

A Novel Immunotoxin Based on BmK AGAP Toxin for HER2-Positive Breast Cancer: An In Silico Study

Sadaf Azdoo¹,
Samira Mokhtari²,
Navid Nezafat³,
Farzaneh Vahedi⁴,
Mortaza Taheri-Anganeh⁵,
Khadijeh Ahmadi⁶,
Mehdi Alizadeh⁷,
Seyyed Hossein Khatami⁷,
Mohamad Sabaghan⁸,
Rahmatollah Soltani⁸,
Vahid Zarezade⁸,
Ahmad Movahedpour⁹,
Hassan Ghasemi¹⁰

¹ Assistant Professor, School of Dentistry, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

² Msc in Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

³ Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁴ Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

⁵ Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Cellular and Molecular Medicine Research Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁶ Assistant Professor, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

⁷ PhD in Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁸ Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Behbahan Faculty of Medical Sciences, Behbahan, Iran

⁹ Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

¹⁰ Associate Professor, Department of Basic Sciences, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran

(Received April 30, 2025; Accepted December 14, 2025)

Abstract

Background and purpose: Breast cancer remains one of the leading causes of cancer-related deaths among women worldwide. The HER2 protein, an epidermal growth factor receptor, is overexpressed in approximately 25% of breast cancer cases, making it a key target for therapeutic strategies. Pertuzumab is a monoclonal antibody used in combination with trastuzumab and docetaxel for the treatment of metastatic HER2-positive breast cancer; it is also used in the same combination as a neoadjuvant in early HER2-positive breast cancer. BmK AGAP, a venom-derived protein, has also shown potential in inducing apoptosis in cancer cells, thereby expanding targeted treatment options.

Materials and methods: This theoretical study employed bioinformatics tools to design an immunotoxin combining a HER2-specific scFv with the BmK AGAP toxin, linked via a peptide linker. Comprehensive analyses were conducted to evaluate the construct's secondary structure, physicochemical properties, and solubility. Subsequently, the tertiary structure of the immunotoxin was modeled, refined, and analyzed. Protein-protein docking was performed to assess the binding affinity to the target receptor, and molecular dynamics simulations were carried out to evaluate the structural stability of the immunotoxin.

Results: The analytical findings suggest that the immunotoxin is a stable protein exhibiting an appropriate structural configuration and no allergenic characteristics. It demonstrates the ability to bind to the HER2 receptor. The synthesized protein molecule shows promise as an immunotoxin targeting HER2-positive breast cancer.

Conclusion: In addition to the favorable results obtained from bioinformatics studies, it is necessary to perform various immunological experiments in vitro and in vivo to confirm the effectiveness of the designed immunotoxin.

Keywords: immunotoxin, Bioinformatics, Immunotherapy, Breast cancer, HER2

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 35 (252): 32-44 (Persian).

Corresponding Author: Ahmad Movahedpour - Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran (E-mail: ahmad.movahed14@gmail.com) & Hassan Ghasemi- Department of Basic Sciences, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran (Email: clinicalbiochem.1365@gmail.com)

طراحی یک ایمونوتوکسین جدید بر اساس توکسین BmK AGAP علیه سرطان پستان HER2 مثبت؛ یک مطالعه in-silico

صدف آزدو^۱
سمیرا مختاری^۲
نوید نظافت^۳
فرزانه واحدی^۴
مرتضی طاهری انگنه^۵
خدیجه احمدی^۶
مهدی علیزاده^۷
سید حسین خاتمی^۸
محمد صباغان^۹
رحمت‌الله سلطانی^۸
وحید زارع زاده^۸
احمد موحدپور^۹
حسن قاسمی^{۱۰}

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان در سراسر جهان است. پروتئین HER2، یک گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، در حدود ۲۵ درصد از موارد سرطان سینه بیش از حد بیان می‌شود. در نتیجه، HER2 به عنوان یک هدف کلیدی برای استراتژی‌های درمانی در درمان سرطان سینه عمل می‌کند. Trastuzumab پرتوزوماب، یک آنتی‌بادی مونوکلونال است که در ترکیب با تراستوزوماب و دوستاکسل برای درمان سرطان پستان متاستاتیک HER2 مثبت استفاده می‌شود؛ همچنین در همان ترکیب به عنوان یک نوآدجوانت در مراحل اولیه سرطان پستان HER2 مثبت نیز استفاده می‌شود. BmK AGAP یک پپتید مشتق شده از سم عقرب و ترکیبی سیتوتوکسیک بوده که توانایی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی را دارا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تئوری، از روش‌های مختلف بیوانفورماتیکی برای تولید ایمونوتوکسین استفاده شد. در ابتدا پیوند پپتیدی مابین قطعه متغیر تک زنجیره‌ای اختصاصی (scFv) و توکسین BmK AGAP برقرار شد. سپس پیش‌بینی ساختار ثانویه، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میزان حلالیت و حساسیت‌زایی بالقوه سازه بررسی شد. همچنین، ساختار سوم این سازه طراحی، ویرایش و ارزیابی شد. علاوه بر این، تمایل اتصال ایمونوتوکسین به گیرنده آن و پایداری ایمونوتوکسین به ترتیب از طریق اتصال پروتئین-پروتئین و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ایمونوتوکسین طراحی شده یک پروتئین پایدار با ساختاری مناسب و فاقد ویژگی‌های آلرژی‌زا است. همچنین این ایمونوتوکسین توانایی اتصال به گیرنده HER2 را نشان می‌دهد. در نهایت، مولکول پروتئینی سنتز شده به عنوان یک ایمونوتوکسین امیدوار کننده جهت درمان سرطان پستان HER2 مثبت، شناسایی شده است.

استنتاج: علاوه بر نتایج مطلوب بدست آمده از مطالعات بیوانفورماتیکی، انجام آزمایش‌های ایمونولوژیکی مختلف در شرایط in vivo و in vitro برای تأیید اثربخشی ایمونوتوکسین طراحی شده ضروری است.

