

Affinity Maturation of Herceptin via Rational Design of a Point Mutation: A Molecular Dynamic Simulation Study

M. Jamal^{1*}, E. Barzegari Asad-Abadi²

1, 2, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar

(Received: Mar. 16, 2012; Accepted: Jul. 11, 2012)

Abstract

Overexpression and malfunction of human epidermal receptors (HERs) is associated with occurrence of malignancy in various tissues. Among EGFRs, HER2 as an orphan receptor could dimerize and activate without presence of any kind of ligands. Overexpression of HER2 has significant role in incidence of breast cancer. Herceptin, an approved therapeutic monoclonal antibody, targets extracellular domain of HER2 which result to inhibition of dimerization and consequently blocking induction of intracellular signaling cascades. Efficiency of point mutation, which is offered based on rational design approach for affinity maturation of Herceptin, was investigated by 10 ns of molecular dynamic simulation. According to our results, Herceptin with mutated light chain make a more stable complex with HER2 compared to wild type. Asp92 in mutated VL of Herceptin constructs a stable salt bridge with Lys569 on HER2 which decreases the electrostatic energy between VL of Herceptin and HER2 thereby affects RMSD values of IV-HER2 during 10 ns of MD simulation. Herceptin (VL; Tyr92Asp)-HER2 complex showed lower level of total energy during allover of MD simulation in comparison with Herceptin-HER2 complex. Our molecular modeling investigation demonstrated that affinity maturation of Herceptin through rational design could be improved via mutation of Tyr92 to Asp in VL chain of antibody. Affinity improvement of Herceptin for HER2 could lead to increase efficiency and reduction in dose or frequency of administrations.

Keywords: EGFRs, HER2, Herceptin, Rational design of point mutation, Molecular dynamic simulation.

طراحی جهش نقطه‌ای به منظور افزایش تمایل آنتی‌بادی درمانی هرسپتین به HER2 با استفاده از روش‌های مدل‌سازی دینامیک مولکولی

مصطفی جمالان^{۱*}، ابراهیم برزگری اسدآبادی^۲

۱، ۲، عضو هیئت علمی گروه بیوفیزیک، بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی،

واحد شوشتر

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲۵، تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۴/۲۱)

چکیده

بیان غیرمعمول و عملکرد نامتعارف گیرنده فاکتورهای رشد اپیدرمی (EGFRs) می‌تواند عامل ایجاد کننده بدخیمی در بافت‌های مختلف باشد. از میان تمامی اعضای خانواده EGFRs، HER2 گیرنده‌ای می‌باشد که در عدم حضور لیگاند نیز می‌تواند دایمر شده و فعال گردد. HER2 دارای نقش مهمی در ایجاد سرطان پستان است. داروی هرسپتین یک آنتی‌بادی مونوکلونال می‌باشد که در دیمین خارجی HER2 را هدف قرار داده و مانع از ایجاد دایمرهای فعال و القای آبخار پیام رسانی درون سلولی می‌گردد. در این پژوهش جهش‌های نقطه‌ای به منظور افزایش تمایل هرسپتین به HER2 با استفاده از روش‌های مدل‌سازی منطقی طراحی شده و در نهایت میزان کارایی مؤثرترین جهش نقطه‌ای با استفاده از روش مدل‌سازی دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده هرسپتین دارای جهش Tyr92Asp در زنجیره سبک، کمپلکس پایدارتری را نسبت به شکل وحشی با HER2 ایجاد کرده و Asp92 می‌تواند یک پل نمکی پایدار با Lys569 از HER2 ایجاد کند که باعث کاهش انرژی الکتروستاتیک بین آنتی‌بادی هرسپتین با HER2 گردد. با توجه به مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد که هرسپتین به عنوان یک آنتی‌بادی مونوکلونال دارای پتانسیل لازم به منظور افزایش تمایل به HER2 می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، HER2، هرسپتین، طراحی هوشمند جهش نقطه‌ای، مدل‌سازی دینامیک مولکولی.

