسانی از روش ELISA استفاده شد. روش ELISA مبتنی بر واکنش بین آنتی بادی- آنتی ژن است و تغییر در ساختار آنتی ژن باعث عدم واکنش، با آنتی بادی می‌شود. با توجه به اینکه فرم‌های طبیعی و پگیله هورمون رشد با روش ELISA شناسایی شدند، عدم تغییر در ساختار فرم پگیله هورمون رشد انسانی و در نتیجه کاهش فعالیت زیستی آن منتفی به نظر می‌رسد. از سایر مشکلات فرآیند پگیلاسیون پروتئین‌ها، تهیه فرم فعال PEG با دارا بودن گروه عاملی واکنشگر فعال و هزینه زیاد تهیه آن است.

کاربرد فناوری پگیلاسیون پروتئین‌های دارویی با توجه به اهمیت آن، رو به گسترش است. با توجه به تلاش‌های انجام گرفته در زمینه تولید هورمون رشد نو ترکیب، اکنون این هورمون به سهولت در دسترس مردم قرار می‌گیرد. اما یکی از مشکلات اصلی این هورمون، پایداری پایین آن می‌باشد. تحقیقات شرکت‌های داروسازی در زمینه پایداری فرمولاسیون این دارو رضایت بخش بوده است ولی پایداری فیزیولوژیکی آن همچنان پایین می‌باشد، به طوری که نیمه عمر هورمون رشد انسانی در خون تقریباً ۲۰ دقیقه می‌باشد. به علت پایین بودن نیمه عمر هورمون رشد انسانی، بیماران مجبور به تجویز این دارو با دفعات زیاد می‌باشند که هزینه‌های زیادی را بر بیماران تحمیل می‌کند و از طرف دیگر تزریق مکرر دارو، درد و رنج زیادی را برای بیمار به همراه دارد.

and branched monomethoxy poly (ethylene glycol).
J Controll Releas; 1996.40:199-209.

6. Kolate A, Baradia D, Patil S, Vhora I, Kore G, Misra A. PEG—a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. J Controll Release 2014.192:67-81.

7. Komatsu N, Saijoh K, Otsuki N, Kishi T, Micheal IP, Obiezu CV, et al. Proteolytic processing of human growth hormone by multiple tissue kallikreins and regulation by the serine protease inhibitor Kazal-Type5 (SPINK5) protein. Clin Chim Acta; 2007.377:228-36.

8. Wroblewski VJ, Masnyk M, Becker GW. Proteolytic cleavage of human growth hormone (hGH) by rat tissues in vitro: influence on the kinetics of exogenously administered hGH. Endocrinology; 1991.129:465-74.

9. Kouchakzadeh H, Shojaosadati SA, Maghsoudi A, Farahani EV. Optimization of PEGylation conditions for BSA nanoparticles using response surface methodology. AAPS Pharm Sci Tech; 2010.11:1206-11.

10. De Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. Science; 1992.255:306-312.

11. Verkhivker GM, Bouzida D, Gehlhaar DK, Rejto PA, Freer ST, Rose PW. Computational detection of the binding-site hot spot at the remodeled human growth hormone-receptor interface. Protein Struct Func Bioinform; 2003.53:201-19.

12. Veronese FM, Mero A, Caboi F, Sergi M, Marongiu C, Pasut G. Site-specific pegylation of G-CSF by reversible denaturation. Bioconjug Chem; 2007.18:1824-30.

13. Kaszuba M, Corbett J, Watson FM, Jones A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. Philos Transa Royal A Math Phys Eng Sci; 2010. 368:4439-51.

14. Deshiikan S, Papadopoulos K. Modified Booth equation for the calculation of zeta potential. Colloid and Poly Sci; 1998.276:117-24.

15. Israelachvili J. The different faces of poly (ethylene glycol). Proceedi Nat Acad Sci; 1997.94:8378-9.

16. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nat Rev Drug Discov; 2003. 2:214-21.

17. Wang YS, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss F. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. Advanc Drug Deliv Rev; 2002.54:547-70.

18. da Silva Freitas D, Mero A, Pasut G. Chemical and enzymatic site specific PEGylation of hGH. Bioconjug Chem; 2013.24:456-63.

19. Veronese FM, Monfardini C, Caliceti P, Schiavon O, Scrawen MD, Beer D. Improvement of pharmacokinetic, immunological and stability properties of asparaginase by conjugation to linear

PEGylation of human growth hormone with methoxy PEG succinimidyl carbonate and study of its half-life and stability

Reza Ghaffari, MSC of Biochemistry, Department of Biosciences and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

***Mohammad Ali Nasiri Khalili**, Assistant Professor, Department of Biosciences and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran (*Corresponding author).
manasiri@alumni.ut.ac.ir

Sirus Khodadadi, Assistant Professor, Department of Biosciences and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

Gholamhossein Riazi, Professor, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Background: Human growth hormone (hGH) use is increasing due to its important biological functions and therapeutic applications, the use of growth hormone for the treatment of obesity, short stature, burns and the importance of this hormone for athletes. Nowadays, the short half-life of hGH is a major challenge associated with the usage of this drug in the world. PEGylation is an effective approach to increase half-life and stability of biopharmaceutical proteins. Polyethylene glycol (PEG) due to high aqueous solubility is considered as a versatile candidate for pharmaceutical protein conjugation. Accordingly, in this study the PEGylation of human growth hormone and its plasma half-life and stability were carried out.

Methods: hGH was PEGylated by using Methoxy PEG Succinimidyl Carbonate (mPEG-SC) at 8 °C for overnight. In this study, SDS-PAGE, Dynamic Light Scattering (DLS), and ELISA techniques were used to prove PEGylation reaction.

Results: The SDS-PAGE results showed high yield PEGylation of hGH under aqueous conditions. The zeta-potential, as an indicator of the Surface charge of PEGylated hGH, was analyzed by DLS technique. The ELISA results shown the increase half-life of pegylated hGH to 12 times.

Conclusion: In the present study, we demonstrated that the PEGylation of lysine and/or histidine residues significantly increased the half-life of the human growth hormone.

Keywords: Human growth hormone, PEGylation, Plasma half-life, Stability, Polyethylene glycol