فصلنامه علمی - ترویجی
سال سوم شماره ۲، شماره پیاپی ۱۰، تابستان ۱۳۹۷
Vol. 3, No. 2, Issue No. 10, Summer 2018, Quarterly
صفحه ۵۸ - ۴۷

Iran Polymer Technology: Research and Development

کاربرد پلیمرها در مهندسی پروتئین

مریم مرادی[۱]، نادره گلشن ابراهیمی*[۱]، سید سعید سید محمد[۲]

۱ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی مهندسی شیمی، گروه مهندسی پلیمر

۲ کمبریج، دانشگاه کمبریج، دانشکده‌ی زیست شناسی، گروه داروشناسی

چکیده ...

امروزه پلیمرها کاربردهای گسترده‌ای در زمینه پزشکی و علوم زیستی یافته‌اند که از جمله این کاربردها می‌توان به استفاده از پلیمرها در مهندسی پروتئین اشاره کرد. در این روش، پلیمرها به سطح پروتئین، پیوند زده می‌شوند که به موجب آن، پایداری پروتئین‌ها در دماهای بالا، محیط‌های اسیدی و قلیایی و حلال‌های آلی افزایش می‌یابد. اصلاح پروتئین‌ها توسط پلیمرها باعث سهولت شناسایی پروتئین‌ها، افزایش گستره کاربری آن‌ها و استفاده از آن‌ها در کاربردهای خاص و هدفمند می‌شود. انواع مختلفی از پلیمرهای طبیعی و سنتزی در مهندسی پروتئین مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از میان آن‌ها پلیمرهای هوشمند که می‌توانند در مقابل عوامل تحریک خارجی مانند دما و pH تغییر صورت‌بندی بدهند، باعث افزایش بیشتر پایداری پروتئین‌ها شده‌اند. در اصلاح پروتئین‌ها توسط پلیمرها عوامل مختلفی از جمله نوع، جرم مولکولی و ساختار پلیمر مورد استفاده، چگالی زنجیرهای پلیمری در سطح پروتئین و محل اتصال پلیمر به پروتئین بر عملکرد نهایی پروتئین اثر می‌گذارد که باید به دقت بررسی و بهینه شود. در این مقاله مزایا و معایب انواع مختلف پلیمرهای استفاده شده در مهندسی پروتئین و تأثیر عوامل مختلف بر عملکرد نهایی پروتئین بررسی می‌شود.

واژه‌های کلیدی:

پیوندزنی پلیمرها
مهندسی پروتئین
افزایش پایداری پروتئین

*پست الکترونیکی مسئول مکاتبات:
ebrahimn@modares.ac.ir

۱ مقدمه

پروتئین‌ها یکی از انواع درشت‌مولکول‌های زیستی هستند که از واحدهایی به نام آمینواسید ساخته شده‌اند و نخستین و مهم‌ترین بخش موجودات زنده را تشکیل می‌دهند. پروتئین‌ها عملکردهای مهمی در تمام فرایندهای زیستی دارند، بنابراین مطالعه آن‌ها موجب فهم بهتر سلول‌ها و درنتیجه موجودات زنده می‌شود. واکنش‌های پیچیده و مرتبط به هم که فرایندهای موجودات زنده را به وجود می‌آورند؛ متکی به حضور پروتئین‌ها هستند. پروتئین‌ها بر اساس عملکرد زیستی خود، به دسته‌های مختلفی تقسیم می‌شوند که از جمله عبارتند از: پروتئین‌های ساختاری (Structural Proteins) مانند کراتین، پروتئین‌های حامل (Transport Proteins) مانند هموگلوبین، پادتن‌ها (Antibody)، هورمون‌ها (Hormones) و آنزیم‌ها (Enzymes).

همه این عملکردها مستلزم این است که زنجیرهای آمینواسیدی موجود در پروتئین در فضا به‌درستی تاخورده و در کنار هم قرار گرفته باشند و در نهایت پروتئین، ساختار طبیعی سه بعدی صحیحی داشته باشد تا بتواند فعالیت حیاتی از خود نشان دهد [۱،۲].

۲ نیروهای مؤثر در تاخوردگی آمینو اسیدها در پروتئین‌ها

در آرایش فضایی تاخورده پروتئین‌ها، عوامل و برهم‌کنش‌های مختلفی اثر می‌گذارند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: برهم‌کنش‌های آب‌گریز، پیوندهای هیدروژنی، نیروهای الکترواستاتیک و پیوندهای دی سولفیدی [۳]. به فرایندی که در اثر آن تاخوردگی‌های پروتئین باز می‌شود و ساختمان طبیعی سه بعدی پروتئین از بین می‌رود واسرشتی (Denaturation) گفته می‌شود (شکل ۱). درنتیجه این فرایند، پروتئین فعالیت زیستی خود را از دست می‌دهد و قادر به انجام وظایف خود نخواهد بود. عواملی که در واسرشتی تأثیر دارند عبارت هستند از [۴]:

۱) pH: مقادیر بسیار بالا و بسیار پایین pH از طریق افزایش میزان بار الکتریکی مشابه، سبب واسرشتی می‌شود.

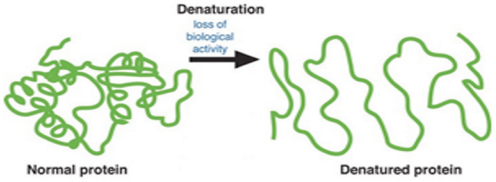
۲) دما: افزایش دما سبب شکسته شدن پیوندهای ضعیف بین مولکولی می‌شود و در دماهای بسیار بالا حتی پیوندهای پپتیدی نیزشکسته می‌شوند و ساختار اولیه نیز از بین می‌رود.

۳) املاح: چنانچه به محلول پروتئین، نمک (NaCl) با غلظت کم اضافه کنیم حلالیت پروتئین افزایش می‌یابد و اگر غلظت نمک بالا باشد، پروتئین رسوب می‌کند.

۴) حلال‌های آلی، غیرقطبی، عوامل فعال سطحی، اوره و برخی ترکیبات شیمیایی دیگر مانند فلزات سنگین.

