

ORIGINAL ARTICLE

Computational design of E6 protein inhibitors for the treatment of HPV16 disease

Shamim Khandan Alamdari¹, Somayeh Farahmand^{1*}, Reza Haji Hosseini¹, Gholamreza Bakhshi Khaniki¹

¹Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

Correspondence

Somayeh Farahmand

Email :s.farahmand@pnu.ac.ir

How to cite

Khandan Alamdari, Sh., Farahmand, S., Haji Hosseini, R., & Bakhshi Khaniki, Gh. (2023). Computational design of E6 protein inhibitors for the treatment of HPV16 disease. *Experimental Animal Biology*, 12(46), 1-14 .

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection worldwide, and high-risk HPV types cause about five percent of all cancers worldwide .The chemical drugs used to treat this disease are expensive and have many side effects. Therefore, the use of herbal medicines is increasing .In this regard, the E6 protein, which is a key protein in the initiation of cervical cancer and plays a role in the degradation of P53, was selected as an essential drug target. In this research, two new potential inhibitors named beta-sitosterol (CID_222284) and loncocarpenin (CID_54699185) were identified as potent inhibitors of E6 HPV-16 from the PubChem library by high-throughput virtual screening .Molecular dynamics results show that these compounds bind to E6 protein with high stability. The preparation of ADMET and Swiss ADME profiles indicates that the identified compounds are probably potential candidates against E6 HPV-16 and can be used in chemotherapy by inhibiting the Pgp channel as an adjuvant drug.

KEYWORDS

E6 protein, human papillomavirus 16, Molecular dynamics, Chemotherapy, Drug design.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

طراحی محاسباتی مهارکننده‌های پروتئین E6 جهت درمان بیماری HPV-16

شمیم خندان علمداری^۱، سمیه فرهنگند^{۱*}، رضا حاجی حسینی^۱، غلامرضا بخشی خانیکی^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده

ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) عامل بیشترین عفونت جنسی منتقل‌شونده در سراسر جهان است و گونه‌های پرخطر HPV حدود پنج درصد از تمام سرطان‌ها، در سراسر جهان را ایجاد می‌کنند. داروهای شیمیایی مصرفی جهت درمان این بیماری، پرهزینه بوده و عوارض جانبی متعددی دارند. بنابراین، استفاده از داروهای گیاهی درحال افزایش است. در این راستا پروتئین E6 که یک پروتئین کلیدی در شروع سرطان دهانه رحم است و در تخریب P53 نقش دارد به عنوان هدف دارویی ضروری انتخاب شد. در این تحقیق، دو بازدارنده بالقوه جدید به نام بتا-سیتوسترول (CID_222284) و لونکوکارپنین (CID_54699185) به عنوان بازدارنده قوی HPV E6-16، از کتابخانه PubChem توسط غربالگری مجازی با توان بالا شناسایی شدند. نتایج دینامیک مولکولی نشان می‌دهد که این ترکیبات با پایداری بالایی به پروتئین E6 متصل می‌شوند. نتایج سرورهای ADMET و Swiss ADME نشان‌دهنده این است که ترکیبات شناسایی شده احتمالاً کاندیدهای بالقوه‌ای علیه HPV E6-16 از نظر آنالیزهای فارماکودینامیکی و فارماکوکینتیکی هستند. همچنین می‌تواند با مهار کانال Pgp به عنوان داروی کمکی، در شیمی درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

پروتئین E6 ویروس پاپیلومای انسانی، دینامیک مولکولی، شیمی درمانی، طراحی دارو.

نویسنده مسئول:

سمیه فرهنگند

رایانامه: ir.ac.farahmand@pnu.s

استناد به این مقاله:

خندان علمداری، شمیم، فرهنگند، سمیه، حاجی حسینی، رضا و بخشی خانیکی، غلامرضا (۱۴۰۲). طراحی محاسباتی مهارکننده‌های پروتئین E6 جهت درمان بیماری HPV-16.

فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲ (۴۶)، ۱-۱۴.

<https://eab.journals.pnu.ac.ir/>

ایجاد می‌کنند، در نتیجه منجر به تکثیر سلولی کنترل نشده می‌شود.

با توجه به اینکه هنوز هیچ داروی مناسب و تایید شده‌ای برای درمان عفونت‌های HPV وجود ندارد و واکسن‌های موجود فقط برای جلوگیری از ابتلا به این بیماری می‌باشند (Beadle *et al.*, 2016)، بنابراین کشف مواد دارویی با کارایی بیشتر و عوارض کمتر در درمان بیماری HPV دارای اهمیت است. در نتیجه هدف از این تحقیق، تعیین تاثیر مواد موثره گیاهان دارویی روی پروتئین E6 جهت غلبه بر HPV-16 با استفاده از داکینگ مولکولی است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده

ابتدا در بین مواد موثره گیاهان دارویی ۵۴ ترکیب فلاونوئیدی، فنولی، ترپنوئیدی و فیتواسترولی که بر اساس مقالات دارای خاصیت ضدویروسی بودند انتخاب شدند. سپس فرمول مولکولی و کد دسترسی به این داروها از پایگاه داده‌ی DrugBank به آدرس (www.drugbank.ca) و پایگاه Pubchem به آدرس (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) بدست آمد. از روی ساختار دو بعدی موجود در سایت Pubchem، ساختار سه بعدی ترکیبات، با استفاده از سرور Online SMILES Translator and Structure File Generator به آدرس (<https://cactus.nci.nih.gov/translate>)، تهیه شد. ساختار سه بعدی پروتئین E6، ویروس HPV-16، نیز از پایگاه داده پروتئین به آدرس (<https://www.rcsb.org>)، با شماره دسترسی 4GIZ دریافت شد. جهت بررسی برهمکنش لیگاند و رسپتور (گیرنده) در پایدارترین حالت از لحاظ انرژی و ساختار، تمام ساختارهای مولکولی از نظر انرژی برهمکنش ایتیمایز شدند. در نهایت ساختاری که دارای کمترین انرژی بود، انتخاب شد. با استفاده از با استفاده از مقالات (Mamgain *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2014) رزیدوهای Tyr39، Lue57، Cys58، Val69، Lue74، Tyr77، Ser78، Ser81، Gln114، Ile135 و Arg138 به عنوان جایگاه فعال در پروتئین رسپتور انتخاب شدند.

مقدمه

ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV)، ویروسی کوچک، دارای DNA حلقوی دورشته از خانواده پاپیلوماویریده است و عمدتاً قسمت خارجی پوست و سطوح مخاطی را آلوده می‌کند (Archambault *et al.*, 2013). عفونت HPV یکی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که بیشتر از طریق انتقال جنسی منتشر می‌شود (Lin *et al.*, 2017). HPV DNA به عنوان عامل اصلی کارسینوم سلول سنگفرشی دهانه رحم و عامل بیش از ۹۹ درصد سرطان‌های دهانه رحم هستند (Walboomers *et al.*, 1999) و در بیش از ۹۰ درصد موارد دیسپلازی یا سرطان دهانه رحم با بیوپسی تشخیص داده می‌شود. HPV به دو دسته کم‌خطر (۶ و ۱۱) و پرخطر (۱۶، ۱۸ و ۳۱) تقسیم می‌شود (Muñoz *et al.*, 2003). در سال ۲۰۱۸، حدود ۵۷۰۰۰۰ زن مبتلا به سرطان دهانه رحم شناسایی شدند و حدود ۳۱۱۰۰۰ زن بر اثر این بیماری جان خود را از دست دادند (Beadle *et al.*, 2016). مطابق برآوردهای آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (ARC)^۱، انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۳۰، بار جهانی این بیماری به ۲۱/۴ میلیون مورد ابتلا جدید و ۳۱/۲ میلیون مرگ و میر افزایش یابد (Hill, 2020).