مقدمه

گیرنده‌های فاکتور رشد به همراه قسمت درون سلولی خود که دارای نقش کینازی می‌باشد دارای نقش بسیار مهمی در رشد سلول‌ها، زنده ماندن، میزان چسبندگی، مهاجرت و تمایز سلول‌ها می‌باشند (Yarden, 2001). خانواده گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی (EGFRs) که در انسان HER خوانده می‌شوند از چهار گیرنده تراغشایی تشکیل شده است (Yarden, 2001). خانواده EGFRs دارای سه قسمت با عملکرد متفاوت می‌باشد که عبارتند از دمین خارجی متصل‌شونده به لیگاند، دمین هیدروفوبیک تراغشایی و یک دمین سیتوپلاسمی با قابلیت تیروزین کینازی (Yarden, 2001).

اتصال لیگاند به EGFR باعث القا و کنار هم قرار گرفتن گیرنده‌ها و در نهایت باعث شکل‌گیری ساختارهای همو و یا هترودمیری گیرنده‌ها می‌گردد (Yarden and Sliwkowski, 2001; Wiley, 2003). شکل‌گیری ساختارهای دیمیری به فعال شدن خصوصیت تیروزین کینازی گیرنده‌ها و فسفریله شدن ساختارهای درون سلولی گیرنده‌ها می‌انجامد که فعال سازی مسیرهای پیام رسانی درون سلولی به دنبال دارد (Qu, 2002). HER2 (که ERBB2 نیز خوانده می‌شود) دارای هیچ‌گونه لیگاند اختصاصی نمی‌باشد و هیچکدام از لیگاندهای اختصاصی خانواده HER قابلیت اتصال به آن را ندارند. به همین دلیل HER2 تنها می‌تواند در حضور فعال دیگر خانواده‌های EGFR (مانند HER3) دارای فعالیت قابل توجه باشد (Stern and Kamps, 1988). بنابراین در حضور لیگاندهای متفاوت شکل‌گیری هترودمیرهای HER2 بسیار محتمل‌تر از دیگر هترومرها و یا همومرها می‌باشد (Tzahar et al., 1996). HER2 همواره به همراه دیگر اعضای خانواده EGFR بیان می‌گردد از این رو به عنوان یک عامل اصلی در انتقال پیام توسط خانواده EGFR شناخته می‌شود (Klapper et al., 1999). تا به امروز از انواع مختلف آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و همچنین ساختارهای شیمیایی مهار کننده فعالیت تیروزین کینازی (TKIs) جهت کنترل فعالیت EGFRs در سلول‌های سرطانی استفاده شده است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از طریق اتصال به قسمت خارج سلولی EGFRs و تحریک ایجاد واکنش‌های ایمونولوژیک مانند فعال ساختن سیستم کمپلمان و یا واکنش‌های ADCC و القای بازجذب کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن از طریق غشا، باعث مهار عملکرد این گیرنده می‌گردند (Harari, 2004). هرسپتین، آنتی‌بادی

مونوکلونالی می‌باشد که به شکل اختصاصی دمین IV از قسمت خارج سلولی HER2 را هدف قرار داده و بدین ترتیب مانع دیمر شدن و انتقال سیگنال به درون سلول و در نهایت مانع از رشد و تکثیر سلول می‌گردد (Shepard et al., 2008). افزایش تمایل آنتی‌بادی‌های درمانی نسبت به آنتی‌ژن مورد نظر نه تنها می‌تواند باعث کاهش دز مصرفی و به دنبال آن کاهش اثرات جانبی گردد بلکه در عین حال می‌تواند باعث کاهش دفعات تیمار و کاهش چشمگیر هزینه گردد (Carter, 2006). استفاده از جهش‌های نقطه‌ای طراحی شده از طریق روش‌های مدل‌سازی به منظور افزایش تمایل آنتی‌بادی به آنتی‌ژن روشی مؤثر (Lippow et al., 2007)، و در عین حال بسیار ساده‌تر در قیاس با روش‌هایی مانند تولید کتابخانه‌های ژنی می‌باشد (Carter, 2006).