۳ کاربرد اصلاح پروتئین‌ها توسط پلیمرها

افزایش پایداری پروتئین‌ها در شرایط غیرطبیعی آن‌ها، مزایای بسیاری در زمینه‌های پزشکی و زیست‌شیمی دارد که از جمله می‌توان به افزایش دانش ما از ساختار پروتئین‌ها اشاره کرد. برای شناسایی زیست‌فیزیکی و زیست-شیمیایی پروتئین‌ها باید آن‌ها را از محیط طبیعی خود خارج و وارد محیط آزمایشگاهی کرد. زمانی که پروتئین‌ها از محیط دومحیط دوست (Amphiphilic) خود خارج می‌شوند ساختار تاخورده‌شان به هم می‌ریزد و درنتیجه فعالیت زیستی پروتئین از بین می‌رود [۵]؛ بنابراین با اصلاح پروتئین‌ها می‌توان آن‌ها را در شرایط آزمایشگاهی، پایدار ساخت و مورد مطالعه قرار داد. همچنین آنزیم‌های با پایداری حرارتی بالا در صنعت بسیار مورد توجهند؛ زیرا این امکان را فراهم می‌آورند که واکنش‌ها در دمای بالاتری انجام شود که این خود موجب افزایش سرعت و بازده واکنش می‌شود. یکی از روش‌های پایدارسازی پروتئین‌ها، تهیه ترکیبات مزدوج پروتئین- پلیمر (Protein- Polymer Conjugates) است. در این روش پلیمرها به سطح پروتئین پیوند زده می‌شوند و از آن‌ها در برابر عوامل تخریبی محافظت می‌کنند. در اصلاح سطحی پروتئین‌ها توسط پلیمرها عوامل مختلفی مؤثرند که از جمله عبارتند از: نوع پلیمر مورد استفاده،



شکل ۱ طرح‌واره فرایند واسرشتی شدن پروتئین‌ها

جرم مولکولی و ساختار پلیمر، چگالی اتصالات پلیمر به سطح پروتئین و محل اتصال پلیمر به پروتئین. تغییر هر یک از این عوامل، باعث تغییر کارایی و عملکرد ترکیب مزدوج نهایی می‌شود. بنابراین قبل از اصلاح پروتئین‌ها، این عوامل می‌بایست به دقت مورد بررسی قرار گیرد.

۴ انواع پلیمرهای مورد استفاده در اصلاح پروتئین‌ها

• پلی اتیلن گلیکول (Polyethylen Glycol (PEG))

مطالعات اولیه در مهندسی پروتئین از دهه ۱۹۷۰ و توسط داویس (Davis) و اباکویسکی (Abuckowski) با مطالعه تأثیر پلی‌اتیلن گلیکول بر پروتئین آلبومین آغاز شد. PEG به دلیل خواصی نظیر آب‌دوستی، غیر سمی بودن، انعطاف‌پذیری بالا و زیست‌سازگاری یکی از بهترین پلیمرهای استفاده شده است. تحقیقات زیادی در رابطه با افزایش پایداری، ایمنی و زمان نگهداری پروتئین‌ها، لیپوزوم‌ها و سامانه‌های دارورسانی در اثر اصلاح آن‌ها با PEG انجام شده است [۶]. به فرایند پیوندزنی PEG بر سطح پروتئین‌ها پگیله شدن (PEGylation) گفته می‌شود.

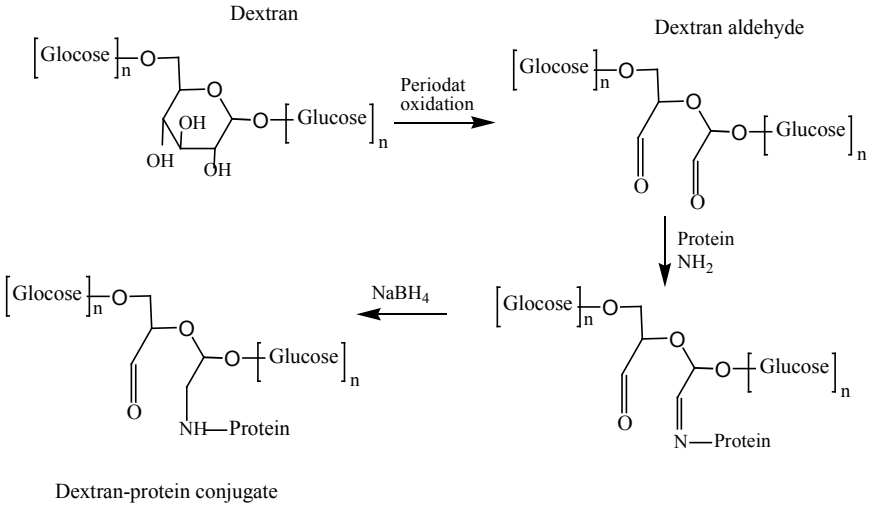
باوجود خواص بسیار خوب PEG، این پلیمر نمی‌تواند در همه‌ی کاربردها بهترین انتخاب باشد زیرا ضعف‌هایی نیز دارد که عبارتند از [۶,۷]:

PEG در جرم مولکولی‌های بالا، به علت عدم زیست‌تخریب‌پذیری، نمی‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد و همیشه باید جرم مولکولی آن، پایین‌تر از جرم مولکولی آستانه‌اش باشد تا بتواند توسط کلیه، دفع بشود. همچنین به علت عدم وجود گروه‌های عاملی خاص در ساختار PEG، این پلیمر نمی‌تواند در کاربردهای خاص مانند ترکیبات پروتئین-پلیمر هوشمند، مورد استفاده قرار بگیرد.

• دکستران (Dextran)

دکستران‌ها احتمالاً اولین و بیشترین پلیمر مطالعه شده هستند. این پلیمرها که توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند شامل مونومرهای گلوکز هستند که با اتصالات α-۱ و ۶ گلیکوزیدی به هم متصل می‌شوند و تشکیل پلیمر خطی یا تا حدی شاخه‌ای را می‌دهند. درجه شاخه‌ای شدن دکستران بین ۰/۵ تا ۶۰ درصد متغیر است که بر میزان انحلال آن‌ها در آب تأثیر می‌گذارد و همچنین سینتیک عملکرد آن‌ها به شدت به جرم مولکولی مرتبط است [۶]. برای اصلاح پروتئین‌ها توسط دکستران‌ها ابتدا این پلیمر توسط ترکیبات پریداتی، اکسید می‌شود و گروه‌های آلدهیدی در آن تشکیل می‌شوند و سپس آلدهیدها با گروه‌های آمین پروتئین واکنش می‌دهند(شکل ۲).