پاپیلوما ویروس‌های انسانی، هشت پروتئین مختلف اولیه (E1، E2، E4، E5، E6، E7) و تاخیری (L1، L2) را کد می‌کنند. پروتئین E6 از ۱۵۱ اسید آمینه تشکیل شده است و پس از ساخته شدن در سیتوپلاسم توسط توالی (NLS)^۲ به درون هسته منتقل می‌شود. E6 یک پروتئین ترانسفورم کننده است که پس از اتصال به پروتئین سرکوب‌کننده تومور P53، باعث تخریب آن می‌شود. بیان بیش از حد P53 نقش مهمی در ایجاد نئوپلازی داخل اپیتلیال دهانه رحم و کارسینوم سلول سنگفرشی دهانه رحم دارد (Kopczyńska *et al.*, 2012). پروتئین‌های E6 و E7 برای تبدیل و جاودانگی سلول‌ها با یکدیگر همکاری می‌کنند. بیان ژنوم E6 و E7 در بیوپسی‌های سرطان و رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم مشاهده شده است (Motavalli *et al.*, 2017). مطالعات نشان داده‌اند که HPV-16 قادر است با DNA میزبان ادغام شود (Saunier *et al.*, 2008). چنین ادغامی منجر به بیان E6، E7 و E2 می‌شود (Cricca *et al.*, 2007). انکوژن‌های E6 و E7 با همکاری نزدیک با پروتئین‌های تنظیم‌کننده درگیر در چرخه سلولی، انکوژنیک (سرطان‌زایی)

پیش‌بینی جهش‌زایی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیگاندهای مورد بررسی

هر دارویی در کنار اثربخش بودن باید دارای خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوبی نیز باشد. یکی از ویژگی‌های مهم داروهای خوراکی جذب سریع و کامل از دستگاه گوارش، توزیع در محل اثر، متابولیسم و حذف مناسب بدون ایجاد آسیب است (Żołek *et al.*, 2017). لذا در این پژوهش، پس از بررسی لیگاندها براساس قانون لپینسکی و جهش‌زایی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها نظیر حلالیت در آب (LogS)، مساحت قسمت‌های قطبی مولکول (TPSA)، پخش و نفوذ (LogD) و P-گلیکوپروتئین (gp-P) که در طراحی دارو به صورت خوراکی، تزریق وریدی یا جذب پوستی نقش دارند با استفاده از سرور SWISSADME که یک نرم‌افزار آنالیز است به آدرس (<http://www.swissadme.ch>) پیش‌بینی شد. این سرور با دریافت اطلاعات مولکول شیمیایی در قالب فایل Mol یا Smile، خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات را پیش‌بینی می‌کند. همچنین لیگاندها از نظر سمیت (حاد و سرطان‌زایی) توسط سرور PreADMET به آدرس (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/adme/>) مورد ارزیابی قرار گرفتند (Daina *et al.*, 2017). چنین روش شبیه‌سازی ممکن است منجر به انتخاب مهارکننده‌های نسبتاً ایمن‌تر با عوارض جانبی کم یا بدون عوارض شود. راندمان خوب با مشخصات PreADMET رضایت‌بخش، معیار مهمی برای یک دارو است. لذا محاسبه ویژگی‌های فارماکوکینتیک در فرآیند کشف و شناسایی مهم است (Singh *et al.*, 2016). بنابراین پس از بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیگاندها از میان ۵۴ ترکیب ابتدایی، ۸ ترکیب به عنوان لیگاند انتخاب شد (جدول ۱).

جدول ۱. بررسی داروهای مورد مطالعه بر اساس پایگاه داده‌های

شیمیایی DrugBank و PubChem

نوع ترکیب	نام ترکیب	کد Pubchem	فرمول مولکولی
فلاونوئید	Pterygospermin	۷۲۲۰۱۰۶۳	C22H18N2O2S2
ترپنوئید	Epifriedelinol	۱۱۹۲۴۲	C30H52O
ترپنوئید	Ursolic acid	۶۴۹۴۵	C30H48O3
فلاونوئید	Lonchocarpin	۵۴۶۹۹۱۸۵	C27H28O6
فلاونوئید	Kanzonol W	۱۵۳۸۰۹۱۲	C20H16O5
فلاونوئید	Lonchocarpic acid	۵۴۶۸۳۸۳۹	C26H26O6
فیتواسترول	Sitosterol-Beta	۲۲۲۲۸۴	C29H50O
فیتواسترول	Campesterol	۱۷۳۱۸۳	C28H48O

مطالعه داکینگ مولکولی

جهت ارزیابی ترکیبات فلاونوئیدی، فنولی، ترپنوئیدی و فیتواسترولی مورد بررسی در مهار پروتئین E6 ویروس 16-HPV، با روش داکینگ مولکولی، از نرم‌افزار 4.AutoDock استفاده شد. پارامترهای استفاده شده جهت انجام داکینگ مولکولی در این نرم افزار برای تمامی ترکیبات مورد بررسی ثابت بود. پس از حذف مولکول‌های آب داخل ساختار کریستالی پروتئین، بارهای هیدروژن قطبی/کلمن با استفاده از بسته ابزار 4.AutoDock (1.6.5.MGTools) به ساختار پروتئین اضافه شدند. تعداد اجراها برای هر آنالیز داکینگ روی ۵۰ تنظیم و از الگوریتم ژنتیک لامارکی استفاده شد. یک جعبه به ابعاد $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}^3$ در محور X, Y و Z ساخته شد (Zanier *et al.*, 2013). پس از پایان محاسبات، لیگاندها با انرژی اتصال آزاد به جایگاه هدف متصل شدند. در نهایت میان‌کنش‌های هیدروژنی، الکترواستاتیکی، واندروالسی و مقدار ΔG (انرژی اتصال) در جایگاه فعال بررسی و دو لیگاند Bet (بتا-سیتوسترول) و Lon (لونکوکارپین) با بالاترین انرژی اتصال ΔG جهت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انتخاب شد.

مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

در این پژوهش محاسبات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی سه بار برای سه سیستم پروتئین E6 آزاد (بدون حضور لیگاندها)، پروتئین E6 در حضور ترکیب Bet و پروتئین E6 در حضور ترکیب Lon با استفاده از بسته نرم افزار 6.GROMACS2019 و میدان نیروی Amber99SB انجام شد (Van derspoel *et al.*, 2005). برای تولید پارامترهای میدان نیروی^۱ مربوط به لیگاندها از ابزار acpype موجود در بسته نرم افزاری AntechAmber بهره گرفته شد (Sousa da silva *et al.*, 2012). به علاوه در اجرای شبیه‌سازی هر سه سیستم، مدل آب (به عنوان حلال) Tip3p در نظر گرفته شد و جعبه به کار رفته برای قرار دادن سامانه در آن، مدل مکعبی ساده با ابعاد $7/60.987 \times 7/60.987 \times 7/60.987$ نانومتر برای پروتئین E6 به صورت تنها و با ابعاد $7/61.483 \times 7/61.483 \times 7/61.483$ نانومتر برای پروتئین E6 در حضور ترکیبات Bet و Lon تعریف شد و سامانه نهایی با اعمال شرایط مرزی دوره‌ای در هر سه جهت فضا حاصل گردید. برای خنثی کردن کل سامانه و رسیدن به

1. Force field

انتخاب آسان‌تر مولکول‌هایی با خواص فارماکوکینتیک بهتر در بدن انسان برای فرمولاسیون خوراکی کمک می‌کند.