واژه‌های کلیدی: ایمونوتوکسین، بیوانفورماتیک، ایمونوتراپی، سرطان پستان، HER2 مثبت

E-mail: ahmad.movahed14@gmail.com

E-mail: clinicalbiochem.1365@gmail.com

موفق مسئول: احمد موحدپور- دانشگاه علوم پزشکی یاسوج- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

حسن قاسمی- دانشگاه علوم پزشکی آبادان- گروه علوم پایه

۱. استادیار، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲. کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
۳. استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۶. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
۷. دکتری بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۸. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پزشکی بهبهان، بهبهان، ایران
۹. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
۱۰. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۹/۲۳

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۴/۱۰

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین نوع سرطان از نظر شیوع و دومین علت اصلی مرگ و میر در زنان بر اثر سرطان می باشد. از همین رو، تشخیص و درمان به موقع این بیماری می تواند میزان بهبودی را تا حد زیادی افزایش دهد (۱، ۲). همانند بسیاری از بدخیمی ها، سرطان پستان نیز از تومورهای ناهمگن با ظاهر بافت شناسی متفاوت تشکیل شده است (۳). زیرگروه های مولکولی متنوع در این سرطان شامل Luminal-A، Luminal-B، Basal-like و human epidermal growth factor 2 (HER2) می باشند (۴). HER2، گیرنده تیروزین کیناز ErbB-2، پروتئینی از خانواده EGFR /ErbB است. افزایش میزان بیان HER2 در ۱۵ تا ۲۰ درصد از سرطان های پستان مشاهده می شود (۵-۷). در این خانواده از پروتئین های گیرنده، دومین های I و III (Domains) نقش اصلی را در اتصال با لیگاند (ligand) ایفا می کنند. دومین های II و IV نیز دامنه خارج سلولی گلیکوزیله (Glycosylated) پروتئین کینازهای ErbB را تشکیل می دهند. علاوه بر این، دومین II تشکیل همودیمرها و هترویدیمرها (Homodimers- heterodimers) را با سایر اعضای خانواده ErbB تسهیل می کند (۸). هنگامی که این گیرنده با سایر EGFR ها هتروداIMER می شود، باقیمانده های (Residues) تیروزین در قسمت سیتوپلاسمی به صورت خودکار فسفریله و منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنال دهی متعددی هم چون PI3K، STAT3، MAPK و Ras/Raf شده که نهایتاً منجر به تومورزایی می شود (۹). از آنجایی که HER2 یک عامل انکوژنیک (Oncogenic) کلیدی در تومورهای پستانی است، به عنوان یک هدف درمانی موثر در بیماران مبتلا به سرطان پستان HER2 مثبت شناخته شده است (۱۰). آنتی-بادی منوکلونال (Monoclonal) Trastuzumab به دومین IV پروتئین HER2 متصل می شود و به طور اختصاصی پروتئین HER2 را مورد هدف قرار می دهد. از زمان دریافت تاییدیه FDA

(Food and Drug Administration) برای آنتی بادی Trastuzumab در سال ۱۹۹۸، پیشرفت های قابل توجهی در انتخاب درمان برای افراد مبتلا به سرطان پستان HER2 مثبت وجود داشته است (۱۱). برای سال های متمادی، Trastuzumab برای مهار فعالیت گیرنده HER2 مورد استفاده قرار می گرفت تا این که به دلیل مقاومت دارویی، چالشی بزرگ در کنترل فعالیت HER ایجاد شد. بنابراین، متعاقباً بسیاری از داروها بر اساس هدف گیری HER2 ساخته شدند و ترکیب این آنتی بادی با سایر داروهای شیمی درمانی سنگ بنای درمان سرطان پستان شده است به طوری که در حال حاضر، درمان استاندارد برای موارد متاستاتیک بیماران سرطان پستان HER2/neu مثبت، ترکیبی از آنتی بادی Pertuzumab و Trastuzumab می باشد (۷، ۱۲). Trastuzumab به قسمت غشایی گیرنده HER2 متصل می شود و از تشکیل همودیمر HER2 جلوگیری می کند. از سوی دیگر، آنتی بادی منوکلونال انسانی شده Pertuzumab، به دامنه خارج سلولی گیرنده HER2 متصل می شود و مانع از همو-هترویدیمریزاسیون HER2/HER3 می شود. در نتیجه چنین عملکردی، مسیرهای مختلف سیگنال دهی درون سلولی و رشد سلول متوقف می شود به طوری که مطالعه قبلی نیز نشان داده است که بیمارانی با تومورهای پستان HER2/neu مثبت متاستاتیک تحت درمان Trastuzumab، دچار پیشرفت بیماری شدند، با این حال، این بیماران به درمان ترکیبی Pertuzumab و Trastuzumab پاسخ مناسبی دادند (۱۵-۱۳). قطعه (scFv Single-Chain Fragment Variable) به عنوان کوچک ترین جزء یک مولکول آنتی بادی است که دارای توانایی اتصال به آنتی ژن می باشد. بخش های متغیر زنجیره سبک (VL) و سنگین (VH) (Variable regions of light) و سنگین (Variable regions of heavy) یک آنتی بادی توسط یک پیوند دهنده پپتیدی انعطاف پذیر در scFv به هم متصل می شوند. scFv حاوی VH و VL یک هتروداIMER

مواد و روش‌ها

بازیابی توالی و طراحی سازه

این یک مطالعه تئوری و محاسباتی می باشد. ساختار سه بعدی نواحی متغیر زنجیره سبک (VL) و سنگین (VH) آنتی بادی Pertuzumab از وب سایت بانک داده پروتئین (<https://www.rcsb.org>) با (PDB ID: 4LLU) و همچنین توالی اسید آمینه BmK AGAP از پایگاه داده BmK Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) با (AGAP UniProt ID: G4V3T9) بدست آمد. لینکر انعطاف پذیر (GGGGSGGGSGGGGS) برای اتصال قطعات VL و VH آنتی بادی Pertuzumab مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این، توکسین BmK AGAP و scFv نیز با استفاده از توالی اسید آمینه GGGSGGGSGGGGS به عنوان یک لینکر پپتیدی انعطاف پذیر به هم متصل شدند (تصویر شماره ۱).

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQKPKGKAPKLLIY
SASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFG
QGTEKVEIKGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GFTFTDYTMDVWRQAPGKGLVWVADVNPNSGGSIYNQRFGKGRFTLSV
DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSTFYFDYWGQGLTVTVSS
AGGGSGGGSGGGGSVKDGYIVDDKNCAYFCGRNAYCDECEKNG
AESGYCQWAGVYGNACWCYKLPDKVPIRVPGRCNG

V _L	FLEXIBLE LINKER	V _H	FLEXIBLE LINKER	BmK AGAP
----------------	-----------------	----------------	-----------------	----------

تصویر شماره ۱: توالی اسید آمینه ایمونوتوکسین نوترکیب scFv-BmK AGAP، زنجیره سبک آنتی بادی مونوکلونال (توالی سبز) توسط یک لینکر انعطاف پذیر (توالی قرمز) به زنجیره سنگین آنتی بادی مونوکلونال (توالی زرد) متصل شده و scFv را تشکیل دادند. scFv طراحی شده نیز از طریق یک لینکر انعطاف پذیر (توالی قرمز) به توکسین BmK AGAP (توالی آبی) اتصال یافت.