در سال ۱۹۸۶، ویلمن (Wileman) و همکارانش ترکیب مزدوج دکستران-اسپاراجیناز (Asparaginase) را تهیه و مشاهده کردند آنزیم اصلاح شده نسبت به اصلاح نشده تا ۵۰ درصد فعالیت آنزیمی خود را حفظ



شکل ۲ سازوکار واکنش دکستران با پروتئین

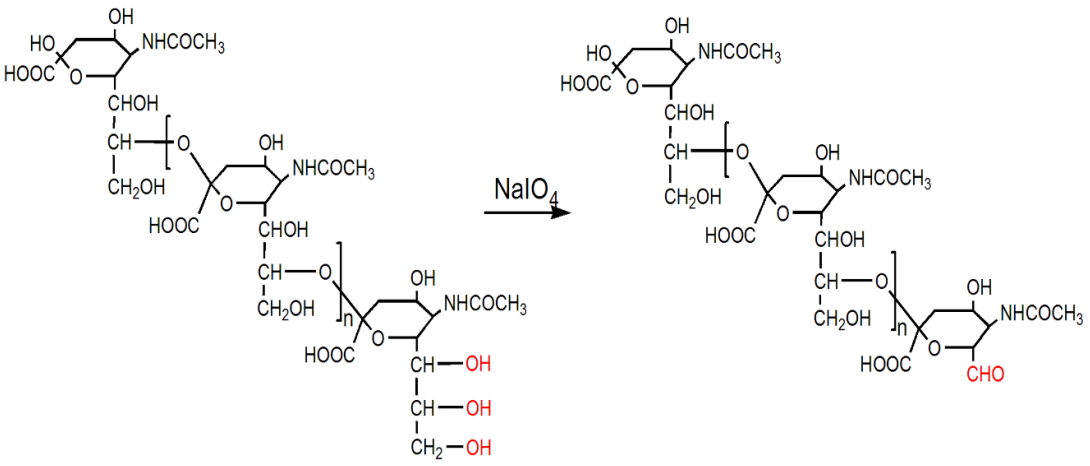
می‌کند و مقاومت قابل توجهی در برابر تخریب توسط آنزیم‌های دیگر نشان می‌دهد. همچنین با افزایش جرم مولکولی دکستران، زمان ماندگاری آنزیم‌های اصلاح شده در بدن افزایش یافته است [۸]. اگرچه از این روش هنوز هم برای اتصال دکستران‌ها و پلی ساکاریدها به پروتئین‌ها استفاده می‌شود، اما به علت تعدد و فراوانی گروه‌های عاملی در ساختار این پلیمر، اگر شرایط اتصال پلیمر به پروتئین به خوبی کنترل نشود، واکنش نامطلوب شبکه‌ای شدن اتفاق می‌افتد. علاوه بر آن، در اثر اکسایش، دو نوع گروه آلدهیدی در مجاورت یکدیگر به وجود می‌آید که واکنش‌پذیری متفاوتی دارند و تشخیص این‌که کدام گروه آلدهیدی به پروتئین متصل شده است دشوار است. همچنین واکنش هر دو گروه آلدهیدی با پروتئین نیز امری اجتناب‌ناپذیر است؛ بنابراین اگر در این روش شرایط به‌درستی و به دقت بهینه و کنترل نشود باعث تشکیل ترکیبات پروتئین- پلیمر غیریکنواخت می‌شود. علاوه بر آن، نایکنواختی ساختاری دکستران در اثر شاخه‌ای شدن نیز باعث افزایش غیریکنواختی و کاهش تکرارپذیری ترکیب مزدوج نهایی می‌شود. این عوامل منجر به استفاده کمتر از دکستران‌ها نسبت به پلیمرهای سنتزی شده است [۶].

• پلی سیالیک اسید (Polysialic Acids (PSAs))

پلی سیالیک اسیدها جزو پلیمرهای طبیعی و زیست تخریب‌پذیر با ساختار خطی هستند که شامل واحدهای N- استیل نورامینیک اسید هستند و توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند. سیالیک اسید یکی از اجزای اصلی گلیکان‌های پروتئین‌های گلیکوزدار شده هستند که باعث کاهش تمایل خودتجمعی داروها و افزایش زمان فعالیت آن‌ها می‌شود. PSAs در طبیعت با ایفای نقش محافظتی، باعث حفظ ساختار پروتئین‌ها و افزایش خواص دارویی و کاهش ایمنی‌زایی آن‌ها می‌شوند. زمان نیمه‌عمر ترکیب مزدوج پروتئین-پلی سیالیک اسید، مستقیماً متناسب با جرم مولکولی پلیمر است. معمولاً جرم مولکولی‌های بین ۱۰ تا ۶۰ kDa از PSAs برای اصلاح پروتئین‌ها استفاده می‌شود. در اکثر موارد از طریق اکسایش کنترل شده PSA با پریدات در انتهای این پلیمر که دارای سه گروه هیدروکسیل است، یک گروه آلدهیدی ایجاد می‌شود (شکل ۳).

این اصلاح باعث تشکیل یک گروه آلدهیدی به ازای هر زنجیر پلیمری می‌شود، بنابراین واکنش‌های شبکه‌ای شدن در حین فرایند اتصال پلیمر به پروتئین انجام نمی‌شود. گروه آلدهیدی ایجاد شده در پلی سیالیک اسید می‌تواند با گروه‌های آمینی آمینواسید لیزین (Lysine) در پروتئین وارد واکنش شده و موجب اتصال این پلیمر به پروتئین شود[۶,۹]. همچنین پلی سیالیک اسید آلدهیددار شده می‌تواند به PSA- مالئیمید تبدیل شود و از طریق پیوندهای سولفیدی به آمینواسید سیستین (Cysteine) در پروتئین، پیوند زده شود[۶,۱۰].

اگرچه PSAs پراکندگی جرم مولکولی بیشتری نسبت به پلیمرهای سنتزی دارند که این باعث نایکنواختی



شکل ۳ اکسایش پلی سیالیک اسید

ترکیبات مزدوج آن‌ها با پروتئین می‌شود، اما با استفاده از جرم مولکولی‌های پایین این پلیمر (۲۰-۱۰ kDa)، می‌توان بر این محدودیت غلبه کرد [۶].

• اسیدهیالورونیک (Hyaluronic Acid (HA))

اسیدهیالورونیک جزء اصلی ماتریس خارج سلولی غضروف در مهره‌داران است و پلی‌ساکاریدی طبیعی است. این پلیمر دارای ساختار خطی ساده‌ای است که از واحدهای دی‌ساکاریدی تکرار شونده شامل D-گلوکورونیک اسید و N- استیل گلوکزامین تشکیل شده است.

اتصال مواد زیستی به HA می‌تواند از طریق فعال‌سازی گروه‌های کربوکسیلیک‌اسید موجود در ساختار این پلیمر انجام شود. در این روش که برای پیوندزنی HA به پروتئین از طریق گروه‌های آمینی مناسب است، امکان انجام واکنش شبکه‌ای شدن در پلیمر متصل شده به پروتئین، وجود دارد. درنتیجه روش اکسایش با پریدات که در مورد دکستران‌ها توضیح داده شد، برای تهیه ترکیب‌های مزدوج اسیدهیالورونیک با پروتئین نیز به کار گرفته می‌شود [۳، ۸]. روش متفاوت دیگری برای فعال‌سازی HA پیشنهاد شده است که در آن برخی از گروه‌های کربوکسیلیک در هیالورونیک‌اسید با پلیمری که دارای گروه آلدهید محافظت شده است، تحت واکنش قرار می‌گیرد و سپس با حذف گروه محافظت‌کننده، گروه آلدهیدی با پروتئین وارد واکنش می‌شود. این روش نتایج خوبی را در ارتباط با ترکیب پروتئین با پروتئین‌های مختلف و پپتیدها نشان داده است [۶،۱۲]. رایج‌ترین HA ها برای ترکیب با پروتئین‌ها یا داروها با جرم مولکولی در محدوده بین ۱۰۰ و ۳۰۰ kDa است. HA با جرم مولکولی بیشتر از حد بالایی، محلول آبی با گرانروی بالایی تشکیل می‌دهد که در اصلاح پروتئین‌ها مناسب نیست [۶].