براساس آنالیزهای LogD, SWISS ADME قابلیت جذب پوستی را نشان می‌دهد، هرچه این عدد بیشتر باشد، قابلیت جذب بیشتر می‌باشد. LogS میزان حلالیت ماده را نشان می‌دهد (۰ تا -۱۰). عدد بالای صفر، نشان دهنده حلالیت بالا و میزان کمتر از -۱۰ نشان دهنده نامحلول بودن ماده مورد نظر است. فاکتور مهم دیگر TPSA (مساحت قسمت‌های قطبی مولکول) است که نقش مستقیمی در نفوذپذیری ترکیبات زیست فعال دارد (Leif, 2020). ترکیباتی که TPSA بزرگتر از ۱۳۰ آنگستروم دارند فاقد نفوذپذیری مناسب می‌باشند. GIA میزان جذب گوارشی را نشان می‌دهد. CaCO_2 میزان نفوذپذیری به سلول سرطانی را نشان می‌دهد و BBB درصد عبور از سد خونی- مغزی است. P- گلیکوپروتئین یک پروتئین غشایی است که به طور فعال تعداد زیادی از ترکیبات (از لحاظ ساختاری متنوع) را با استفاده از انرژی حاصل از هیدرولیز ATP به خارج از سلول منتقل می‌کند. در پستانداران، Pgp به وفور در اندام‌های مرتبط با دستگاه گوارش وجود دارد و تأثیر زیادی بر روی خواص ADMET (جذب، توزیع، متابولیسم، دفع و سمیت) داروها و سموم دارد (جدول ۳).

با در نظر گرفتن نقش gp-P در جذب و دفع دارو، توجه ویژه‌ای باید بر روی هر دو ویژگی سوبسترا و بازدارندگی ترکیبات جدید شود. در صورتی که Substrate-Pgp خیر باشد، لیگاند نمی‌تواند سلول را القا کند و دارو در سلول سرطانی باقی می‌ماند و در صورت مهار Inhibitor-Pgp کانال بسته شده و اجازه خروج به لیگاند داده نمی‌شود. در نهایت جهت اثر بخشی یک دارو به صورت خوراکی، تزریق وریدی یا جذب پوستی باید برآیندی از این فاکتورهای را در نظر گرفت. با توجه به تمام آیت‌ها به نظر می‌رسد ترکیب‌های Kansonol W و Pterygospermin می‌توانند به عنوان داروهای تزریقی، ترکیب‌های Lonchocarpenin و Lonchocarpic acid به عنوان داروهای خوراکی و ترکیب‌های Epifriedelinol، Ursolic acid، Sitosterol-Beta و Campesterol به عنوان داروهای پوستی تجویز شوند.

غلظت یونی فیزیولوژیک بدن (۱۵۰ میلی مولار) از جایگزین کردن مولکول‌های آب با ۴۰ عدد یون سدیم و ۵۴ عدد یون کلرید بهره گرفته شد. در گام نخست، شبیه‌سازی، برای کم کردن نیروهای اضافه بر روی اتم‌ها، کمینه کردن انرژی با روش شدیدترین نزول^۱ اجرا گردید (Zimmerman, 1991). در گام‌های بعدی محدود کردن موقعیت‌های اتم‌های سنگین همراه با به تعادل رسیدن در مجموعه‌ی کانونیکال (NVT) و سپس با مجموعه‌ی هم دما - هم فشار (NPT) انجام شد.

در نهایت شبیه‌سازی به مدت ۲۰۰ نانوثانیه با گام زمانی ۲ فمتو ثانیه، دمای ۳۱۰ کلوین و فشار ۱ اتمسفر اجرا شد (Berendsen et al., 1984). لازم به ذکر است که در اجرای شبیه‌سازی، برای بررسی پیوندهای کووالانسی، برهمکنش‌های الکتروستاتیک دور برد و برهمکنش‌های واندروالس به ترتیب از الگوریتم‌های لینک (Hess et al., 1997)، پارتیکل مش اوالد و قطع استفاده شد (Darden et al., 1993; Berendsen et al., 1984). به منظور سنجش میزان پایداری، انعطاف، شعاع چرخش، سطح قابل دسترسی به حلال، پیوند هیدروژنی، ساختار دوم پروتئین، تجزیه مؤلفه اصلی و محاسبه انرژی آزاد اتصال به ترتیب از آنالیزهای bond-H, SASA, Rg, RMSF, RMSD, DSSP, BPSA-MM و PCA استفاده شد. این آنالیزها با استفاده از دستورات gmx gyrate, gmx rmsf, gmx rmsd, gmx hbond, gmx sasa و do_dssp, gmx mm-bpsa در نرم‌افزار GROMACS انجام شد. برای اطمینان از تکرارپذیری نتایج، محاسبات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای هر سیستم سه بار تکرار شد.

نتایج

بررسی جهش‌زایی و خصوصیات فیریکوشیمیایی لیگاندهای مورد مطالعه

بر اساس قانون لیپینسکی پیش‌بینی قابل جذب بودن ترکیبات از راه خوراکی بر اساس وزن مولکولی (تا ۵۰۰ کیلودالتون)، فاکتور چربی‌دوستی (X_{loP3}) و تعداد اتم‌های دهنده ($5 <$) و پذیرنده ($10 <$) پیوند هیدروژنی ارائه می‌شود. X_{loP3} میزان چربی‌دوستی ماده را نشان می‌دهد که می‌بایست بین ۰/۷- تا ۵ باشد هر اندازه میزان آن به ۵ نزدیکتر باشد میزان چربی دوستی ماده بیشتر خواهد بود (جدول ۲) (Leif, 2020). این قانون به

جدول ۲. نتایج حاصل از آنالیز لیگاندها از نظر قوانین لپینسکی و سمیت

نام ترکیب	وزن مولکولی (گرم بر مول)	پیوند هیدروژنی دهنده	پیوند هیدروژنی پذیرنده	XlogP3	پتانسیل جهش‌زایی
Pterygospermin	۴۰۶/۵۲	۰	۲	۴/۶۹	خیر
Epifriedelinol	۴۲۸/۱۳	۱	۱	۱۰/۰۸	خیر
Ursolic acid	۴۵۶/۷۰	۲	۳	۷/۳۴	خیر
Lonchocarpenin	۴۴۸/۵۱	۱	۶	۵/۱۵	خیر
Kanzonol W	۳۳۶/۳۴	۲	۵	۳/۳۶	خیر
Lonchocarpic acid	۴۳۴/۴۸	۲	۶	۴/۷	خیر
Sitosterol-Beta	۴۱۴/۷۱	۱	۱	۹/۳۴	خیر
Campesterol	۴۰۰/۶۸	۱	۱	۸/۸	خیر