بررسی ساختار ثانویه ایمونوتوکسین

در این قسمت از نسخه IV سرور GOR V برای پیش بینش ساختار ثانویه سازه scFv-BmK AGAP استفاده شد. این سرور برای پیش بینی ساختار ثانویه

غیر کووالانسی است که می تواند برای تولید آنتی بادی های نو ترکیب (Recombinant) استفاده شود (۱۶). خواص فارماکوکینتیک (Pharmacokinetic) مناسب scFv آن را به گزینه ای مناسب برای توسعه ایمونوتوکسین های پیشرفته تبدیل می کند (۱۷). درمان با ایمونوتوکسین نو ترکیب یکی از مهم ترین استراتژی های درمان سرطان است که با هدف قرار دادن مولکول های سطحی سلول سرطانی، داروهای توکسیک را به طور اختصاصی به سلول های تومور می رساند. حداقل بودن عوارض جانبی این ایمونوتوکسین ها بر روی سلول های طبیعی، آن ها را به طور قابل توجهی ارزشمندتر می کند (۱۸). مشخص شده که پپتیدهای فعال فیزیولوژیکی متعددی در زهر عقرب وجود دارند. Mesobuthus martensii Karsch (BmK) نیز به عنوان یک پپتید ضد تومور و ضد درد ارائه شد. این پپتید برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ از زهر عقرب جدا شد (۱۹، ۲۰). از آن زمان تاکنون، انواع متعددی از پپتیدهای ضد درد BmK، از جمله AGAP، که برای تسکین درد و مدیریت سرطان استفاده می شوند، جداسازی شده اند (۲۱). پپتید BmK AGAP عضوی از زیرخانواده پپتیدهای عقرب بلند زنجیره بوده که دارای ۶۶ اسید آمینه و جرم مولکولی ۷۱/۴۲ کیلو دالتون می باشد (۲۲). نتایج مطالعات نشان می دهد که پپتید BmK AGAP سبب جلوگیری از تهاجم سلولی، مهاجرت سلولی و انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (EMT) در رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 سرطان پستان می شود. BmK AGAP، از طریق مسیرهای سیگنالینگ NF- κ B و Wnt/ β -catenin نیز در فعالیت کاهش التهاب درون سلولی شرکت می کند (۲۰). به همین واسطه، در مطالعه پیش رو از چندین ابزار و وب سرور بیوانفورماتیکی و ایمونوآنفورماتیکی برای طراحی و ارزیابی یک ایمونوتوکسین جدید و موثر با ادغام scFv اختصاصی HER2 و پپتید توکسینی BmK AGAP استفاده شده است.

پروتئین‌ها (چهار حالت ساختاری مارپیچ، صفحه، چرخش و سیم پیچ) از نظریه آماری Bayesian Information theory و statistics استفاده می‌کند (۲۳).

بررسی ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی ایمونوتوکسین
 با استفاده از پایگاه داده
 (http://us.expasy.org/tools/protparam.html)
 ProtParam، خواص فیزیکی و شیمیایی مختلف سازه
 نو ترکیب، از جمله وزن مولکولی (Mw) (Molecular weight)، نقطه ایزوالکتریک نظری (p) (Theoretical isoelectric point)، شاخص آلفاتیکی (Aliphatic index)، شاخص ناپایداری (Instability index)، و GRAVY مثبت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

پیش بینی حساسیت زایی ایمونوتوکسین

وب سرور (https://ddg-pharm-
 ac.net/AllergenFP/) AllergenFP برای پیش بینی
 حساسیت زایی پروتئین کایمریک (Chimeric) استفاده
 شد. AllergenFP در زبان کامپوتری پایتون نوشته شده
 است و دارای یک رابط کاربری گرافیکی مبتنی بر
 HTML (GUI) است. الگوریتم پیش‌بینی سرور مبتنی بر
 ویژگی‌های اولیه اسیدهای آمینه مانند اندازه، آبگریزی،
 فراوانی نسبی و توانایی تشکیل ساختارهای مارپیچ و
 رشته‌ای β است. هنگامی که یک توالی پروتئینی ارسال
 می‌شود، صفحه نتایج وضعیت پروتئین را به عنوان
 (غیر آلرژن) یا (آلرژن احتمالی) نشان می‌دهد (۲۴).

پیش بینی، اصلاح و اعتبار سنجی مدل ساختار سه بعدی
 مدل سازی سه بعدی سازه نو ترکیب scFv-BmK
 توسط وب سرور
 AGAP (http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/
 Galaxy TBM) انجام شد. در ادامه از سرور GalaxyRefine نیز برای
 اصلاح ساختار و بهبود کیفیت سازه نو ترکیب استفاده
 شد (۲۵). برای تجزیه و تحلیل اعتبار مدل‌های سه بعدی

وب سرور (https://saves.mbi.ucla.edu/) PROCHECK
 از نمودار Ramachandran برای اعتبار
 سنجی مدل استفاده می‌کند. به طوری که باقی مانده‌ها به
 سه منطقه (مناطق مورد علاقه، مناطق مجاز و مناطق غیر
 مجاز) طبقه بندی می‌شوند. همچنین، ابزار ProSA-web
 خطاهای ساختاری را در مدل‌های سه بعدی از طریق
 محاسبه نمره کیفیت کلی (امتیاز Z) مشخص می‌کند. اگر
 امتیاز Z تخمینی ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده، خارج
 از محدوده مشخصه برای پروتئین‌های معیار (طبیعی)
 باشد، احتمالاً خطاهای ساختاری را نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل اتصال مولکولی ایمونوتوکسین طراحی
 شده با گیرنده Her-2