مواد و روش‌ها

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس HER2-

هرسپتین

در اولین مرحله، فایل 1N8Z.pdb که حاوی ساختار بلوری کمپلکس-HER2 هرسپتین می‌باشد از بانک اطلاعات پروتئین تهیه گردید (Rose, Bi et al., 2013). به منظور صرفه جویی در زمان انجام فرایند شبیه‌سازی، تنها دمین‌های Fv از آنتی‌بادی هرسپتین و دمین IV از HER2 (IV-HER2) موجود در ساختار بلوری انتخاب شده و با استفاده از نرم‌افزار Gromacs شبیه‌سازی انجام شد. پس از اضافه نمودن اتم‌های هیدروژن و بهینه‌سازی اولیه، کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن در درون یک قفس آبی مکعبی شکل (مدل SPC) قرار گرفت. به منظور خشی‌سازی میزان بار پروتئین به تعداد مورد نیاز از یون‌های Na^+ و Cl^- استفاده گردید و به این ترتیب میزان بار سیستم به صفر رسانده شد. پس از خشی شدن کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن ساختار پروتئینی با استفاده از الگوریتم Steepest descent (SD) بهینه‌سازی گردید. پس از انجام فرایند بهینه‌سازی دمای ساختار کمپلکس HER2-هرسپتین به ۳۰۰ درجه کلوین رسانده شد و در طی ۱۰۰ پیکوثانیه از فرایند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و با استفاده از NVT ensemble متعادل شده و پس از آن در طی آخرین مرحله آماده‌سازی، ساختار پروتئینی در طی ۲۰۰ پیکوثانیه با استفاده از روش NPT ensemble به تعادل رسانده شد. در نهایت ساختار به تعادل رسیده در طی ۱۰ نانو ثانیه و با استفاده از GROMOS96 43a1 force field شبیه‌سازی گردید. به منظور شبیه‌سازی ساختارهای

همانگونه که در شکل ۱ نشان داده شده است ساختارهای جهش یافته نه تنها باعث ناپایداری کمپلکس HER2-هرسپتین نمی‌گردند، بلکه ساختارهایی پایدارتر را ایجاد می‌کنند. با توجه به تعداد محاسبه شده پیوندهای هیدروژنی، پل‌های یونی و میزان پایداری کمپلکس‌های مختلف آنتی‌بادی- آنتی‌ژن (جدول ۱) به نظر می‌رسد که شکل جهش‌یافته آنتی‌بادی (VL; Tyr92Asp) هرسپتین پایدارترین کمپلکس را با HER2 ایجاد می‌کند و بنابراین می‌تواند دارای بالاترین تمایل به‌منظور اتصال به HER2 باشد.

بررسی RMSD کمپلکس HER2-هرسپتین

RMSD مربوط به HER2 در حضور زنجیره سبک آنتی‌بادی هرسپتین و شکل جهش‌یافته آن (VL; Tyr92Asp) به حالت کمپلکس HER2-هرسپتین در طول ۱۰ نانوثانیه از فرایند شبیه‌سازی در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است. همانگونه که در تصویر شماره ۲A نشان داده است RMSD مربوط به زنجیره سبک هرسپتین و شکل جهش یافته آن (VL: Tyr92Asp) در طول فرایند شبیه‌سازی مشابه می‌باشد و به نظر می‌رسد که ایجاد جهش باعث ایجاد تغییرات عمده‌ای در ساختار زنجیره سبک آنتی‌بادی نمی‌گردد در حالی که ساختار جهش یافته هرسپتین می‌تواند اثرات گسترده‌ای را بر روی ساختار HER2 القا کند. همانگونه که در قسمت B شکل ۲ نشان داده شده است RMSD متفاوت HER2 در حضور شکل جهش یافته هرسپتین (VL; Tyr92Asp) نشان می‌دهد که ایجاد جهش نقطه‌ای Tyr92Asp می‌تواند باعث ایجاد تغییرات گسترده‌ای در ساختار HER2 در طول فرایند شبیه‌سازی در مقایسه با ساختار HER2 در حضور آنتی‌بادی وحشی گردد.

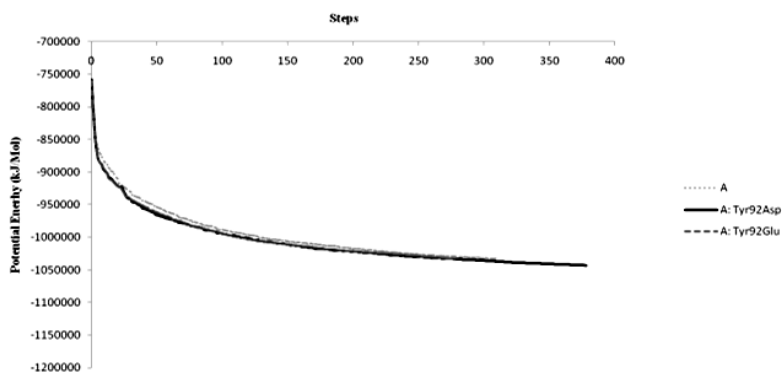
جهش یافته نیز از روش ذکر شده برای ساختار فوق استفاده شد. تمامی مراحل شبیه‌سازی و آنالیزهای انجام شده با استفاده از نرم‌افزار Gromacs 4.5.4 انجام شد (Van Der Spoel *et al.*, 2005) و تصاویر ارائه شده از ساختار بلوری با استفاده از نرم‌افزار VMD 1.8.7 تهیه گردید.