جدول ۳. نتایج آنالیز لیگاندها بر اساس سرورهای SWISS ADME و PreADMET

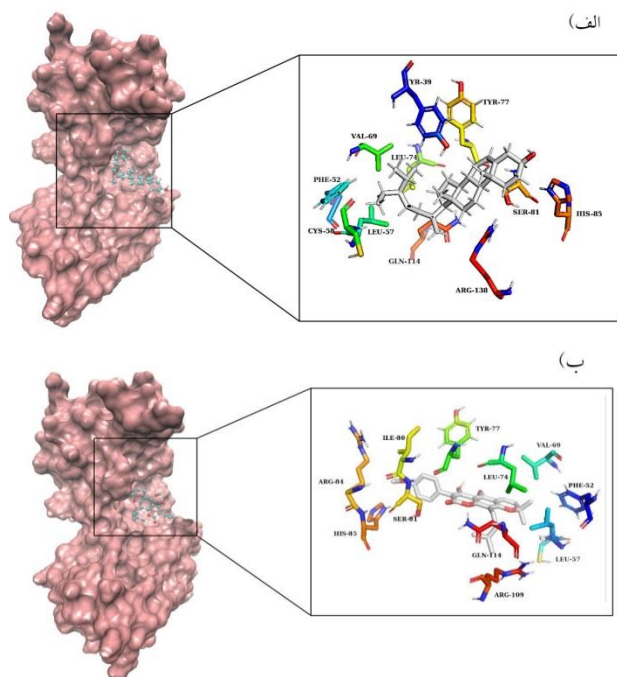
نام ترکیب	7=logD PH	LogS	(Å²) TPSA	GIA	CaCO ₂	BBB	Pgp-S	Pgp-I
Pterygospermin	۵/۴۶۰۶۲	-۵/۳۷	۸۹/۱۲	بالا	۵۴/۴۹۳۸	۰/۰۵۰۳۴۱۶	خیر	بله
Epifriedelinol	۷/۶۱۹۸۵	-۸/۸۵	۲۰/۲۳	پایین	۴۶/۸۴۴۵	۲۲/۳۲۰۷	خیر	بله
Ursolic acid	۵/۳۶۲۸۹	-۷/۲۳	۵۷/۵۳	پایین	۲۱/۸۶۱۶	۸/۰۰۷۷۷	خیر	بله
Lonchocarpenin	-	۶/۲۴	۷۸/۱۳	بالا	۴۳/۱۱۰۷	۰/۵۵۳۱۱۷	خیر	بله
Kanzonol W	-	۴/۷	۷۹/۹	بالا	۸/۳۱۸۶۱	۰/۴۲۵۷۵۹	خیر	بله
Lonchocarpic acid	-	۶/۰۲	۸۹/۱۳	بالا	۲۲/۶۷۷۴	۱/۲۹۳۶۱	خیر	بله
Sitosterol-Beta	۷/۸۲۶۷۲	۷/۹	۲۰/۲۳	پایین	۵۲/۳۷۳۴	۱۹/۸۸۸۳	خیر	بله
Campesterol	۷/۷۲۷۵	-۷/۵۴	۲۰/۲۳	پایین	۵۱/۴۰۳۵	۱۹/۷۰۴۲	خیر	بله

مطالعه داکینگ مولکولی

شکل ۱ جایگاه فعال و رزجوه‌های درگیر در اتصال لیگاندها به پروتئین E6 و ویروس HPV16 را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی بین پروتئین E6 و ترکیبات گیاهی در جدول ۴ نشان داده شده‌است. نتایج بیانگر این مطلب است که بتا-سیتوسترول (Bet) و لونکوکارپنین (Lon) به‌ترتیب با انرژی اتصال $-۸/۱$ و $-۸/۱۳$ کیلوکالری بر مول برهمکنش قوی‌تری را ایجاد کرده‌اند.

جدول ۴. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی

نام ترکیب	انرژی برهمکنش (کیلوکالری بر مول)
Pterygospermin	-۷/۹
Epifriedelinol	-۷/۸
ursolic acid	-۷/۸
Lonchocarpenin	-۸/۱۳
Kanzonol W	-۷/۳
lonchocarpic acid	-۷/۳
Sitosterol-Beta	-۸/۱
Campesterol	-۷/۲



شکل ۱. محل اتصال لیگاندها به جایگاه فعال پروتئین E6.

(الف) بتا-سیتوسترول، (ب) لونکوکارپنین.

با نرم‌افزار پایمول و VMD رسم شده است.

مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

ریشه متوسط مجذور فاصله (RMSD)

پس از بررسی پایداری ساختاری پروتئین (شکل ۲-الف)، جهت مطالعه پایداری ساختار لیگاندها در طول زمان شبیه‌سازی، نمودار RMSD آن‌ها به عنوان تابعی از زمان رسم شد. همانطور که در شکل ۲ (ب) مشاهده می‌شود، ترکیب Bet از زمان حدوداً ۱۵ نانوثانیه، نمودار RMSD لیگاند-پروتئین روند افزایشی داشته و این روند تا حدود ۴۰ نانوثانیه ادامه دارد و پس از آن تا انتهای زمان شبیه‌سازی تقریباً روند ثابتی دارد. اما در مورد ترکیب Lon در کل زمان شبیه‌سازی RMSD پایدار بوده و افت‌وخیزهای محدودی دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تغییر زیادی در پیکربندی آن در جایگاه فعال پروتئین رخ نداده است (شکل ۲-ج و جدول ۵). برای اطمینان از تکرارپذیری نتایج، ۳ نمودار RMSD روی هم انداخته شد. در هر سه سیستم تطابق خوبی بین محاسبات تکرار شده مشاهده می‌شود.

ریشه متوسط مجذور افت‌وخیزها (RMSF)، شعاع

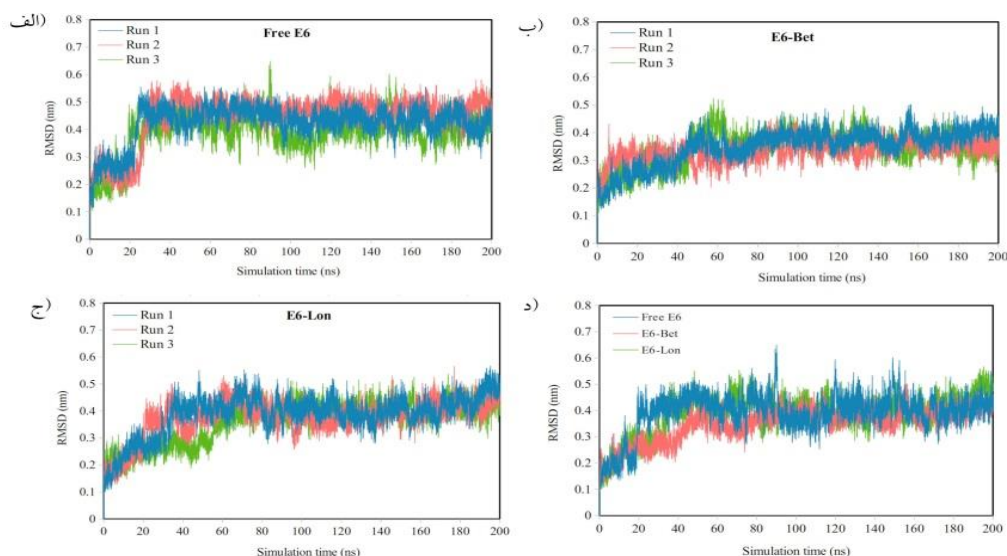
چرخش (Rg) و سطح قابل دسترسی به حلال (SASA)

در ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی میزان متوسط RMSF پروتئین E6 در حضور ترکیبات Bet و Lon نسبت به حالت پروتئین تنها به ترتیب کاهش و افزایش یافته است. بنابراین حضور ترکیب Bet تا حدودی باعث محدود شدن حرکات آمینواسیدها و حضور ترکیب Lon تقریباً باعث افزایش انعطاف پذیری آمینواسیدهای

پروتئین E6 شده است (شکل ۳-الف و جدول ۵).

مقدار شعاع چرخش پروتئین، بدون حضور و در حضور ترکیبات Bet و Lon به عنوان تابعی از زمان رسم شده‌است. در آغاز زمان شبیه‌سازی مقدار شعاع چرخش برای پروتئین در حضور ترکیبات Bet و Lon بیشتر از پروتئین تنهاست اما بعد از گذشت ۱۲۰ نانوثانیه این روند معکوس می‌شود؛ به طوری که در ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی میزان متوسط Rg پروتئین E6 در حضور هر دو ترکیب نسبت به حالت پروتئین تنها به میزان بسیار ناچیزی کاهش یافته‌است (شکل ۳-ب و جدول ۵). این نتایج نشان می‌دهند که میزان تراکم پروتئین در انتهای زمان شبیه‌سازی که سیستم‌ها به تعادل رسیده‌اند در حضور ترکیبات Bet و Lon نسبت به حالت تنها به مقدار بسیار ناچیزی افزایش یافته‌است. اما می‌توان گفت اتصال این ترکیبات باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی در ساختار سوم پروتئین نشده است.