مکانیسم‌های مهم بیولوژیکی مختلف، از جمله
 سیگنال‌دهی سلولی، مهار آنزیمی و تحریک سیستم ایمنی
 بواسطه فعل و انفعالات پروتئین-پروتئین انجام می‌شود (۲۶).
 ارزیابی الگوی تعامل پروتئین-پروتئین با استفاده از سرور
 ClusPro 2.0 برای پیش‌بینی قدرت و موقعیت پیوند بین
 گیرنده HER2 (PDB ID: 1n8z) و ایمونوتوکسین انجام
 شد (۲۷). این سرور بر اساس الگوریتم PIPER و برای
 ارزیابی جامع یک تابع انرژی در فضای ۶ بعدی گسسته از
 جهت گیری متقابل لیگاند و گیرنده استفاده می‌کند. پایگاه
 داده پیش‌بینی انرژی اتصال پروتئین (PRODIGY) برای
 پیش‌بینی ثابت تفکیک (K_d) (Dissociation constant) و
 میل پیوندی (Binding affinity) کمپلکس HER2-toxin2
 استفاده شد (۲۸). وب سرور LigPlot+ (نسخه ۳، ۴، ۵) برای
 تجزیه و تحلیل کمپلکس‌های متصل استفاده شد (۲۹). در
 نهایت، بهترین کمپلکس بر اساس امتیاز Kd، امتیاز وزنی،
 تعداد پیوندهای هیدروژنی و کم‌ترین انرژی بین مولکولی
 انتخاب شد.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

پایداری و تغییرات ساختاری کمپلکس HER2-
 immunotoxin شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD)

(D) (Molecular dynamics) با استفاده از نرم افزار GROMACS 2018 انجام شد (۳۰). ساختارها با استفاده از میدان نیروی پتانسیل بهینه برای شبیه سازی مایع (OPLS) (Simple point charge) جهت کشف پایداری و تغییرات، مدل سازی شدند. روش ذرات مش (Particle mesh Ewald) Ewald (PME) برای درمان الکترواستاتیک استفاده شد. در نهایت، شبیه سازی دینامیک مولکولی برای هر سیستم شبیه سازی به مدت ۱۰۰ نانوثانیه (ns) (Nanosecond) با دو مرحله زمانی فمتوثانیه (fs) (Femtoseconds) استفاده شد. پایداری سیستم های شبیه سازی با استفاده از ریشه میانگین مربعات انحراف (RMSD) (Root-mean-square deviation) و شعاع چرخش (Rg) (Radius of gyration) ارزیابی شد. علاوه بر این، در طول شبیه سازی، از نوسانات ریشه میانگین مربع (RMSF) (Root mean square fluctuation) برای تجزیه و تحلیل نوسان اسیدهای آمینه استفاده شد. هم چنین پارامترهای مساحت سطح قابل دسترس برای حلال (solvent-accessible surface area) (SASA) برای ارزیابی پایداری کمپلکس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی آبادان مورد بررسی قرار گرفت و با کد اخلاق IR.ABADANUMS.REC.1400.088 تصویب شد.

یافته ها

بررسی ساختار ثانویه ایمونوتوکسین

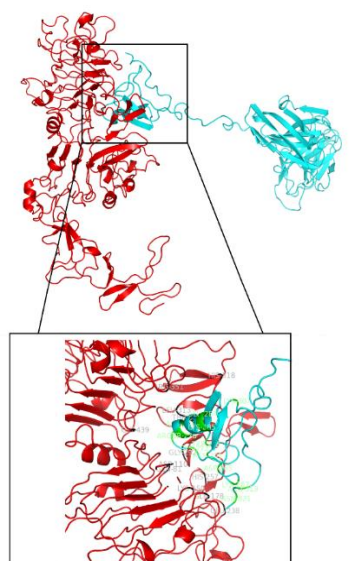
سرور GOR V برای پیش بینی ساختار ثانویه ایمونوتوکسین استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که ادغام توکسین AGAP BmK با scFv، سبب تغییر در ساختار ثانویه این توالی ها نشده است. پیش بینی درصد حالت های ساختاری در سازه نهایی طراحی شده با دقت ۷۳/۵، به صورت ۳/۴۲ درصد نواحی آلفا-مارپیچ،

۳۸/۸۲ درصد رشته های توسعه یافته و ۵۷/۷۶ درصد پیچش تصادفی را در محتوای ساختار ثانویه نشان داد.

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و حساسیت زایی ایمونوتوکسین پایگاه داده ProtParam برای محاسبه ویژگی های فیزیکوشیمیایی توالی scFv-BmK AGAP استفاده شد. مشخص شد که این پروتئین دارای ۳۲۲ اسید آمینه با میانگین وزن مولکولی ۳۴ کیلودالتون و $pI = 7.52$ است. علاوه بر این، ۲۶ اسید آمینه با بار منفی (Asp + Glu) و ۲۷ اسید آمینه با بار مثبت (Arg + Lys) در ساختار پروتئین نو ترکیب وجود دارند. میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) و شاخص آلیفاتیک پروتئین کایمریک به ترتیب -0.366 و 0.5752 بوده است. برای بررسی حساسیت ایمونوتوکسین طراحی شده، از سرور AlgPred استفاده شد. این سرور پیش بینی کرد که ساختار پروتئین کایمریک طراحی شده scFv+BmK AGAP غیر حساسیت زا است، به این معنی که ایمونوتوکسین طراحی شده پاسخ های التهابی و واکنش های آلرژیک را در بدن انسان ایجاد نمی کند.

مدل سازی، اصلاح و اعتبار سنجی ساختار سه بعدی ایمونوتوکسین

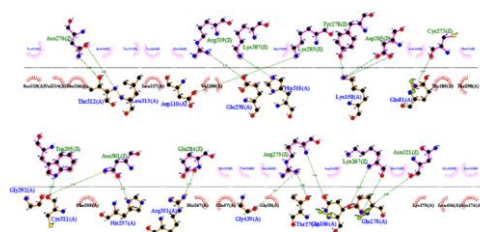
برای ساخت مدل های سه بعدی پروتئین کایمریک، از سرور GalaxyTBM استفاده شد. مدل با بیش ترین امتیاز اطمینان (c-score)، به عنوان مدل نهایی انتخاب شد (تصویر شماره ۲). اندازه گیری کیفیت و هر گونه خطای احتمالی در مدل سه بعدی با وب سرور ProSA-web انجام شد. امتیاز z (z-score) مدل نهایی در محدوده قابل قبول برای ایمونوتوکسین طراحی شده (۸/۵۲-) بود (تصویر شماره ۳). نتایج بدست آمده از سرور PROCHECK نشان داد که تعداد ۲۳۰ اسید آمینه (۹۰/۹ درصد) در منطقه مطلوب، ۱۹ اسید آمینه (۷/۵ درصد) در منطقه مجاز، ۴ اسید آمینه (۱/۶ درصد) در منطقه غیر مجاز قرار دارند. ارزیابی ساختاری توسط



نمودار راماچاندران تایید کرد که طول پیوند و زوایای بیش تر باقیمانده‌ها در مناطق مطلوب گنجانده شده است.