نتایج

جستجوی موقعیت مناسب برای ایجاد جهش نقطه‌ای

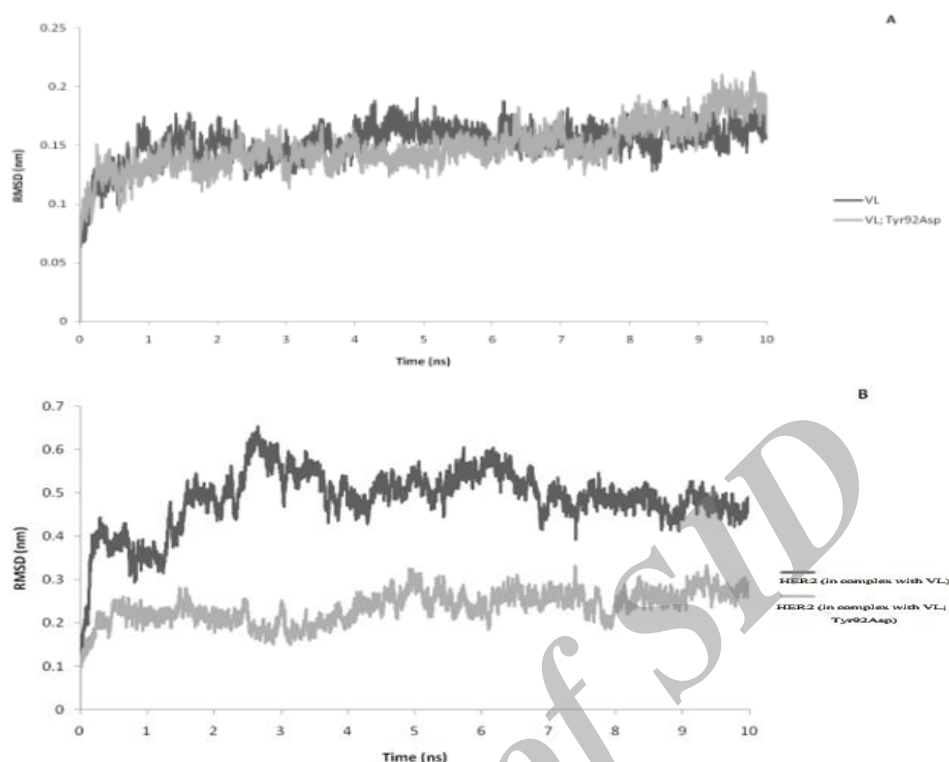
زنجیره سبک با داشتن برهم کنش‌های اندک با دمین IV از HER2 (IV-ERBB) می‌تواند دارای پتانسیل بالایی به منظور ایجاد جهش‌های هوشمند و در نتیجه افزایش تعداد برهم‌کنش‌ها با IV-HER2 باشد. اگرچه پیوندهای هیدروژنی دارای نقش بسیار مهمی در اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن هستند اما پل‌های نمکی می‌توانند دارای نقش موثرتری در اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن باشند (Sinha, Li *et al.*, 2007). از میان آمینواسیدهای متداول در ساختارهای پروتئینی، آمینواسیدهای دارای گروه‌های جانبی با خاصیت بازی (مانند لیزین، آرژنین) و آمینواسیدهای دارای گروه‌های جانبی با خاصیت اسیدی (مانند گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید) می‌توانند پل‌های یونی پایداری را ایجاد کنند. از میان موقعیت‌های موجود برای ایجاد جهش به نظر می‌رسد که با جایگزینی یک آمینواسید با زنجیره اسیدی (گلوتامیک اسید و یا آسپارتیک اسید) بتوان یک پل یونی پایدار را با آمینو اسید Lys569 از IV-HER2 ایجاد نمود.