• دکسترین (Dextrin)

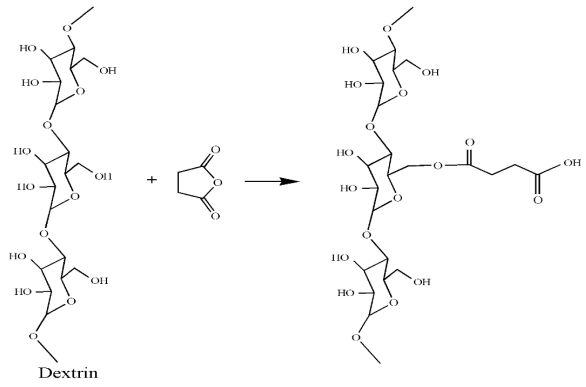
دکسترین‌ها متشکل از واحدهای D-گلوکز هستند که توسط اتصالات α-۴،۱ گلوکزیدی به هم متصل شده‌اند و ساختار خطی تا حدی شاخه‌ای با اتصالات ۶،۱-گلوکزیدی دارند. این پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر که توسط آب‌کافت کنترل شده از نشاسته تولید می‌شود، در بدن توسط α-آمیلاز موجود در مایعات خارج سلولی تخریب می‌شود[۶].

این پلیمر برای اتصال به پروتئین‌ها سوکسینیل‌دار می‌شود. در این روش گروه سوکسینیک‌اسید یا سوکسینیک-انیدرید با گروه‌های هیدروکسیل دکسترین واکنش می‌دهد؛ درنتیجه گروه‌های کربوکسیل مناسب برای اتصال به پروتئین‌ها در پلیمر ایجاد می‌شود (شکل۴). دکسترین با درجه‌ای از سوکسله کردن و جرم مولکولی در محدوده ۴۷۲۰۰ Da- ۷۷۰۰ برای اصلاح پروتئین‌های مختلف مانند فسفولیپاز A2، تریپسین، ملانوسیت (تحریک‌کننده هورمونی) و ضریب رشد اپیدرمی مورد استفاده قرار گرفته است [۶].

• هیدروکسی اتیل نشاسته ((Hydroxyethyl-Starch (HES)

هیدروکسی‌اتیل‌نشاسته، پلی‌ساکارید غیریونی نیمه‌سنتزی است که توسط اصلاح شیمیایی گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت‌های C۲ و C۶ نشاسته به دست می‌آید. این پلیمر برای استفاده انسان به‌عنوان منبسط کننده حجم پلاسمای خون تأیید شده است. با توجه به حلالیت بالا در آب و امکان کنترل سرعت زیست‌تخریب‌پذیری این پلیمر، عده‌ای آن را جایگزین بالقوه برای PEG می‌دانند. البته تعداد مطالعات منتشر شده در ارتباط با پیوند زنی HES به پروتئین‌ها، نانوذرات و داروها، کم است و بیشتر این اطلاعات در ثبت اختراع‌ها (Patents) یافت می‌شود [۶].

ترکیب پروتئین با HES به‌طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز ((Trans Glutaminase TGase)) حاصل شده است. به‌طور خاص، اتصال این پلیمر به آنزیم با استفاده از دو روش انجام می‌گیرد: اول با تهیه مشتقات HES حاوی توالی‌های Z-Glu-Gly که دارای گروه‌های آسیلی و با آمینواسیدلیزین وارد واکنش



شکل ۴ طرح‌واره واکنش دکسترین با سوکسینیک انیدرید

می‌شوند. دوم توسط سنتز پلیمرهای HES آمین‌دار شده که می‌توانند به‌عنوان بستر آمین دهنده عمل کنند و در واکنش TGase به سمت گلوتامین (Glutamine) پروتئینی هدایت شوند. وجود نقاط اتصال زیاد در ساختار HES ممکن است منجر به ترکیب پروتئین- پلیمر شبکه‌ای شده شود، بنابراین زمان واکنش باید به‌درستی بهینه شود تا از این خطر جلوگیری شود [۶].

اگرچه HES پلیمر مناسبی برای ترکیب با پروتئین به نظر می‌رسد، اما نگرانی‌هایی در مورد ایمنی آن در ارتباط با افزایش خطر مرگ و آسیب کلیوی مخصوصاً در بیمارانی که داروی منبسط کننده‌ی پلاسما مصرف می‌کنند، وجود دارد [۶,۱۳]. با توجه به این گزارش‌ها، کمیته ارزیابی خطر اداره داروسازان اروپا توصیه کرده است که هیدروکسی اتیل نشاسته، دیگر برای درمان بیماران مبتلا به سپسیس (Sepsis) (عفونت باکتریایی در خون (یا بیماران سوختگی به علت افزایش خطر آسیب‌های کلیوی و مرگ‌ومیر، استفاده نشود [۶].

• پلی (۲-اتیل-۲-اکسازولین)

(Poly(2-ethyl 2-oxazoline) (PEOZ))

PEOZ پلیمری مصنوعی خطی است که در آب و بسیاری از حلال‌های آلی محلول است و به‌عنوان جایگزینی مناسب برای PEG در نظر گرفته می‌شود [۶,۱۴,۱۵]. PEOZ مانند PEG، می‌تواند با پراکندگی کم وزن مولکولی تولید شود و دارای گروه عاملی در انتهای خود است که می‌تواند به پروتئین متصل شود. خواص PEOZ به‌طور مستقیم متناسب با جرم مولکولی و درنتیجه، حجم هیدرودینامیک آن است که در جرم مولکولی یکسان، اندکی کمتر از PEG است. مطالعات در موش‌ها نشان داد که این پلیمرها در بدن تجمع پیدا نمی‌کنند و عمدتاً توسط کلیه و به میزان کمی توسط کبد، از بدن زدوده می‌شوند. با توجه به شباهت PEOZ به PEG انتقال دانش شیمی و نحوه فعال کردن و اتصال این پلیمر به پروتئین نسبتاً آسان است. PEOZ با گروه انتهایی هیدروکسیل تولید می‌شود که می‌تواند فعال شود و به نوبه خود، با پلیمرهای دیگر که دارای گروه‌های عاملی مناسب هستند واکنش دهد و PEOZهای کربوکسیل، آمین، مالئیمید و آلدهیددارشده تهیه شود. این مشتقات انتخاب گسترده‌ای از واکنش‌های شیمیایی برای ترکیب شدن این پلیمر با پروتئین را ارائه می‌دهند.