تصویر شماره ۲: ساختار سه بعدی پیش بینی شده برای ایمونوتوکسین، قسمت بالایی (آبی) توکسین BmK AGAP است، قسمت پایینی زنجیره‌های سنگین و سبک از mAb است که از طریق لینکر انعطاف پذیر به هم متصل شده‌اند.



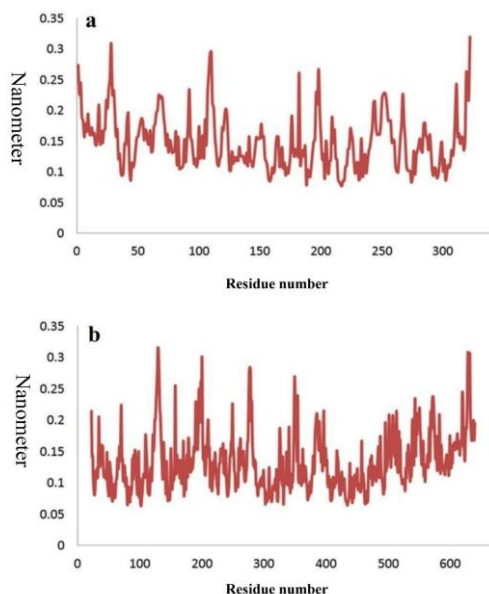
تصویر شماره ۴: اتصال مولکولی کمپلکس پروتئینی ایمونوتوکسین scFv-BmK AGAP: الف: HER2 به عنوان گیرنده (قرمز) و ایمونوتوکسین به عنوان لیگاند (آبی)، ب: نمایش LIGPLOT از تعامل آبگریزی و پیوند هیدروژنی بین پروتئین HER2 و ایمونوتوکسین، پیوندهای هیدروژنی با خطوط آبی بین باقی مانده گیرنده HER2 (آبی) و ایمونوتوکسین (سبز) نشان داده می‌شوند، همچنین برهمکنش‌های آبگریز با خطوط منقطع قرمز بین باقی مانده‌های HER2 (سیاه) و توکسین (آبی) نشان داده می‌شوند.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

پایداری کمپلکس HER2-ایمونوتوکسین با استفاده از مدل سازی دینامیک مولکولی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که میزان RMSD کمپلکس به طور مداوم در کل دوره شبیه سازی ۱۰۰ نانو ثانیه ثابت بود. در شروع زمان شبیه سازی بی ثباتی مشاهده شد ولی کمپلکس ۲۵ نانو ثانیه پس از شبیه سازی به حالت پایدار رسید و نوسانات RMSD کمپلکس کاهش یافت. نتایج نشان داد که میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی ۶ است و کمپلکس با توجه به این که پایداری کمپلکس‌های

تصویر شماره ۳: نمودار Z-Score برای ساختار سه بعدی سازه Z-Score مدل نهایی ۸۰۵۲- است که با نقطه سیاه نشان داده شده است.

اتصال مولکولی Her-2 با ایمونوتوکسین طراحی شده از سرور ClusPro 2 جهت ارزیابی هم ترازایی بهینه برای گیرنده HER2 و ایمونوتوکسین scFv-BmK AGAP استفاده شد. بهترین جهت گیری برای تعامل بهینه بین گیرنده HER2 و ایمونوتوکسین براساس مطالعات داکینگ مولکولی با استفاده از ClusPro 2 انتخاب شد و مدلی با بهترین نتایج از برهمکنش‌های اتصال بین لیگاند و گیرنده و کمترین امتیاز انرژی (۱۰۱۲/۹- کیلوکالری بر مول) ارائه کرد (تصویر شماره ۴، الف). هم چنین با استفاده از سرور LIGPLOT، برهمکنش‌های بین مولکولی بین گیرنده HER2 و ایمونوتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر شماره ۴، ب).

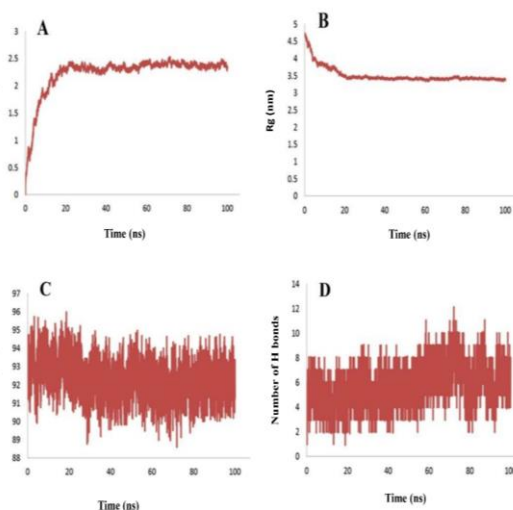


تصویر شماره ۶: a: مقادیر نوسان RMSF ایمونوتوکسین به تنهایی،
b: کمپلکس HER2-ایمونوتوکسین

بحث

در این مطالعه، سعی شده تا یک پپتید کایمیریک جدید با استفاده از روش‌های محاسباتی بیوانفورماتیکی طراحی شود تا ساختار آن قبل از انجام سنجش‌های تجربی پیش‌بینی شود. در این راستا، scFv آنتی بادی اختصاصی HER2 با یک قطعه از پپتید ضد درد به نام BmK AGAP ادغام شد تا اثرات ضد توموری آن در سلول‌های سرطان پستان بررسی شود (۳۳-۳۱). پپتید AGAP از BmK *Buthus martensii* Karsch گرفته شده است که به زیر خانواده پپتیدهای عقرب با زنجیره بلند تعلق دارد. طراحی این ایمونوتوکسین شبیه سازه‌های کایمیریک مطالعات پیشین است. در سال ۲۰۱۷، Sokolova و همکاران، یک ایمونوتوکسین برای سلول‌های سرطان پستان HER2 مثبت طراحی کردند که از یک قطعه scFv آنتی بادی تراستوزوماب و نوکسین سودوموناس (PE40) تشکیل شده بود (۳۴). علاوه بر این، پیرمرادی و همکاران، یک ایمونوتوکسین کایمیریک متشکل از یک قطعه scFv آنتی بادی تراستوزوماب با سم عقرب (نوروتوکسین Bmk) طراحی کردند (۳۵). بنابراین، ساختار پروتئین کایمیریک در