با توجه به نکات ذکر شده، به منظور افزایش تمایل آنتی‌بادی هرسپتین از طریق ایجاد پل‌های نمکی، جهش‌های Tyr92Asp (شکل ۳) و Tyr92Glu در زنجیره سبک آنتی‌بادی هرسپتین مدل‌سازی شدند و برهم‌کنش‌های اشکال جهش‌یافته (پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی) با HER2 پس از بهینه‌سازی ساختارهای تولید شده محاسبه گردید.

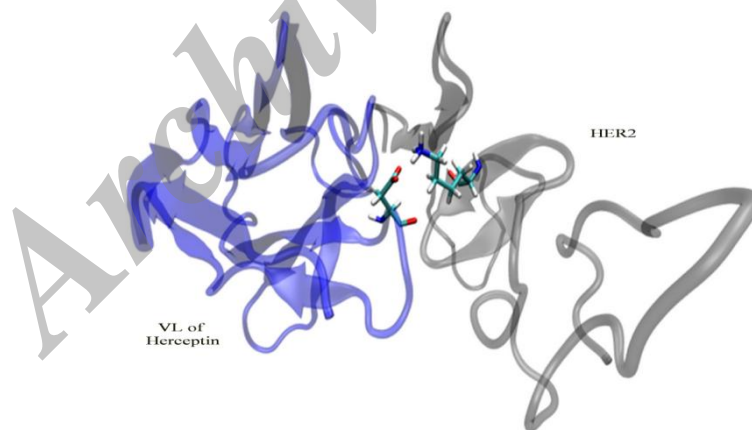


شکل ۱. میزان انرژی پتانسیل کمپلکس HER2-هرسپتین و اشکال جهش یافته (Tyr92Glu و Tyr92Asp)

هرسپتین در طی فرایند بهینه‌سازی



شکل ۲. RMSD مربوط به اسکلت زنجیره سبک آنتی‌بادی (VL) هرسپتین و شکل جهش‌یافته Tyr92Asp آن در طول ۱۰ نانوثانیه از فرایند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (A). RMSD مربوط به اسکلت HER2 در حضور زنجیره سبک از هرسپتین و شکل جهش‌یافته زنجیره سبک (B) (Tyr92Asp).



شکل ۳. موقعیت فضایی Asp92 در زنجیره جهش‌یافته سبک آنتی‌بادی هرسپتین نسبت به Lys569 در HER2

می‌گردد. آمینواسیدهای HER2 در نواحی (a) ۵۵۱-۵۶۱، (b) ۵۷۰-۵۷۳ و (c) ۵۹۳-۶۰۲ دارای نقش بسیار مهمی در اتصال HER2 به هرسپتین می‌باشند. از میان نواحی مورد اشاره نواحی a و c با استفاده از برهمکنش‌های الکتروستاتیک و ناحیه b توسط نیروهای هیدروفوب با هرسپتین واکنش می‌دهند (Cho *et al.*, 2003). میزان کارایی افزایش تمایل آنتی‌بادی به آنتی‌ژن مربوطه با استفاده از روش‌های

بحث

آنتی‌بادی‌ها غالباً با استفاده از آمینواسیدهای موجود در نواحی CDRs خود و از طریق پیوندهای هیدروژنی، ایجاد برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و نیروهای هیدروفوب به اپی‌توپ‌های خود که بر روی سطح آنتی‌ژن قرار دارند متصل می‌گردند (Davies and Cohen, 1996). هرسپتین به دمین IV در ناحیه‌ای در نزدیکی C ترمینال HER2 متصل

متصل می‌گردد. محاسبات مدل‌سازی نشان‌دهنده آن است که ایجاد جهش نقطه‌ای (Tyr92Asp) اگرچه باعث کاهش تعداد پیوندهای هیدروژنی مابین آنتی‌بادی هرسپتین و IV-HER2 می‌گردد (از ۲۰ پیوند هیدروژنی به ۱۹ پیوند) اما ایجاد پل یونی بین Asp92 با Lys569 از HER2 می‌تواند در عین حال باعث افزایش تعداد پل‌های یونی (از ۵ به ۸) گشته و در حالی که میزان انرژی الکتروستاتیک برای برهم‌کنش زنجیره سنگین آنتی‌بادی با IV-HER2 ثابت می‌ماند (جدول ۱). انرژی الکتروستاتیک برای برهم‌کنش زنجیره سبک آنتی‌بادی با IV-HER2 از $-۱۶۶/۳۱$ به $-۱۷۴/۹۴۳$ در شکل جهش‌یافته (VL; Tyr92Asp) کاهش می‌یابد. بنابر موارد یاد شده به نظر می‌رسد که ایجاد جهش نقطه‌ای Tyr92Asp در زنجیره سبک هرسپتین می‌تواند در نهایت منجر به افزایش تمایل آنتی‌بادی به IV-HER2 شود.