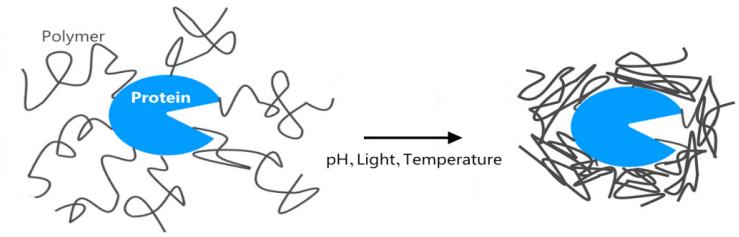
تاکنون، ترکیبات پروتئین با PEOZ تنها در مدل‌های حیوانی مورد بررسی قرارگرفته است، اما این پلیمر حتی با گروه‌های جانبی آویزان که برای ترکیب شدن با داروهای با وزن مولکولی کم نیز استفاده می‌شود، هیچ‌گونه سمیتی نداشته است و نتایج مثبتی را نشان داده است [۶].

امکان سنتز PEOZ با گروه‌های جانبی آویزان شاید مزیت اصلی این پلیمر نسبت به PEG در رابطه با رهایش داروهای کوچک باشد. درهرصورت PEOZ باید کاربرد خاص خود را در زمینه ترکیبات مزدوج پروتئین- پلیمر پیدا کند. البته شباهت آن به پلیمری مانند PEG که مدت طولانی است در مصارف بالینی ایمن استفاده می‌شود، ممکن است ضعف آن محسوب شود [۶].

۵ ترکیبات پروتئین- پلیمر هوشمند (Smart Polymer–Protein Conjugation)

ترکیبات پروتئین- پلیمر هوشمند از اتصال پلیمر پاسخگو به تحریک خارجی به پروتئین تهیه می‌شوند و در آن‌ها تغییر عامل تحریک خارجی مانند pH، دما یا نور باعث تغییر صورت‌بندی پلیمر از حالت بازشده (Expanded) به حالت فروپاشیده (Collapsed) یا برعکس، می‌شود (شکل۵). پلیمرهای پاسخگو به تحریک خارجی به واسطه تغییرات صورت‌بندی، در مقایسه با پلیمرهای معمولی ذکر شده در قسمت‌های قبل باعث پایداری بیشتر پروتئین‌ها در شرایط غیرطبیعی آن‌ها می‌شوند. مطالعه بر روی این ترکیبات از سال ۱۹۸۰ آغاز شد. در این مطالعات پلیمرهای کربوکسیلاتی به پروتئین‌ها پیوند زده می‌شد که در pHهای پایین یا در اثر افزودن یون‌های کلسیم، جدایی فازی رخ می‌داد. در سال ۱۹۸۰ هافمن و همکارانش پلیمر حساس به دمای پلی N- ایزوپروپیل آکریلامید را بر روی پادتن بررسی کردند و روش جدید جداسازی مولکول‌های زیستی با استفاده از حرارت را گزارش کردند. از آن زمان تاکنون مطالعات زیادی در زمینه اصلاح پروتئین‌ها توسط پلیمرهای هوشمند برای کاربردهای مختلف ازجمله فرایندهای آنزیمی، داروررسانی، تشخیص و درمان توسط پروتئین‌ها و حسگرهای زیستی انجام گرفته است[۱۶,۱۷].

راسل (Russell) و همکارانش ترکیب مزدوج پروتئین –پلیمر حساس به pH را با پیوند زدن پلی(۲- (دی متیل آمینو) اتیل متاکریلات) بر سطح آنزیم کیموتریپسین



شکل ۵ طرح‌واره عملکرد ترکیبات مزدوج پروتئین- پلیمر هوشمند

(Chymotrypsin) تهیه کردند. آن‌ها مشاهده کردند که با کاهش pH، در اثر پروتون‌دار شدن آمین‌های موجود در ساختار پلیمر، فعالیت کاتالیزوری و کارایی آنزیم در شرایط اسیدی حفظ می‌شود. آن‌ها همچنین نشان دادند که در pH برابر ۷ به علت دافعه بین بارهای مثبت در ساختار پلیمر و ممانعت از نزدیک شدن پروتئین‌ها به یکدیگر و درنتیجه کاهش فرایند تخریب خودبه‌خودی (Autolysis)، فعالیت زیستی آنزیم‌های اصلاح شده در دمای ۴۱ °C پس از گذشت ۷ روز تا ۸۱ درصد فعالیت اولیه باقی مانده است [۱۸].

در تحقیق دیگری راسل و همکارانش نشان دادند که پایداری آنزیم کیموتریپسین در دماهای ۲۵ و ۴۰ °C، پس از اصلاح با پلیمرهای پلی[N، N'-دی‌متیل (متاکریلویل اتیل) آمونیوم پروپان سولفونات] (pDMAPS) و پلی(N-ایزوپروپیل آکریلامید) (pNIPAM) به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. در دمای ۲۵ °C هر دو پلیمر در حالت بازشده هستند و با ایجاد ممانعت فضایی مانع انجام فرایند تخریب خودبه‌خودی آنزیم می‌شوند، اما در دمای ۴۰ °C که بالاتر از دمای پایینی بحرانی انحلال (LCST) برای pNIPAM است، این پلیمر در حالت فروپاشیده قرار می‌گیرد و مانند لایه محافظ در اطراف آنزیم، مانع از انجام فرایند تخریب خودبه‌خودی آن می‌شود و در مقایسه با pDMAPS که در حالت بازشده خود قرار دارد باعث افزایش پایداری حرارتی بیشتر آنزیم کیموتریپسین می‌شود [۱۹].

لی (Li) و همکاران، با پیوند زنی پلی (N- ایزوپروپیل آکریلامید) بر سطح پروتئین آلبومین، ترکیب مزدوج حساس به دما تهیه کردند. آن‌ها مشاهده کردند که با اتصال این پلیمر میزان آب‌کافت آنزیمی آلبومین در دمای ۲۵ و ۳۷ °C به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است.

همچنین با افزایش چگالی زنجیرهای پلیمری از ۵ به ۱۱، میزان مقاومت به تخریب افزایش یافت. علاوه بر آن، میزان تخریب آلبومین اصلاح نشده در دمای ۲۵ °C بیشتر از ۳۷ °C بود، درحالی‌که در اثر اصلاح، میزان تخریب آلبومین در دمای ۳۷ °C کمتر از ۲۵ °C بود. این نتایج مؤید این است که pNIPAM در دمای ۳۷ °C که بالاتر از دمای LCST آن است به حالت فروپاشیده درمی‌آید و از پروتئین محافظت بیشتری می‌کند [۲۰].