پروتئینی تحت تأثیر تعداد پیوندهای هیدروژنی موجود است، یک کمپلکس پایدار است. چین خوردگی و تراکم پذیری کمپلکس با استفاده از شعاع چرخش (Rg) ارزیابی شد. نمودار Rg کمپلکس نشان داد که این ساختار نسبتاً پایدار است و فقط نوسانات جزئی در ۳٫۵ نانومتر مشاهده شد. مقادیر RMSF نیز برای تعیین میانگین انعطاف پذیری باقیمانده‌ها در کمپلکس اندازه گیری شد. مساحت سطح در دسترس حلال (SASA) برای اندازه گیری انحلال حفره پروتئین و میل ترکیبی لیگاند برای برهمکنش با گیرنده‌اش محاسبه شد. تحلیل نمودار SASA نشان داد که مقدار SASA کمپلکس Her2-توکسین در محدوده ۷۳-۷۹ نانومتر مربع است که پایداری میل ترکیبی اتصال آن را تأیید می‌کند (تصویر شماره ۵). مقادیر RMSF برای ایمونوتوکسین نشان داد که در بسیاری از نقاط، شکل مونومر پروتئین نسبت به اشکال پیچیده آن در معرض نوسانات بسیار بیش‌تری است. همچنین نتایج نشان داد که پایداری کمپلکس پروتئین ایمونوتوکسین هنگامی که با گیرنده HER2 متصل می‌شود بیش‌تر است (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۷: تجزیه و تحلیل شبیه سازی MD کمپلکس -
HER2 ایمونوتوکسین در دوره ۱۰۰ نانوثانیه، A: مقادیر نوسان RMSD،
B: نمودار Rg، C: مقدار SASA، D: تعداد پیوندهای هیدروژنی

ابتدا بر اساس توالی قطعات با استفاده از بانک‌های داده قابل اعتماد طراحی شد. علاوه بر این، از بهترین لینکر انعطاف پذیر بین VL-VH آنتی بادی پر تو زوماب و بین BmK AGAP-scFv استفاده شد. نقش اصلی پیوند دهنده‌ها در پروتئین‌های همجوشی، اتصال دامنه‌های عملکردی به یکدیگر است. در مطالعات مختلف، استفاده از پیوند دهنده‌ها در سازه تأثیر برجسته‌ای بر پایداری، تا خوردگی صحیح، افزایش فعالیت بیولوژیکی و به دست آوردن پرو فایل‌های فارماکو کینتیک مناسب پروتئین‌های همجوشی دارد (۳۶). علاوه بر این، هر گونه انعطاف پذیری در کمپلکس‌های چند پروتئینی به طور کلی به پیوندهای بین دامنه‌ای ساخته شده توسط الیگوپپتیدها وابسته است. بنابراین، یک لینکر انعطاف پذیر با طول حدود ۳٫۵ نانومتر و حاوی اسیدهای آمینه آگزیز G4S برای پیوستن به دامنه‌های متعدد انتخاب شد. با نگاهی به ساختار ثانویه پروتئین کایمریک، مشاهده شد که افزودن توکسین به قطعه scFv آنتی بادی، ساختار ثانویه پروتئین کایمریک مهندسی شده را تغییر نداد. با یافته‌های قبلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ساختار scFv هم پایدار است و هم میل مناسبی برای اتصال به BMK AGAP و HER2 دارد.

پایگاه داده ProtParam برای محاسبه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی AGAP-BmK-scFv استفاده شد. مشخص شد که این پروتئین فیوژن طراحی شده آبدوست بوده که نشان می‌دهد به راحتی می‌تواند با مولکول‌های آب برهمکنش داشته باشد. علاوه بر این، شاخص آلفاتیک بالا ۵۷٫۵۲ نشان داد که پروتئین طراحی شده می‌تواند در برابر حرارت نیز پایدار باشد. شاخص ناپایداری این سازه نیز ۳۴٫۳۷ اعلام شد (شاخص‌های کم‌تر از ۴۰ به عنوان پایدار در نظر گرفته می‌شوند) و نشان داد که scFv+ BmK AGAP به عنوان یک پروتئین پایدار پیش بینی می‌شود. در مطالعه حاضر، پروتئین کایمریک AGAP-BmK-scFv با استفاده از سرور آنلاین AlgPred ارزیابی گردید و نتایج نشان داد که این پروتئین واکنش آلرژیک در بدن انسان ایجاد نمی‌کند.

برای ساخت مدل‌های سه بعدی پروتئین کایمریک، از سرور GalaxyTBM استفاده شد. از مدل‌های سه بعدی می‌توان برای تعیین جزئیات ساختاری و عملکرد مولکولی پروتئین کایمریک استفاده کرد. علاوه بر این، این مدل‌ها می‌توانند مکان‌های اتصال جدید داروهای بالقوه را پیش‌بینی کنند. مدل با بیش‌ترین امتیاز اطمینان (c-score) انتخاب شد (تصویر شماره ۲). محدوده امتیاز C معمولاً بین -۵ تا +۲ است و هرچه این امتیاز بیش‌تر باشد، میزان اطمینان انتخابی در یک مدل بیش‌تر است. بر این اساس، بیش‌ترین نمره c انتخاب شد. کمینه سازی انرژی برای بهبود مدل انتخابی مورد استفاده قرار گرفت و مدلی با مناطق مورد علاقه رامچاندرا ن انتخاب شد. مدل سه بعدی خام از نظر کیفیت و هر گونه خطای احتمالی با استفاده از ProSA-web بررسی شد و ارزیابی ساختاری و آنالیزهای استریو شیمیایی توسط نمودار رامچاندرا ن انجام شد.

ابزارها و سرورهای محاسباتی به طور قابل توجهی برای شناسایی اتصال مولکولی استفاده می‌شوند. بنابراین، از ClusPro 2 برای ارزیابی هم ترازی بهینه برای گیرنده HER2 و پروتئین toxin2 استفاده شد. در این اتصال گیرنده و لیگاند ۱۹ پیوند هیدروژنی و ۱۴ پیوند آبدوست وجود داشت. یافته‌ها تعامل قوی بین پروتئین toxin2 با گیرنده Her2 را نشان داد. با استفاده از وب سرور LIGPLOT، که پیوندهای هیدروژنی را با توجه به پارامترهای هندسی تعریف می‌کند، برهمکنش‌های بین مولکولی بین گیرنده HER2 و پروتئین toxin2 مورد ارزیابی قرار گرفت. از برنامه PyMol (نسخه ۱/۱) برای ایجاد تمام تصاویر ساختاری استفاده شد. پایداری کمپلکس HER2-توکسین با استفاده از مدل سازی دینامیک مولکولی ارزیابی شد.