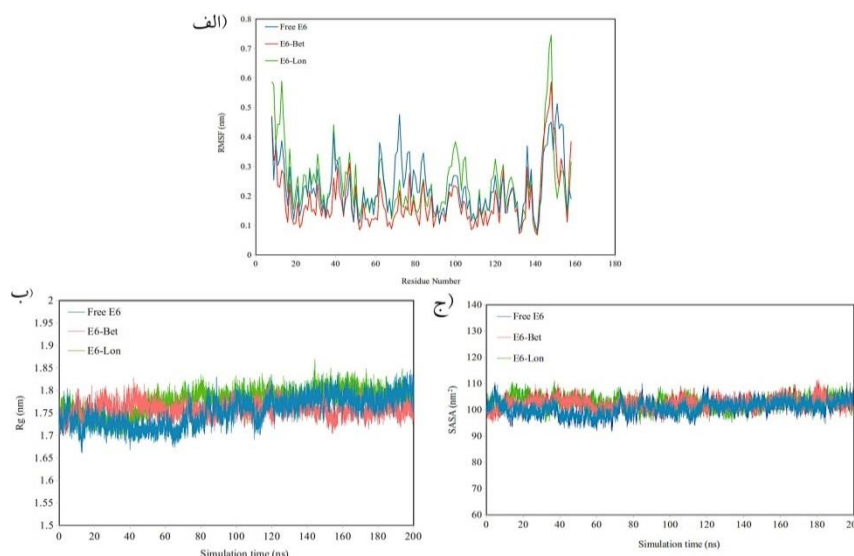
مقدار سطح قابل دسترسی به حلال برای پروتئین E6، بدون حضور و در حضور ترکیبات Bet و Lon به عنوان تابعی از زمان رسم شده است (شکل ۳-ج و جدول ۵). همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، مقدار SASA در تمام حالت‌ها در طول زمان شبیه‌سازی روند ثابتی دارد. در ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی میزان متوسط سطح قابل دسترسی به حلال برای پروتئین E6 در حضور هر دو ترکیب نسبت به حالت پروتئین تنها به مقدار بسیار ناچیزی افزایش یافته است. به عبارت دیگر اتصال این ترکیبات باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی در مقدار سطح قابل دسترسی به حلال برای پروتئین نشده است.



شکل ۲. تغییرات RMSD پروتئین E6. نمودارهای RMSD برای هر سه محاسبه انجام شده، روی هم انداخته شده است. (الف) پروتئین در غیاب ترکیبات، ب و ج) پروتئین در حضور ترکیبات Bet و Lon در طول زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، (د) مقایسه‌ی پروتئین تنها و پروتئین-لیگاند Bet و Lon.

جدول ۵. میزان متوسط کمیت های RMSF، RMSD، Rg و SASA در ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی

سیستم	(nm)Mean RMSD	(nm)Mean RMSF	(nm) Mean R _g	(nm ²)Mean SASA
Free E6	۰/۴۰۹ ± ۰/۰۴۲	۰/۲۳۰ ± ۰/۰۹۲	۱/۷۹۴ ± ۰/۰۱۶	۱۰۲/۳۴۳ ± ۰/۰۴۲
Bet-E6	۰/۳۹۷ ± ۰/۰۳۰	۰/۱۸۵ ± ۰/۰۹۳	۱/۷۸۸ ± ۰/۰۱۲	۱۰۳/۲۵۴ ± ۰/۰۴۲
Lon-E6	۰/۴۲۸ ± ۰/۰۴۶	۰/۲۴۲ ± ۰/۱۱۳	۱/۷۸۳ ± ۰/۰۱۶	۱۰۳/۴۷۸ ± ۰/۰۴۲

**شکل ۳.** تغییرات RMSF، Rg، SASA پروتئین E6 در غیاب و حضور ترکیبات Bet و Lon در طول زمان شبیه سازی دینامیک مولکولی

بررسی پیوند هیدروژنی

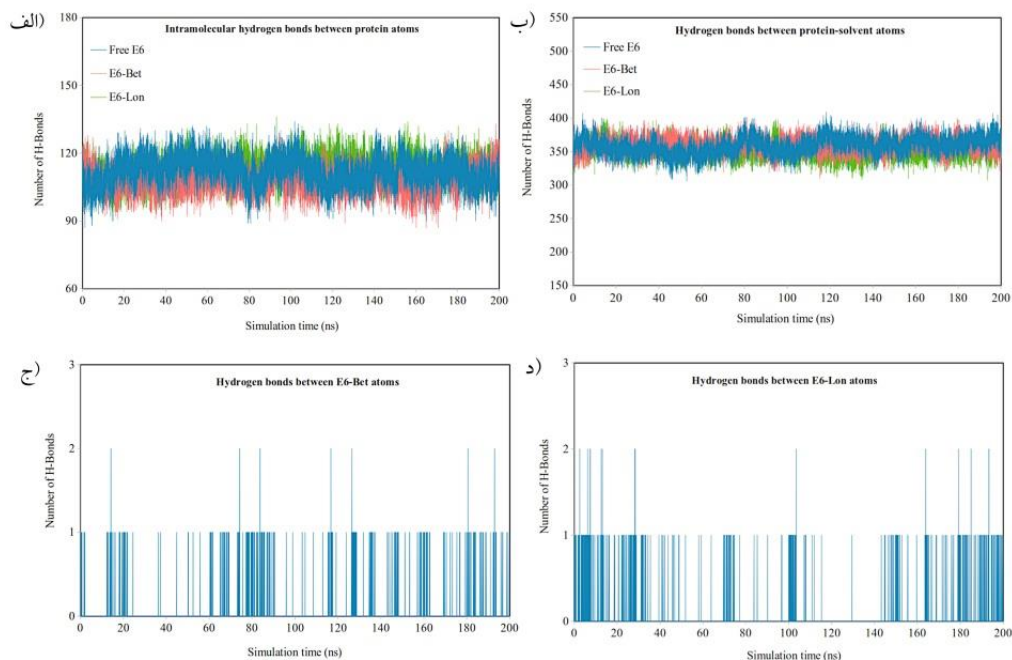
معیار تشکیل پیوند هیدروژنی فاصله کمتر از ۰/۳۵ نانومتر بین پذیرنده و گیرنده و زاویه کمتر از ۳۰ درجه برای پیوند دهنده-هیدروژن-پذیرنده می‌باشد. شکل ۴ پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های پروتئین با همدیگر، بین اتم‌های پروتئین و حلال و بین اتم‌های پروتئین و ترکیبات Bet و Lon را نشان می‌دهد. جدول ۶ متوسط پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده بین پروتئین-پروتئین و پروتئین-حلال را در ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی نشان می‌دهد. تعداد پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی بین اتم‌های پروتئین E6 در حضور ترکیبات Bet و Lon به ترتیب کاهش و افزایش می‌یابد. در حالی که پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های پروتئین E6 و حلال در حضور دو ترکیب نسبت به حالت پروتئین تنها کاهش یافته است. تجزیه و تحلیل نتایج شبیه‌سازی تشکیل حداکثر دو پیوند هیدروژنی بین پروتئین E6 و هر دو ترکیب را در طول زمان شبیه‌سازی نشان می‌دهد.

مانده است و تنها تغییرات محدودی وجود دارد که بیشترین میزان این تغییرات در ساختارهای کوئل^۱ و خم^۲ دیده می‌شود. همچنین مقایسه متوسط تعداد آمینواسیدهای درگیر در ساختار دوم پروتئین در غیاب و حضور ترکیبات Bet و Lon نشان می‌دهد که تغییرات محدودی در ساختار دوم این پروتئین پس از اتصال به ترکیبات Bet و Lon ایجاد می‌شود. طبق شکل ۵، متوسط تعداد آمینواسیدهای درگیر در ساختارهای کوئل، صفحات بتا^۳، مارپیچ های A^۴ و خم‌ها در حضور ترکیبات نسبت به پروتئین تنها به میزان کمی افزایش و متوسط تعداد آمینواسیدهای درگیر در ساختارهای مارپیچ‌های^۵ و^۶ پیچ‌ها^۷ در حضور ترکیبات Bet و Lon نسبت به پروتئین تنها، به میزان کمی کاهش یافته است. متوسط تعداد آمینواسیدهای درگیر در ساختارهای مارپیچ‌های^۸ و پل بتا^۹ در حضور ترکیبات نسبت به پروتئین تنها تغییر قابل توجهی نداشته است (شکل ۵).