۶ عوامل مهم در تهیه ترکیبات مزدوج پروتئین- پلیمر

۶-۱ محل‌های اصلاح

تعیین دقیق موقعیتی از پروتئین که وارد واکنش با پلیمرها می‌شود یکی از عوامل مهم در تهیه ترکیبات پروتئین- پلیمر است و به‌طور چشمگیری در عملکرد نهایی پروتئین تأثیر می‌گذارد. معمول‌ترین موقعیت‌ها در هر پروتئین برای اصلاح، گروه‌های آمینی آمینواسید لیزین، آمینواسید هیستیدین (Histidine)، گروهای تیول در آمینواسید سیستین و اتم‌های سولفور آزاد شده از پیوندهای دی‌سولفیدی هستند [۲۱].

لو (Lu) و همکارانش آنزیم کیموتریپسین را با پلی [N-(۲-هیدروکسی پروپیل) متاکریلامید] (pHPMA) در موقعیت‌های لیزین و اسپارتیک/گلوتامیک اسید (Aspartic/Glutamic Acid) اصلاح کردند و مشاهده کردند که ترکیبات حاصل از اتصال پلیمر به گروه‌های آمینی به لیزین، نسبت به آنزیم اصلاح نشده فعالیت بیشتری دارند درحالی‌که در ترکیباتی که در آن‌ها پلیمر به گروه‌های کربوکسیلیک اسیدی در اسپارتیک/گلوتامیک اسید متصل شد، فعالیت آنزیمی کاهش یافته است [۲۲].

به‌طورکلی تعیین مکانی که برای اصلاح پروتئین

انتخاب می‌شود برای دستیابی به خواص مورد نظر ضروری است.

۶-۲ جرم مولکولی پلیمر و چگالی اتصالات

جرم مولکولی پلیمر و چگالی اتصالات زنجیر پلیمر بر سطح پروتئین، از عوامل دیگری است که نقش مهمی بر عملکرد ترکیبات پروتئین-پلیمر دارد. عوامل مختلفی مانند نسبت استوکیومتری پلیمر به پروتئین، زمان و دمای واکنش بر چگالی اتصالات تأثیر می‌گذارند. به‌طورمعمول تصور می‌شود که افزایش تعداد و طول زنجیر پلیمری باعث ایجاد محدودیت در نفوذ سوبسترا به آنزیم و کاهش فعالیت آنزیمی می‌شود. به‌هرحال نمی‌توان روندی کلی برای تمام ترکیبات پروتئین-پلیمر در نظر گرفت، زیرا تنها نقش ممانعت در برابر نفوذ نیست که بر خواص پروتئین اثر دارد بلکه پلیمر می‌تواند باعث تغییر ساختار سه‌بعدی پروتئین و درنتیجه فعالیت آن شود. در کل، می‌توان گفت که جرم مولکولی و چگالی اتصالات تمام پلیمرهای وینیلی اثر مشابهی مانند پگیله شدن بر یک پروتئین خاص دارند [۲۱,۲۳].

رودریگز مارتینز (Rodriguez-Martinez) و همکاران با بررسی تأثیر جرم مولکولی و تعداد زنجیرهای PEG بر فعالیت و پایداری حرارتی آنزیم کیموتریپسین نشان دادندکه با افزایش جرم مولکولی و تعداد زنجیرهای PEG در سطح آنزیم، مقاومت حرارتی آن به علت ممانعت فضایی ایجاد شده توسط زنجیرهای پلیمری در اطراف آنزیم و کاهش امکان فرایند تخریب خودبه‌خودی آنزیم افزایش یافت. به‌طوری‌که با اتصال ۸ زنجیر پلیمری با جرم مولکولی ۵۰۰۰، با گذشت۲/۵ ساعت و در دمای ۴۵ °C، ۶۰ درصد از فعالیت اولیه آنزیم حفظ شد درحالی‌که آنزیم اصلاح نشده به‌طور کامل فعالیت خود را از دست داد [۲۴].

لیسیوس (Licius) و همکاران با بررسی اثر گروه‌های عاملی و جرم مولکولی پلیمر بر پایداری آنزیم لیزوزیم، نتیجه گرفتند که در اثر افزایش جرم مولکولی و ممانعت فضایی و کاهش میزان نفوذ سوبسترا به آنزیم، فعالیت آنزیم کاهش یافته است و در جرم مولکولی‌های بالای پلیمر) بیشتر از ۱۴۰۰۰ (فعالیت آنزیم از بین رفته است. همچنین به علت ایجاد پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های یونی گروه‌های عاملی پلیمر با آنزیم، پایداری شیمیایی آنزیم در HCl گوانیدین افزایش یافته است. علاوه بر این، آن‌ها مشاهده کردند که در اثر اصلاح لیزوزیم با پلیمرهای آکریلیک اسید در pH=۱ به دلیل تشکیل گروه‌های آنیونی و دافعه‌ایجاد شده بین بارهای منفی این گروه‌ها با باکتری M.lysodeikticu که دارای بار منفی است، فعالیت آنزیم کاهش می یابد درحالی‌که در اثر اصلاح این آنزیم با پلیمرهای دارای گروه‌های کاتیونی به دلیل نیروی جاذبه بین بارهای مثبت ترکیب مزدوج و بارهای منفی باکتری M.lysodeikticus فعالیت آنزیمی به‌مراتب بیشتر خواهد بود [۲۵].

۶-۳ ساختار پلیمر

ساختار پلیمر ازلحاظ خطی یا شاخه‌ای بودن، سفتی و سختی تأثیر زیادی بر خواص ترکیب‌های پروتئین-پلیمر دارد. در وزن مولکولی مشخص، پلیمرهای پر شاخه، ساختار فشرده و سخت‌تری را نسبت به پلیمرهای خطی انعطاف‌پذیر در محلول دارند، بنابراین این پلیمرها نسبت به پلیمرهای خطی منعطف که می‌توانند روی سطح پروتئین پخش شوند ممکن است اثر کمتری بر پروتئین داشته باشند .همچنین در مقایسه با پلیمرهایی که دارای صورت‌بندی مارپیچ تصادفی هستند، در پلیمرهای پر شاخه میزان در هم فرورفتگی زنجیرهای پلیمری کمتر است و نمی‌توانند مانع یکنواختی در مقابل نفوذ مولکول‌های کوچک در اطراف پروتئین تشکیل دهند. بر اساس تحقیقات انجام شده ، به‌طور دقیق مشخص نیست که چه ساختار پلیمری می‌تواند مقاومت پروتئین در برابر واسرشتی و تخریب حرارتی و پروتئینی را بدون کاهش فعالیت آنزیمی، افزایش دهد. البته مشخص شده است که پلیمر با ساختار سفت و سخت ناشی از شاخه‌ای شدن، تاخوردگی یا حضور گروه‌های جانبی حجیم به دلیل عدم توانایی این پلیمرها برای پخش روی سطح پروتئین و تداخل با محل‌های فعال در آن، به میزان کمتری بر فعالیت آنزیمی اثر می‌گذارد. علاوه بر آن، پلیمر با ساختار سخت باعث می‌شود تا ترکیب مزدوج پروتئین- پلیمر نیز ساختار سختی داشته باشد و مقاومت بیشتری برابر واسرشتی حرارتی نشان دهد [۲۳].