به طور کلی، هر سه ساختار (توکسین آزاد، گیرنده Her2، و کمپلکس توکسین-Her2) در طول شبیه سازی به ثبات نسبی دست یافتند. ساختار توکسین آزاد و کمپلکس توکسین-Her2 نوسانات کم تری نسبت به گیرنده

غیر متصل Her-2 نشان می‌دهد که نشان می‌دهد سازه به خوبی طراحی شده و ساختاری پایدار دارد. قسمتی و همکاران سال ۲۰۲۲ با استفاده از توکسین DELTA-stichotoxin-Hmg2a و گیرنده Her2 ساختار ایمونوتوکسینی برای درمان سرطان پستان طراحی کردند. نتایج تجزیه و تحلیل نشان داد که ساختار طراحی شده یک پروتئین پایدار است که می‌تواند ساختاری طبیعی داشته باشد و آلرژن نباشد، بنابراین این ایمونوتوکسین می‌تواند به طور موثر گیرنده‌های Her2 را هدف قرار دهد که نتایج مطالعه مطالعه حاضر با نتایج این مطالعه مطابقت داشت (۳۷). همچنین در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۲۲ با استفاده از توکسین DFF40 و گیرنده Her2 ایمونوتوکسینی برای درمان سرطان پستان طراحی شد که نتایج نشان داد که سازه طراحی شده می‌تواند پروتئینی پایدار با حلالیت مناسب باشد که حساسیت زا نیست و ساختار مناسبی دارد که می‌تواند به طور مناسب به Her2 متصل شود. در نهایت، این سازه می‌تواند یک کاندید امیدوار کننده برای تولید یک ایمونوتوکسین هدفمند Her2 باشد. نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر هم خوانی داشت (۳۸).

تحقیقات قبلی برای ارزیابی میل اتصال toxin2 برای گیرنده Her2 و desolvation از حفره پروتئین، سطح قابل دسترسی حلال (SASA) اندازه گیری شد. مقادیر بیش تر SASA نشان دهنده میل ترکیبی لیگاند کم‌تری برای برهمکنش و منطقه قابل دسترسی بیش تر به حلال است. با توجه به تجزیه و تحلیل نمودار SASA، سطح قابل دسترسی در سراسر شبیه سازی MD ثابت باقی ماند. SASA نشان دهنده کسری از سطح پروتئین قابل دسترسی به حلال آب است. تجزیه و تحلیل SASA برای کمپلکس Her2-immunotoxin نشان داد که سطح قابل دسترسی

به حلال مجتمع ثابت مانده و هیچ تضعیف برهمکنش در طول شبیه‌سازی رخ نداده است. وجود پیوند هیدروژنی در تعامل بین لیگاند و گیرنده برای اطمینان از پایداری کمپلکس حیاتی است. نمودار پیوند هیدروژنی کمپلکس Her2-immunotoxin نشان داد که در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD)، تعداد پیوندهای هیدروژنی بین گیرنده Her2 و ایمونوتوکسین با حداقل تغییرات نسبتاً ثابت باقی مانده است. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل ریشه میانگین نوسانات مربع (RMSF) که بر روی اتم‌های ستون فقرات گیرنده Her2 و ایمونوتوکسین انجام شد، نشان داد که نوسانات برای هر دو زیر ۳/۳ نانومتر بود. این یافته نشان می‌دهد که باقی‌مانده‌ها در طول شبیه‌سازی پایدار مانده‌اند و پایداری کافی را نشان می‌دهند. بنابراین، تمام تحقیقات دینامیک مولکولی پایداری ارتباط بین Her2 و ایمونوتوکسین را تایید کردند.

با توجه به نتایج بیوانفورماتیک این مطالعه، ایمونوتوکسین scFv + BmK AGAP به‌عنوان یک پروتئین کایمربک پایدار دارای خواص فیزیکی شیمیایی قبلی است که می‌تواند برای آزمایش در شرایط *in vivo* یا *in vitro* علیه سلول‌های سرطان پستان Her2 مثبت و سایر سرطان‌های Her2 مثبت مانند سرطان معده مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی آبادان انجام شد (کد طرح: 1400U-1341). از تمام کسانی که در این مطالعه یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Fahad Ullah M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Advances Exp Med Biol* 2019; 51-64. PMID: 31456179.
2. McKinney S, Sieniek M, Godbole V, Godwin J, Antropova N, Ashrafian H, et al. international evaluation of an AI system

- for breast cancer screening. *Nature* 2020; 577(7788): 89-94. PMID: 31894144.
3. Aleskandarany M, Ellis I, Rakha E. Molecular Classification of Breast Cancer. *Mol Pathology Library* 2015: 137-155. PMID: 41356117.
 4. Fisusi F, Akala E. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutical Nanotechnology* 2019; 7(1): 3-23. PMID: 30666921.
 5. Mayorga-Flores M, Chantôme A, Melchor-Meneses C, Domingo I, Titau-Delgado G, Galindo-Murillo R, et al. Novel Blocker of Onco SK3 Channels Derived from Scorpion Toxin Tamapin and Active against Migration of Cancer Cells. *Acs Medicinal Chem Letters* 2020; 11(8): 1627-1633. PMID: 32832033.
 6. Bredin P, Walshe J, Denduluri N. Systemic therapy for metastatic HER2-positive breast cancer. *Seminars Oncology* 2020; 47(5): 259-269. PMID: 32896428.
 7. Derakhshani A, Rezaei Z, Safarpour H, Sabri M, Mir A, Sanati M, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. *J Cell Physiology* 2020; 235(4): 3142-3156. PMID: 31566722.
 8. Roskoski R. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacological Res* 2014; 87: 42-59. PMID: 24928736.
 9. Oh D, Bang Y. HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer. *Nature Rev Clin Oncology* 2020; 17(1): 33-48. PMID: 31548601.
 10. Goutsouliak K, Veeraraghavan J, Sethunath V, De Angelis C, Osborne C, Rimawi M, et al. Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nature Rev Clin Oncology* 2020; 17(4): 233-250. PMID: 31836877.
 11. Cesca M, Vian L, Cristóvão-Ferreira S, Pondé N, de Azambuja E. HER2-positive advanced breast cancer treatment in 2020. *Cancer Treatment Rev* 2020; 88: 102033. PMID: 32534233.
 12. Kunte S, Abraham J, Montero A. Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer. *Cancer* 2020; 126(19): 4278-4288. PMID: 32721042.
 13. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *New England J Med* 2017; 377(2): 122-131. PMID: 28581356.
 14. Pernas S, Tolaney S. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. *Therapeutic Advances Med Oncology* 2019; 11. PMID: 30911337.
 15. Baselga J, Gelmon K, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II Trial of Pertuzumab and Trastuzumab in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer That Progressed During Prior Trastuzumab Therapy. *J Clin Oncology* 2010; 28(7): 1138-1144. PMID: 20124182.
 16. Ahmad Z, Yeap S, Ali A, Ho W, Alitheen N, Hamid M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 1-15. PMID: 22474489.
 17. Santos J, Cardoso M, Moreira I, Gonçalves J, Correia J, Verde S, et al. Integrated in Silico and Experimental Approach towards