بررسی ساختار دوم پروتئین آزاد و پروتئین - لیگاند

در هر سه سیستم شبیه‌سازی شده تعداد آمینواسیدهای درگیر در ساختار دوم پروتئین E6 در طول زمان شبیه‌سازی تقریباً ثابت

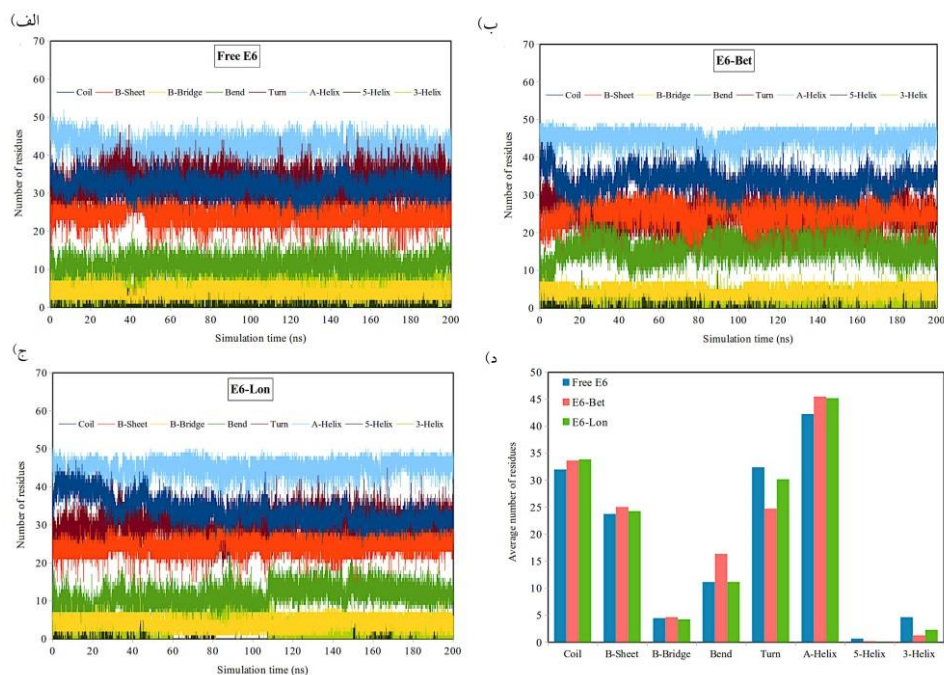
1. Coil
2. Bend
3. β -Sheet
4. A-Helix
5. 3-Helix
6. Turn
7. 5-Helix
8. β -Bridge



شکل ۴. تعداد پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های پروتئین با همدیگر، بین پروتئین و حلال و بین پروتئین و ترکیبات Bet و Lon در طول زمان شبیه‌سازی

جدول ۶. متوسط پیوندهای تشکیل شده بین پروتئین - پروتئین و پروتئین - حلال در ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی

سیستم	E6-E6	Solvent-E6
Free E6	۱۱۱/۰۱۹ ± ۵/۷۱۰	۱۱/۷۴۳ ± ۳۶۳/۸۰۵
Bet-E6	۱۰۸/۱۴۱ ± ۶/۳۷۹	۱۱/۷۳۳ ± ۳۶۰/۹۲۶
Lon-E6	۱۱۳/۸۰۲ ± ۵/۲۶۱	۱۰/۲۳۲ ± ۳۵۰/۸۸۶



شکل ۵. تغییرات تعداد آمینواسیدهای درگیر در ساختار دوم پروتئین E6 در هر سه سیستم شبیه‌سازی شده در طول زمان شبیه‌سازی و مقایسه متوسط

تعداد آمینواسیدهای درگیر در ساختار دوم پروتئین در غیاب و حضور ترکیبات Bet و Lon

تجزیه مؤلفه اصلی (PCA)

در این پژوهش از PCA برای مطالعه تغییرات ساختاری پروتئین E6 در غیاب و حضور ترکیبات Bet و Lon استفاده شده است. نمودار PCA در غیاب و حضور ترکیبات Bet و Lon (شکل ۶-الف، ب، ج) نشان می‌دهد که اتصال هردو ترکیب الگوی نمودار و محدوده کلاسترهای حرکتی پروتئین را تغییر داده است. نمودار مقدار ویژه بر حسب بردار ویژه برای پروتئین E6 در غیاب و حضور ترکیبات Bet و Lon را برای ۲۰ مُد اول حرکتی نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در هر سه سیستم سه بردار ویژه اول دارای بیشترین مقدار ویژه هستند و نقش اساسی در حرکت‌های پروتئین دارند (شکل ۶-د). به علاوه روند نمودار مقدار ویژه بر حسب بردار ویژه در حضور ترکیبات، مشابه با روند پروتئین تنهاست و فقط مقداری کاهش در مقادیر ویژه حرکت برای پروتئین در حضور ترکیبات مشاهده می‌شود.

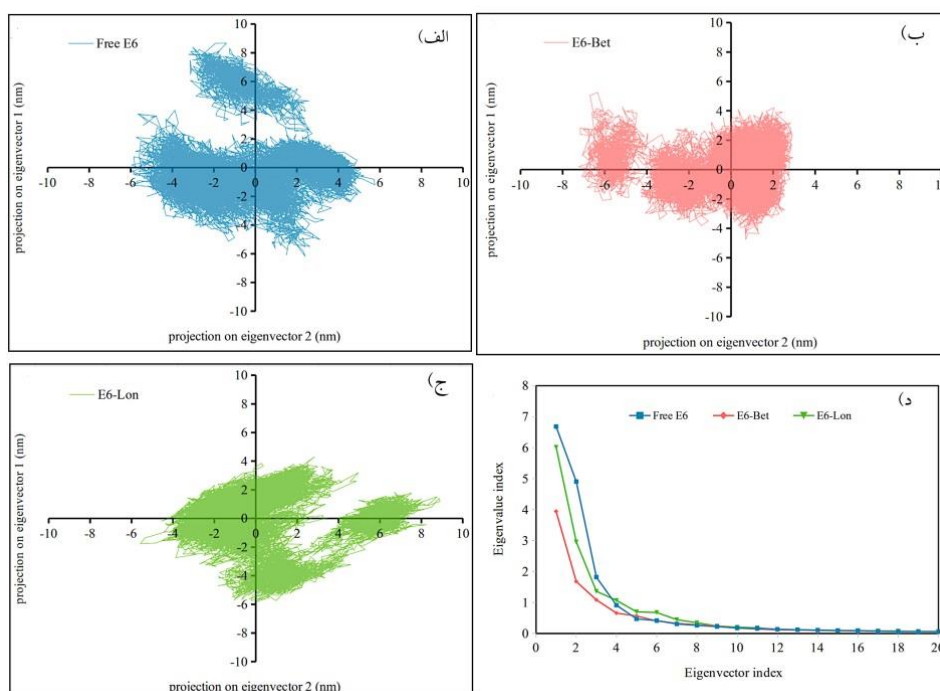
محاسبه انرژی آزاد اتصال به روش MM-PBSA

جدول ۷، محاسبه انرژی آزاد اتصال و سهم برهمکنش‌های واندروالس، الکتروستاتیک، حلال‌پذیری قطبی و مساحت سطح در

معرض حلال برای پروتئین‌های Bet-E6 و Lon-E6 در ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی (۱۰۰۰ فریم) را نشان می‌دهد. انرژی آزاد اتصال برای سیستم Bet-E6 نسبت به سیستم Lon-E6 منفی‌تر است. بنابراین قدرت مهارکنندگی Bet نسبت به Lon بیشتر است (جدول ۷). برای هر دو ترکیب برهمکنش‌های واندروالس، الکتروستاتیک و مساحت سطح در معرض حلال عوامل مساعد برای اتصال به پروتئین هستند و عامل کلیدی در اتصال به پروتئین E6 نیروهای واندروالس می‌باشد. به‌علاوه تنها عامل نامساعد برای بازدارندگی این ترکیبات انرژی حلال‌پذیری قطبی می‌باشد.