۶-۴ روش‌های اتصال پلیمرها به پروتئین‌ها

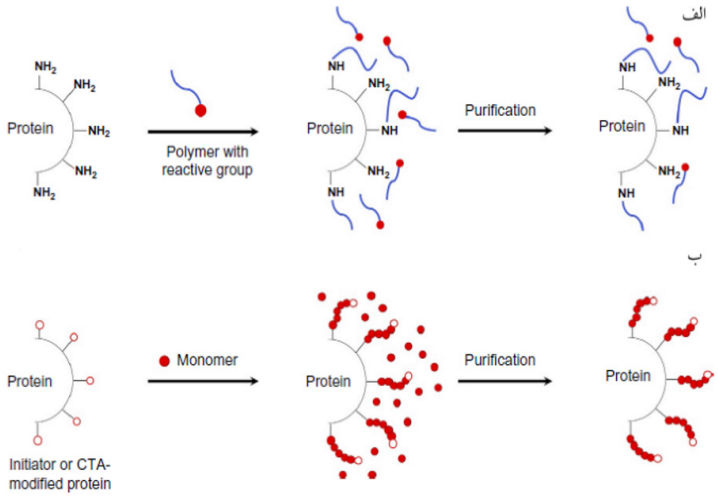
روش‌های بسیاری برای تهیه‌ی ترکیبات مزدوج پروتئین- پلیمر وجود دارد. در روش‌های قدیمی ابتدا پلیمر در حلال سنتز می‌شد و سپس انتهای آن با گروه‌های عاملی خاص برای اتصال به پروتئین‌ها، عامل دار می‌شد. این روش که فرایندهای پگیله شدن

نیز توسط آن انجام می‌شود" پیوند به" (Grafting to) نامیده می‌شود. در روش جدید دیگری که"پیوند از" (Grafting from) نام دارد ابتدا آغازگر به سطح پروتئین متصل می‌شود و سپس مونومرها با این آغازگرها واکنش می‌دهند و پلیمری‌شدن در سطح پروتئین انجام می‌شود (شکل۶). روش"پیوند از" دارای برتری‌هایی نسبت به روش"پیوند به" است. در روش"پیوند از" خالص‌سازی ترکیب مزدوج آسان است زیرا مونومرهای واکنش نداده به‌راحتی توسط روش‌های فراصوت دهی یا دیالیز حذف می‌شوند .همچنین در استفاده از روش "پیوند به" به علت ممانعت فضایی زیاد زنجیرهای پلیمری، امکان تهیه‌ی ترکیب‌های مزدوج با چگالی اتصالات بالا وجود ندارد درحالی‌که در روش" پیوند از" به دلیل عدم ممانعت فضایی مونومرها، امکان بالا بردن چگالی اتصالات وجود دارد [۷،۱۸،۲۵،۲۶].

در پلیمری‌شدن مونومرها روی سطح پروتئین با روش" پیوند از"، پلیمری‌شدن رادیکالی زنده از جمله پلیمری‌شدن رادیکالی انتقال اتم (Atom Transfer Radical Polymerization) و انتقال به زنجیر افزایشی- جدایشی برگشت پذیر (Reversible-Addition Fragmentation Chain Transfer) به کار گرفته می‌شود .در این روش‌ها امکان کنترل بسیار خوب جرم مولکولی زنجیر پلیمری و ضخامت لایه پلیمری تشکیل شده روی پروتئین وجود دارد. علاوه بر آن، پراکندگی جرم مولکولی زنجیرهای پلیمری بسیار کم خواهد بود و ترکیب‌های مزدوج پروتئین- پلیمر بسیار یکنواختی حاصل خواهد شد که خواص بسیار مشابه با یکدیگر و با تکرارپذیری بالا نشان می‌دهند. همچنین این واکنش‌ها در شرایط مساعد برای پروتئین‌ها (حلال آبی و دمای اتاق)، انجام می‌شود [۷،۱۶،۲۵].

۶-۵ پایدار سازی پروتئین‌ها در حلال‌های آلی

اگر آنزیم‌ها در حلال‌های آلی حل شوند، می‌توانند بسیاری از واکنش‌ها مانند تبادل استری یا آمینولیز را با فضاگزینی و اناتیوگزینی بیشتری کاتالیز کنند. اما فعالیت آنزیم در محیط‌های آلی به دلیل اثرات ساختاری حلال بر آن‌ها و اتصالات ضعیف سوبسترا به آنزیم، معمولاً چندین مرتبه کمتر از آب است. در حلال‌های غیر قطبی، بعضی از آنزیم‌ها پایداری ساختاری و شکل فضایی خود را حفظ می‌کنند زیرا برهم‌کنش‌های بین حلال غیر قطبی و آنزیم، ایجاد ساختار کروی آنزیم را مطلوب می‌کند. در مقابل، فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌ها در این حلال‌ها به علت عدم تحرک کافی کاهش می‌یابد. در حلال‌های قطبی مانند استونیتریل، مولکول‌های آب از آنزیم خارج می‌شوند که موجب واسرشتی آنزیم می‌شود. با این هدف، راسل و همکاران ترکیب مزدوج آنزیم کیموتریپسین با پلی(۲- (دی‌متیل آمینو) اتیل متاکریلات) (CT-pDMAEMA) را برای انحلال و فعالیت در حلال استونیتریل تهیه کردند. آن‌ها مشاهده کردند که CT-pDMAEMA در حلال‌های آلی در مقیاس مولکولی حل می‌شود و میزان فعالیت کاتالیزوری CT-pDMAEMA برای واکنش تبادل استری در استونیتریل بسیار بیشتر از آنزیم اصلاح نشده است. نتایج این



شکل۶ طرح‌واره روش های الف)"پیوند به" و ب) "پیوند از" در اصلاح پروتئین‌ها

مطالعه گامی مهم در زمینه آنزیم‌شناسی در محیط‌های غیرآبی را فراهم کرده است [۲۷].

۷ نتیجه‌گیری

پروتئین‌ها و آنزیم‌ها جزو ترکیبات زیستی حیاتی در موجودات هستند که وظایف مختلفی را بر عهده دارند. متأسفانه این ترکیبات در برابر عواملی مانند تخریب توسط دیگر پروتئین‌ها، تخریب خودبه‌خودی، واسرشته شدن در دمای بالا و pHهای خارج از محدوده طبیعی بسیار حساس هستند و تغییر شرایط طبیعی آن‌ها موجب از بین رفتن خواص و فعالیت زیستی آن‌ها می‌شود. از طرفی در بسیاری از کاربردها مانند شناسایی شیمیایی و فیزیولوژیکی پروتئین‌ها، پروتئین درمانی و سامانه‌های رهایش دارو، ممکن است پروتئین‌ها در شرایطی غیر از شرایط طبیعی قرار گیرند. اصلاح و پایدارسازی پروتئین‌ها با استفاده از پلیمرها از جمله روش‌هایی است که بسیار مورد توجه قرار گرفته است و نتایج مطالعات تا به امروز بیانگر کارایی این روش بوده است. با پیوند زدن پلیمرهای مختلف بر سطح پروتئین‌ها می‌توان آن‌ها را در شرایط نامساعد پایدار و پروتئین‌های ناشناخته شناسایی و مطالعه کرد و همچنین گستره کاربری آن‌ها را افزایش داد.