از سوی دیگر ایجاد جهش Tyr92Glu در زنجیره سبک آنتی‌بادی هرسپتین اگر چه به افزایش تعداد پل‌های یونی می‌انجامد اما زنجیره طویل زیرواحد گلوتامات جایگزین شده باعث از میان رفتن تعداد زیادی از پیوندهای هیدروژنی می‌گردد که در مجموع باعث ناپایدار شدن (افزایش انرژی الکتروستاتیک بین زیرواحد سبک آنتی‌بادی به IV-HER2) کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن می‌شود. اگرچه ایجاد جهش Tyr92Glu در زنجیره سبک آنتی‌بادی هرسپتین به افزایش تعداد پل‌های یونی می‌انجامد، اما زنجیره طویل باقیمانده گلوتامات جایگزین شده، باعث از میان رفتن تعداد زیادی از پیوندهای هیدروژنی می‌گردد که در نهایت باعث ناپایدار شدن (افزایش انرژی الکتروستاتیک بین زیرواحد سبک آنتی‌بادی به IV-HER2) کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن می‌شود. همانگونه که در جدول ۱ نیز نشان داده شده است آنتی‌بادی جهش‌یافته VL; Tyr92Asp پایدارترین ساختار کمپلکس را با HER2 ایجاد می‌کند.

محاسباتی پیش از این توسط (Lippow et al. 2007) به اثبات رسیده است (Lippow et al. 2007) به منظور طراحی جهش‌های هوشمند از روشی تعریف شده استفاده نمودند که مهم‌ترین اصول گزارش شده عبارت بودند از: ۱. جهش‌ها تنها در مناطق CDRs و یا مناطق مجاور بر روی ساختارهای پروتئینی ایجاد شدند؛ ۲. به منظور بررسی ساختار جهش‌یافته و بررسی برهم‌کنش‌های آنتی‌بادی - آنتی‌ژن تنها از فرایندهای بهینه‌سازی و روش بررسی ساختار استفاده گردید؛ ۳. جهش‌ها نباید باعث ناپایدار شدن ساختار پروتئینی (بیش از ۳ kcal در مقایسه با ساختار بلوری) گردند؛ ۴. معمولاً تنها اثرات جهش‌های نقطه‌ای می‌تواند با استفاده از این روش به خوبی بررسی گردد و با افزایش تعداد جهش‌ها به دو، سه و یا بیشتر شانس بررسی دقیق آنها با استفاده از این روش به شدت پایین می‌آید؛ ۵. مهم‌ترین نیروی تأثیرگذار بر اتصال یک آنتی‌بادی به آنتی‌ژن اختصاصی آن نیروهای الکتروستاتیک می‌باشند و استفاده از چنین نیروهایی به منظور بررسی توانایی اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن باعث کاهش میزان خطا و افزایش صحت تخمین تا ۶۰ درصد می‌گردد؛ و ۶. به منظور طراحی جهش‌های نقطه‌ای و همچنین بررسی برهم‌کنش‌های ایجاد شده بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی جهش یافته با استفاده از روش‌های محاسباتی تنها حضور Fv از آنتی‌بادی کفایت می‌کند (Lippow et al., 2007).

زنجیره سنگین آنتی‌بادی هرسپتین دارای نقش بسیار پررنگ‌تری در اتصال آنتی‌بادی هرسپتین به IV-HER2 نسبت به زنجیره سبک آنتی‌بادی می‌باشد. زنجیره سنگین آنتی‌بادی هرسپتین با استفاده از هشت پیوند مستقیم هیدروژنی و سه پیوند هیدروژنی با واسطه‌ی مولکول‌های آب به عنوان پل و چهار پل یونی به IV-HER2 متصل می‌گردد در حالی که زنجیره سبک آنتی‌بادی هرسپتین تنها با استفاده از چهار پیوند هیدروژنی مستقیم و یک پیوند هیدروژنی با واسطه‌ی یک مولکول آب به عنوان پل به IV-HER2