تجزیه و تحلیل عکس‌های فوری^۱

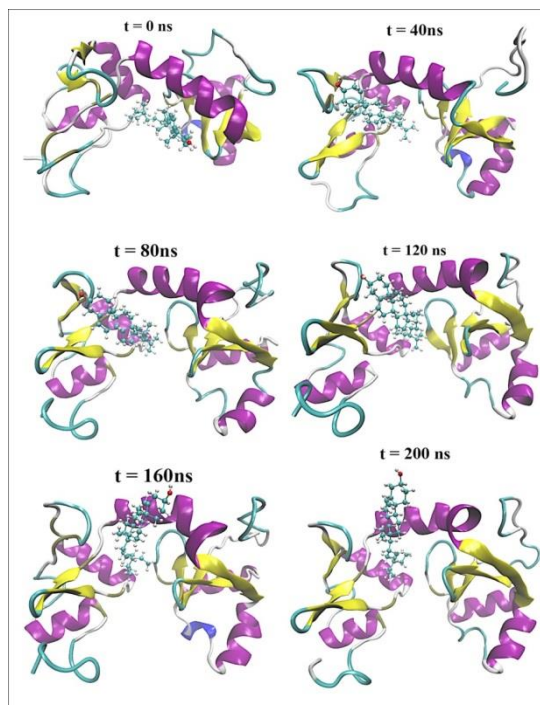
تغییرات ساختاری سیستم‌های پروتئین آزاد و پروتئین لیگاند در طول زمان شبیه‌سازی MD نیز هر ۴۰ نانوثانیه گرفته شد. زمان شبیه‌سازی همانطور که در شکل ۷ و ۸ مشاهده می‌شود، تغییر محسوسی در ترکیب همه لیگاندها در جایگاه فعال در طول زمان شبیه‌سازی وجود ندارد و همه لیگاندها فقط چرخش‌های محدودی در جایگاه فعال دارند.



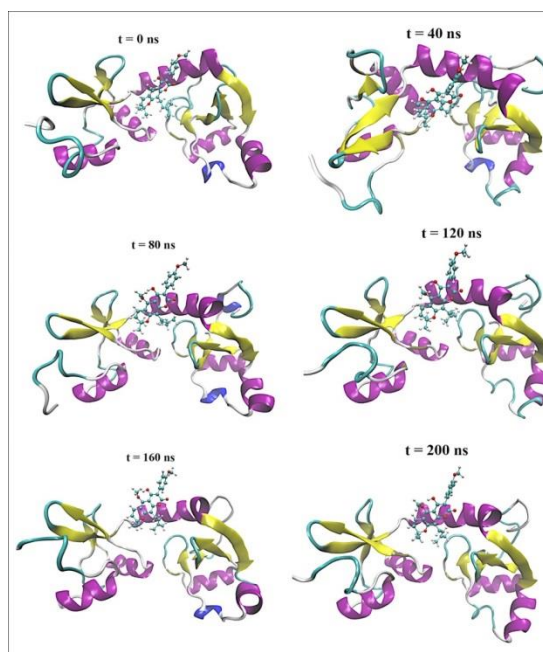
شکل ۶. نمودار PCA پروتئین E6 در غیاب و حضور ترکیبات Bet و Lon نمودار مقدار ویژه بر حسب بردار ویژه برای پروتئین E6 در غیاب و حضور ترکیبات Bet و Lon

جدول ۷. انرژی اتصال محاسبه‌شده و اجزای آن در ۵۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی

Lon-E6	Bet-E6	ترکیبات انرژی
-۵۴/۶۴۳	-۱۱۲/۳۸۹	انرژی واندروالس (کیلوژول بر مول)
-۲/۹۳۴	-۱/۷۴۷	انرژی الکترواستاتیکی (کیلوژول بر مول)
۷/۲۷۷	۷/۶۳۳	حلال‌پذیری قطبی (کیلوژول بر مول)
-۵/۸۸۴	-۱۲/۸۷۲	مساحت سطح در معرض حلال
-۵۶/۱۸۴	-۱۱۷/۸۹۰	انرژی آزاد اتصال (کیلوژول بر مول)



شکل ۷. تصاویر لحظه‌ای ترکیب Bet در طول زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با فاصله‌های زمانی ۴۰ نانوثانیه



شکل ۸. تصاویر لحظه‌ای ترکیب Lon در طول زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با فاصله‌های زمانی ۴۰ نانوثانیه

بحث

HPV عامل کلیدی برای ایجاد سرطان دهانه رحم در زنان است. جراحی، پرتودرمانی، هورمون‌درمانی، درمان‌های ترکیبی شیمی‌درمانی و ایمونوتراپی همگی امکاناتی برای درمان سرطان دهانه رحم در مراحل اولیه هستند. ولی تاکنون هیچ درمان موثری برای عفونت مداوم HPV وجود ندارد. هرچند واکسن نو ترکیب گارداسیل توانسته است شیوع بیماری را تا حدی کنترل کند، اما قیمت بالا و عدم دسترسی کشورهای توسعه نیافته به آن، منجر به ابتلای جمعیت قابل توجهی به HPV شده است. یکی از گزینه‌های درمانی سرطان دهانه رحم عصاره‌های گیاهی است. محققان متعددی تأثیر متابولیت‌های گیاهی را بر درمان سرطان بررسی کرده‌اند که نتایج بسیاری از آنها امیدوار کننده بوده است.

Mamgain et al. (2015) روی اتصال پنج ترکیب کلچین، کورکومین، دافنورتین، الیسیسین و اپیگالوکتچین-۳-گالات با پروتئین E6 پاپیلوما ویروس انسانی از نوع ۱۶، تحقیقاتی انجام دادند. از بین این ترکیبات، دافنورتین با بیشترین انرژی اتصال ($-8/3$ کیلوکالری بر مول) به پروتئین E6 به عنوان بهترین دارو انتخاب شد که می‌تواند راهی برای درمان انواع مختلف سرطان دهانه رحم ناشی از HPV باشد. در حالیکه طبق بررسی‌های بدست‌آمده از پژوهش حاضر، لونکوکارپین با انرژی اتصال $-8/13$ کیلوکالری بر مول، بهترین اتصال را داشته و می‌تواند به عنوان داروی بهتری نسبت به دافنورتین در نظر گرفته شود.

Kumar et al. (2015) طی یک غربالگری بیوانفورماتیکی به بررسی پروتئین E6 ویروس پاپیلومای انسانی پرداخته و از میان ۵۰۰۰ ترکیب، ۲ ترکیب شبه دارویی به نام Withaferin A و Artemisinin را به عنوان مهارکننده‌های بالقوه‌ی پروتئین مذکور معرفی کردند. در نهایت مشخص شد Withaferin A می‌تواند با انرژی اتصال $-5/85$ کیلوکالری بر مول با پروتئین E6 برهمکنش قوی ایجاد کند. در حالیکه تمام ترکیبات مورد بررسی در پژوهش حاضر، انرژی اتصال بیش از $-7/2$ کیلوکالری بر مول را نشان دادند.