مراجع

۱- لامع راد ب.، رضایی زارچی س.، "پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک"، انتشارت پیام نور، ۱۳۹۰.

2. Jain J., "Fundamentals of Biochemistry" , New Dehli, **2005**.

3. Privalov P. L., Gill S. J., "Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interaction.", *Advances in Protein Chemistry*, 39, 191–234, **1988**.

4. Tanford C., "Protein Denaturation" , *Adv. Protein Chem*., 121–282, **1968**.

5. Hu Z., Ho J. C. S., Nallani M., "Synthetic (polymer) Biology (Membrane): Functionalization of Polymer Scaffolds for Membrane Proteins", *Current Opinion in Biotechnology*, 46, 51–56, **2017**.

6. Hoogenboom R., "Polymers for Protein Conjugation" , *Angewandte Chemie International Edition,* 48, 43, 7978–7994, **2009**.

7. Cummings C., Murata H., Koepsel R., Russell A. J., "Dramatically Increased pH and Temperature Stability of Chymotrypsin Using Dual Block Polymer-based Protein Engineering", *Biomacromolecules*, 15, 3, 763–771, **2014**.

8. Wileman T. E., Foster R. L., Elliott P. N. C., "Soluble Asparaginase-dextran Conjugates Show Increased Circulatory Persistence and Lowered Antigen Reactivity", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 38, 4, 264–271, **1986**.

9. Jain S., Hreczuk-Hirst D. H., McCormack B., Mital M., Epenetos A., Laing P., Gregoriadis G., "Polysialylated Insulin: Synthesis, Characterization and Biological Aactivity in Vivo", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1622, 1, 42–49, **2003**.

10. Constantinou A., Epenetos A. A., Hreczuk-Hirst D., Jain S., Wright M., Chester K. A. Deonarain M. P., "Site-Specific Polysialylation of an Antitumor Single-Chain Fv Fragment", *Bioconjugate Chemistry*, 20, 5, 924–931, **2009**.

11. Yang J.-A., Park K., Jung H., Kim H., Hong S. W., Yoon S. K. Hahn SK., "Target Specific Hyaluronic Acid–interferon Alpha Conjugate for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection", *Biomaterials*, 32, 33, 8722–8729, **2011**.

12. Mero A., Pasqualin M., Campisi M., Renier D., Pasut G., "Conjugation of Hyaluronan to Proteins", *Carbohydrate Polymers*, 92, 2163–2170, **2013**.

13. Zarychanski R., Abou-Setta A. M., Turgeon A. F., Houston B. L., McIntyre L., Marshall J. C. Fergusson DA., "Association of Hydroxyethyl Starch Administration With Mortality and Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients Requiring Volume Resuscitation", *JAMA*, 309, 7, 678, **2013**.

14. Mero A., Pasut G., Via L. D., Fijten M. W. M., Schubert U. S., Hoogenboom R., "Synthesis and Characterization of Poly(2-ethyl 2-oxazoline)-conjugates with Proteins and Drugs: Suitable Alternatives to PEG-conjugates?", *Journal of Controlled Release*, 125, 2, 87–95, **2008**.

15. Hoogenboom R., "Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications", *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 43, 7978–7994, **2009**.

16. Cobo I., Li M., Sumerlin B. S., Perrier S., "Smart Hybrid Materials by Conjugation of Responsive Polymers to Biomacromolecules", *Nature Materials, Nature Publishing Group*, 14, 2, 143–149, **2015**.

17. Hoffman A. S., Stayton P. S., "Conjugates of Stimuli-responsive Polymers and Proteins", *Progress in Polymer Science*, 32, 8–9, 922–932, **2007**.

18. Murata H., Cummings C. S., Koepsel R. R., Russell A. J., "Polymer-Based Protein Engineering Can Rationally Tune Enzyme Activity, pH-Dependence, and Stability" , *Biomacromolecules*, 14, 6, 1919–1926, **2013**.

19. Cummings C., Murata H., Koepsel R., Russell A. J., "Tailoring Enzyme Activity and Stability Using Polymer-based Protein Engineering", *Biomaterials*, 34, 30, 7437–7443, **2013**.

20. Tan H., Zhao L., Liu W., Ren L., Xu S., Chen L., Li W., "Synthesis of Thermo-responsive Polymer–protein Conjugates Through Disulfide Bonding" , *RSC Adv*., 4, 104, 60413–60420, **2014**.

21. Carmali S., Murata H., Cummings C., Matyjaszewski K., Russell A. J., "Polymer-Based Protein Engineering: Synthesis and Characterization of Armored, High Graft Density Polymer–Protein Conjugates", 1st, Elsevier Inc., **2017**.

22. Lu Z., Kopečková P., Wu Z., Kopeček J., "Functionalized Semitelechelic Poly[N -(2-hydroxypropyl)methacrylamide] for Protein Modification", *Bioconjugate Chemistry*, 9, 6, 793–804, **1998**.

23. Gauthier M. A., Klok H.-A., "Polymer–protein Conjugates: an Enzymatic Activity Perspective", *Polymer Chemistry*, 1, 9, 1352, **2010**.

24. Rodríguez-Martínez J. A., Rivera-Rivera I., Solá R. J., Griebenow K., "Enzymatic Activity and Thermal Stability of PEG-α-chymotrypsin Conjugates", *Biotechnology Letter*s, 31, 6, 883–887, 2009.

25. Lucius M., Falatach R., McGlone C., Makaroff K., Dan-

ielson A., Williams C., "Investigating the Impact of Polymer Functional Groups on the Stability and Activity of Lysozyme-Polymer Conjugates", *Biomacromolecules*, 17, 3, 1123–1134, **2016**.

26. Cummings C. S., Fein K., Murata H., Ball R. L., Russell A. J., Whitehead K. A., "ATRP-Grown Protein-polymer Conjugates Containing Phenylpiperazine Selectively Enhance Transepithelial Protein Transport", *Journal of Controlled Release*, 255, 270–278, **2017**.

27. Cummings C. S., Murata H., Matyjaszewski K., Russell A. J., "Polymer-Based Protein Engineering Enables Molecular Dissolution of Chymotrypsin in Acetonitrile", *ACS Macro Letters*, 5, 4, 493–497, **2016**.