- the Design of a Novel Recombinant Protein Containing an Anti-HER2 scFv. *Int J Mol Sciences* 2021; 22(7): 3547. PMID: 33805556.
18. Mahmoudi R, Dianat-Moghadam H, Poorebrahim M, Siapoush S, Poortahmasebi V, Salahlou R, et al. Recombinant immunotoxins development for HER2-based targeted cancer therapies. *Cancer Cell Int* 2021; 21(1). PMID: 34488747.
 19. Dueñas-Cuellar R, Santana C, Magalhães A, Pires O, Fontes W, Castro M. Scorpion Toxins and Ion Channels: Potential Applications in Cancer Therapy. *Toxins* 2020; 12(5): 326. PMID: 32429050.
 20. Kampo S, Ahmmed B, Zhou T, Owusu L, Anabah T, Doudou N, et al. Scorpion Venom Analgesic Peptide, BmK AGAP Inhibits Stemness, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Down-Regulating PTX3 in Breast Cancer. *Frontiers Oncology* 2019; 9. PMID: 30740360.
 21. Shao J, Kang N, Liu Y, Song S, Wu C, Zhang J. Purification and characterization of an analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch. *Biomed Chromatography* 2007; 21(12): 1266-1271. PMID: 17604360.
 22. Ma R, Cui Y, Zhou Y, Bao Y, Yang W, Liu Y, et al. Location of the analgesic domain in Scorpion toxin BmK AGAP by mutagenesis of disulfide bridges. *Biochemical Biophysical Res Communications* 2010; 394(2): 330-334. PMID: 20206129.
 23. Sen T, Jernigan R, Garnier J, Kloczkowski A. GOR V server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* 2005; 21(11): 2787-2788. PMID: 15797907.
 24. Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics* 2014; 30(6): 846-851. PMID: 24167156.
 25. Heo L, Park H, Seok C. GalaxyRefine: protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(W1): W384-W388. PMID: 23737448.
 26. Pierce B, Wiehe K, Hwang H, Kim B, Vreven T, Weng Z. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics* 2014; 30(12): 1771-1773. PMID: 24532726.
 27. Desta I, Porter K, Xia B, Kozakov D, Vajda S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure* 2020; 28(9): 1071-1081.e3. PMID: 32649857.
 28. Xue L, Rodrigues J, Kastiris P, Bonvin A, Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics* 2016; 32(23): 3676-3678. PMID: 27503228.
 29. Wallace A, Laskowski R, Thornton J. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering Design Selection* 1995; 8(2): 127-134. PMID: 7630882.
 30. Páll S, Abraham M, Kutzner C, Hess B, Lindahl E. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. *Lecture Notes Computer Sci* 2015: 3-27. PMID: 41384081.
 31. Kampo S, Ahmmed B, Zhou T, Owusu L, Anabah T, Doudou N, et al. Corrigendum:

- Scorpion Venom Analgesic Peptide, BmK AGAP Inhibits Stemness and Epithelial-Mesenchymal Transition by Down-Regulating PTX3 in Breast Cancer. *Frontiers Oncology* 2021; 11. PMID: 34268108.
32. Martinez-Mora E, Arredondo-Espinoza E, Casillas-Vega N, Cantu-Cardenas M, Balderas-Renteria I, Zarate X. The Small Metal-Binding Protein SmbP Improves the Expression and Purification of the Recombinant Antitumor-Analgesic Peptide from the Chinese Scorpion *Buthus martensii* Karsch in *Escherichia coli*. *Current Issues Mol Biol* 2022; 44(2): 550-558. PMID: 35723324.
33. Richard S, Kampo S, Sackey M, Hechavarria M, Buunaaim A. The Pivotal Potentials of Scorpion *Buthus Martensii* Karsch-*Analgesic-Antitumor Peptide* in Pain Management and Cancer. *Evidence Based Complementary Alternative Med* 2020; 2020(1). PMID: 33178316.
34. Sokolova E, Guryev E, Yudintsev A, Vodenev V, Deyev S, Balalaeva I. HER2-specific recombinant immunotoxin 4D5scFv-PE40 passes through retrograde trafficking route and forces cells to enter apoptosis. *Oncotarget* 2017; 8(13): 22048-22058. PMID: 28423549.
35. Burke B. How scorpion venom could yield new cancer treatment. *How Scorpion Venom Could Yield New Cancer Treatment*
36. Chen X, Zaro J, Shen W. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Rev* 2013; 65(10): 1357-1369. PMID: 23026637.
37. Ghesmati Z, Mokhtari S, Parvanak M, Siahkouhi H, Taheri-Anganeh M, Ahmadi K, et al. Designing a humanized immunotoxin based on DELTA-stichotoxin-Hmg2a toxin: an in-silico study. *J Mol Modeling* 2022; 28(12). PMID: 36400988.
38. Movahedpour A, Ahmadi K, Taheri-Anganeh M, Amiri A, Ahmadi N, Khatami S, et al. Designing a Humanized Immunotoxin Based on HER2 Specific scFv and DFF40 Toxin Against Breast Cancer: An In-Silico Study. *Int J Peptide Res Therapeutics* 2022; 28(5).