طبق بررسی Chen et al. (2017)، لونکوکارپین یک ترکیب فنلی و چالکون طبیعی است که از گیاه دارویی کلزا استخراج می‌شود. اثرات سیتوتوکسیک این چالکون‌ها بر روی رده‌های سلولی نوروبلاستوما و لوسمی توصیف شده است. مشخص شده است که ۲۴ ساعت پس از درمان با ۵۰

میکرومولار لونکوکارپین بر روی خطوط نوروبلاستوما N-SK-Sh، القای فسفوریلاسیون AMOK رخ می‌دهد، که باعث افزایش جذب گلوکز و مهار سنتز پروتئین می‌شود. این پژوهش با توجه به گزارش‌های تایید شده پیشین در خصوص برخی از ترکیبات شناخته شده گیاهی مانند ترکیبات فلاونوئیدی و چالکون‌ها، در پیشگیری و درمان سرطان دهانه رحم ناشی از عفونت ویروسی انجام شد. مطالعات داکینگ نشان داد، لونکوکارپین با کمپلکس 2-Bcl، در ارتباط است. حلقه آگریز پروتئین 2-Bcl با پپتید BaxBH3 کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که می‌تواند توسط ترکیبات لونکوکارپین قطع شود. بنابراین حلقه آگریز اعضای خانواده 2-Bcl هدفی برای آپوپتوز ناشی از لونکوکارپین بر روی سلول‌های H292 سرطان و در نتیجه برای فعال سازی کاسپاز ۳ است.

طبق پژوهش Marquart et al. (2011)، بتا-سیستوسترول فعالیت ضدتوموری در برابر سرطان سینه، پروستات، کولورکتال و سایر انواع سرطان از خود نشان می‌دهد، که باعث افزایش آپوپتوز، توقف چرخه سلولی و کاهش متاستاز تومور می‌شود. چندین مطالعه نشان داد که PCNA سنتز DNA را در سلول‌ها تنظیم می‌کند و نقش مهمی در تکثیر سلول ایفا می‌کند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که بتا-سیستوسترول احتمالاً سنتز DNA را در سلول‌های Casski و Hela مهار می‌کند و در نتیجه تکثیر سلولی را سرکوب می‌کند. کارسینوم دهانه رحم یک بیماری عدم تعادل بین تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوز است.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که ترکیبات حاصل از دو داروی گیاهی کلزا (لونکوکارپین) و دانه‌ی سویا (بتا-سیستوسترول) به‌طور موثری می‌توانند پروتئین E6 ویروس HPV-16 را مهار کنند. در پستانداران، P-گلیکوپروتئین به وفور در اندام‌های مرتبط با دستگاه گوارش وجود دارد. تعداد این کانال‌ها در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. این پروتئین به صورت کانال باز است و باعث بیرون رفتن داروها از سلول‌های سرطانی می‌شود. این یک دلیل اصلی برای شکست‌های شیمی‌درمانی در درمان سرطان‌های مختلف است.

به نظر می‌رسد با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان بتا-سیستوسترول را به عنوان داروی پویتی و لونکوکارپین را به عنوان داروی خوراکی تجویز نمود. همچنین این دو ترکیب با مهار کانال Pgp می‌توانند به عنوان داروی کمکی در شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری کلی

انرژی اتصال ۸/۱۳- کیلوکالری بر مول به عنوان داروی خوراکی شناخته شد. همچنین این دو ترکیب می‌توانند با مهار کانال Pgp، به‌عنوان داروی کمکی در شیمی درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان وجود ندارد.

با توجه به نتایج بدست آمده از سرورهای ADME، ADMET، داکینگ مولکولی و آنالیزهای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (bond, PCA, -RMSD, RMSF, Rg, SASA, H) MMPBSA و ساختار دوم، ترکیب بتا-سیسترون با انرژی اتصال ۸/۱- کیلوکالری بر مول به عنوان داروی پوستی و لونکوکارپین با

References

- Archambault, J., & Melendy, T. (2013). Targeting human papillomavirus genome replication for antiviral drug discovery. *Antiviral Therapy*, 18(3), 271-283.
- Beadle, JR., Valiaeva, N., & Yang, G. (2016). Synthesis and antiviral evaluation of octadecyloxyethyl benzyl 9-[(2-Phosphonomethoxy) ethyl] guanine (ODE-BnPMEG), a potent inhibitor of transient HPV DNA amplification. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(23), 10470-10478.
- Berendsen, HJC., Postma, JPM., & Van Gunsteren. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684-90.
- Chen, G., Zhou, D., & Li, X. (2017). A natural chalcone induces apoptosis in lung cancer cells: 3D-QSAR, docking and an in vivo/vitro assay. *Scientific Reports*, 7, 10729.
- Cricca, M., Morselli-Labate, AM., & Venturoli, S. (2007). Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-gradecervical lesions. *Gynecologic Oncology*, 106, 549-57.
- D. Van der Spoel, E., Lindahl, B., & Hess, G. (2005). *Journal of Computational Chemistry*, 1701-1718.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 71-13.
- Darden, T., York, D., & Pedersen, L. (1993). Particle Mesh Ewald-an N.Log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 10089-10092.
- Hess, B., Bekker, H., & Berendsen, H. J. C. (1997). LINCS: A linear constraintsolver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 1463-1472.
- Hill, E.K. (2020). Updates in cervical cancer. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 63(1), 3-11.
- Kopczyńska, E., & Makarewicz, R. (2012). Endoglin – a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Contemporary Oncology*, 68-71.
- Kumar, S., Jena, L., & Sahoo, M. (2015). In silico docking to explicate interface between plant-originated inhibitors and E6 oncogenic protein of highly threatening human papillomavirus 18. *Genomics and Informatics*, 60-67.
- Leif, EP. (2020). COVID-19 and Flavonoids: In Silico Molecular Dynamics Docking to the Active Catalytic Site of SARS-CoV and SARSCoV-2 Main Protease. *Social Science Research Network*, 2(1), 23-42.
- Lin, J., Chen, L., & Qiu, X. (2017). Traditional chinese medicine for human papillomavirus (HPV) infections: a systematic review. *Bioscience Trends*, 11(3), 267-273.
- Mamgain, S., Sharma, P., & Kumar, R. (2015). Computer aided screening of natural compounds targeting the E6 protein of HPV using molecular docking. *Bioinformation*, 11(5), 236.
- Marquardt, K., Buttner, HH., & Broschewitz, U. (2011). Persistent carcinoma in cervical cancer screening: non-participation is the most significant cause. *Acta Cytologica*, 55, 433-7.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., ... & Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England journal of medicine*, 348(6), 518-527.
- Motavalli Khiavi, F., Arashkia, A., & Nasimi, M.. (2017). Immunization of mice by a multimeric L2-based linear epitope (17-36) from HPV type 16/18 induced cross reactive neutralizing antibodies. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(4), 265-273.
- Saunier, M., Monnier-Benoit, S., & Mauny, F. (2008). Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 3678-85.
- Singh, S., Das, T., & Awasthi, M. (2016). DNA topoisomerase directed anticancerous alkaloids: ADMET based screening, molecular docking and dynamics simulation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(1), 125-137.

- Sousa da Silva, A. W., & Vranken, W. F.(2012). ACPYPE-Antechamber python parser interface. *BMC research notes*, 5, 1-8.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M.V., & Manos, M.M. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasivecervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189, 12-19.
- Zanier, K., Charbonnier, S., & Sidi, A.O. (2013). Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science*, 339, 694-698.
- Zimmerman, K. (1991). All purpose molecular mechanics simulator and energy minimizer, *Journal of Computational Chemistry*, 12, 310-319.
- Żołek, T., & Maciejewska, D. (2017). Theoretical evaluation of ADMET properties for coumarin derivatives as compounds with therapeutic potential. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109, 486-502.