جدول ۱. نتایج حاصل از مدل‌سازی آنتی‌بادی هرسپتین و طراحی منطقی جهش‌های نقطه‌ای

به منظور افزایش تمایل آنتی‌بادی هرسپتین به IV-HER2

انرژی الکتروستاتیک مابین زنجیره پروتئینی با -IV (Kcal/mol) HER2	تعداد پل یونی با -IV HER2	تعداد پیوند هیدروژنی با IV-HER2	زنجیره پروتئینی
-۱۶۶/۳۱	-	۱۱	زنجیره سبک
-۲۰۰/۵۱	۵	۹	زنجیره سنگین
-۱۲۰/۲۳۸	۲	۷	زنجیره سبک
-۱۹۶/۶۴۴	۶	۹	زنجیره سنگین (Tyr92Glu)
-۱۷۴/۹۴۳	۲	۹	زنجیره سبک
-۱۹۷/۴۵۳	۶	۱۰	زنجیره سنگین (Tyr92Asp)

تمایل آنتی‌بادی به آنتی‌ژن از طریق کاهش انرژی الکتروستاتیک می‌تواند منجر به کاهش Kd آنتی‌بادی گردد. هرسپتین با Kd پایین می‌تواند به عنوان ابزاری مناسب در انتقال اختصاصی دارو به سلول‌های هدف مورد استفاده قرار بگیرد.

سپاسگزاری

نتایج ارائه شده در این مقاله حاصل از طرح پژوهشی با عنوان “طراحی و مطالعه مکانیسم اثرگذاری پپتیدو میمیک‌های دارویی به منظور مهار عملکرد پروتئین ErbB2 انسانی مؤثر در ایجاد سرطان سینه” می‌باشد که توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر مورد پشتیبانی قرار گرفته است.

REFERENCES

- Carter PJ (2006) Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*, 6 (5): 343-357.
- Cho HS, Mason K, et al. (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421 (6924): 756-760.
- Davies DR, Cohen GH (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 93 (1): 7-12.
- Harari PM (2004) Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer*, 11 (4): 689-708.
- Klapper LN, Glathe S, et al. (1999) The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 96 (9): 4995-5000.
- Lippow SM, Wittrup KD, et al. (2007) Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation. *Nat Biotechnol*, 25 (10): 1171-1176.
- Qu CK (2002) Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochim Biophys Acta*, 1592 (3): 297-301.
- Rose PW, Bi C, et al. (2013) The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education. *Nucleic Acids Res* 41 (Database issue): D475-482.
- Shepard HM, Jin P, et al. (2008) Herceptin. *Handb Exp Pharmacol*, (181): 183-219.
- Sinha N, Li Y, et al. (2007) Understanding antibody-antigen associations by molecular dynamics simulations: detection of important intra- and inter-molecular salt bridges. *Cell Biochem Biophys*, 47 (3): 361-375.
- Stern DF, Kamps MP (1988) EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *EMBO J*, 7 (4): 995-1001.
- Tzahar E, Waterman H, et al. (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 16 (10): 5276-5287.
- Van Der Spoel D, Lindahl E, et al. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem*, 26 (16): 1701-1718.
- Wiley HS (2003) Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res*, 284 (1): 78-88.
- Yarden Y (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61 Suppl, 2: 1-13.
- Yarden Y (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl, 4: S3-8.
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2): 127-137.
- کمپلکس تشکیل شده توسط آنتی‌بادی جهش‌یافته دارای ساختار پایدارتر می‌باشد. میانگین مجموع انرژی (Total energy) برای کمپلکس هرسپتین Tyr92Asp VL; و HER2 -۷۴۲۶۰۶ kJ/Mol می‌باشد در حالی که این عدد برای کمپلکس HER2-هرسپتین -۷۳۹۸۶۱ kJ/Mol می‌باشد. به نظر می‌رسد که از طریق ایجاد جهش نقطه‌ای و بوجود آوردن یک پل یونی پایدار بین زنجیره سبک هرسپتین با HER2 می‌توان تمایل آن را برای HER2 افزایش داد. کاهش Kd آنتی‌بادی هرسپتین برای HER2 می‌تواند منجر به کاهش دز مصرفی آن، تعداد دفعات تیمار و همچنین کاهش قابل ملاحظه هزینه‌های درمانی گردد. مطالعات پیشین (Lippow *et al.*, 2007) نشان داده است که افزایش