

Design of a Humanized Immunotoxin Based on Pertuzumab-Derived scFv and Shiga-Like Toxin 2 Subunit A Against Breast Cancer: An In Silico Study

Zeinab Ghesmati¹,
Khadijeh Ahmadi²,
Navid Nezafat³,
Farzaneh Vahedi⁴,
Mortaza Taheri-Anganeh⁵,
Seyyed Hossein Khatami⁶,
Hasan Ghasemi⁷,
Rahmatollah Soltani⁸,
Vahid Zarezade⁸,
Ahmad Movahedpour⁹,
Ehsan Ghasemi¹⁰

¹ PhD in Molecular Medicine, Department of Molecular Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Assistant Professor, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

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

⁴ PhD in Medical Biotechnology, 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 PhD in Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁷ Associate Professor, Department of Basic Sciences, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran

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

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

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

(Received November 3, 2024; Accepted April 13, 2025)

Abstract

Background and purpose: Breast cancer is the second cause of mortality among women. HER2, a member of the epidermal growth factor receptor family, is overexpressed in approximately 25% of breast cancer cases. This receptor represents a valuable therapeutic target in the management of breast cancer. For the treatment of HER2-positive breast cancer, several agents, including trastuzumab (Herceptin), have been approved. Herceptin is a monoclonal antibody capable of binding to the HER2 receptor. A single-chain variable fragment (scFv) derived from Herceptin can also be utilized in the development of immunotoxins targeting HER2-positive cancer cells. Shiga toxins are bacterial exotoxins commonly produced by *Shigella dysenteriae* and certain strains of *Escherichia coli*. The A subunit of Shiga-like toxin 2 (Stx2A) is a potent cytotoxic agent with the potential to kill cancer cells.

Materials and methods: In this insilico study, we employed bioinformatics tools to design an immunotoxin composed of a HER2-specific single-chain variable fragment (scFv) and the A subunit of Shiga-like toxin 2. To construct the immunotoxin, the amino acid sequences of the scFv and Shiga-like toxin 2 subunit A were joined via a peptide linker. The secondary structure, physicochemical properties, solubility, and potential allergenicity of the construct were predicted. The tertiary structure of the immunotoxin was modeled, refined, and evaluated. Protein-protein docking was performed to assess immunotoxin-receptor binding, and molecular dynamics simulations were used to evaluate immunotoxin stability.

Results: According to the findings, the designed construct appears to be a stable protein with adequate solubility, non-allergenic properties, and a structurally favorable configuration for binding to HER2.

Conclusion: In conclusion, the designed construct demonstrates potential for the production of a HER2-targeted immunotoxin. However, further validation through comprehensive in vitro and in vivo immunological assays is necessary to confirm the efficacy and therapeutic potential of the construct.

Keywords: breast cancer, Shiga-like toxin 2 subunit A, Herceptin, Her2, bioinformatics, immunotoxin

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (245): 15-29 (Persian).

Corresponding Author: Ahmad Movahedpour - Yasouj University of Medical Sciences, Yasouj, Iran,
(E-mail: ahmad.movahed14@gmail.com)

Ehsan Ghasemi- Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran (Ehsan_ghasemi1980@gmail.com)

طراحی یک ایمونوتوکسین انسانی بر پایه قطعه متغیر تک زنجیره ای مشتق شده از پروتزماب و زیر واحد A Shiga like toxin2 علیه سرطان پستان: یک مطالعه in-silico

زینب قسمتی^۱
خدیجه احمدی^۲
نوید نظافت^۳
فرزانه واحدی^۴
مرتضی طاهری انگنه^۵
سید حسین خاتمی^۶
حسن قاسمی^۷
رحمت اله سلطانی^۸
وحید زارع زاده^۹
احمد موحدپور^۹
احسان قاسمی^{۱۰}

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان دومین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان است. Her2، یک گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی است که تقریباً در ۲۵ درصد از سرطان‌های پستان بیش از حد بیان می‌شود. این گیرنده ممکن است در درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان نقش مهمی داشته باشد. برای درمان سرطان پستان در بیماران Her2 مثبت، اثرگذاری تعدادی از عوامل دارویی، از جمله (Herceptin) Trastuzumab تایید شده است. هرسپتین یک آنتی‌بادی با توانایی اتصال به گیرنده Her2 است. قطعه V تک زنجیره‌ای (scFv) مشتق شده از هرسپتین نیز می‌تواند برای ایجاد ایمونوتوکسین‌هایی استفاده شود که سلول‌های سرطانی Her2 مثبت را هدف قرار می‌دهد. توکسینوم شیکا، توکسینوم باکتریایی هستند که اغلب از باکتری‌های شیکلا دیستری و/شریشیا کلی تولید می‌شوند. زیر واحد A مربوط به Shiga-like toxin 2 (Stx2A) یک عامل سیتوتوکسیک است که پتانسیل کشتن سلول‌های سرطانی را دارا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه درون رایانه‌ای (in-silico)، از ابزارهای بیوانفورماتیک برای ایجاد یک ایمونوتوکسین حاوی scFv اختصاصی Her2 و Stx2A استفاده گردید. برای ایجاد یک ساختار ایمونوتوکسین، توالی اسید آمینه scFv و Stx2A با استفاده از یک لینکر پتیدی به هم متصل شدند. ساختار دوم و سوم، خواص فیزیکوشیمیایی، حلالیت و حساسیت زایی سازه پیش‌بینی شده ارزیابی شد. اتصال به گیرنده ایمونوتوکسین و پایداری ایمونوتوکسین به ترتیب با استفاده از اتصال پروتئین-پروتئین و دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس یافته‌ها، سازه طراحی شده می‌تواند پروتئینی پایدار با حلالیت کافی باشد که حساسیت‌زا نیست و ساختار مناسبی برای اتصال به Her2 دارد. در نهایت نیز، انتظار می‌رود این سازه قابلیت تولید یک ایمونوتوکسین Her2 را داشته باشد.

استنتاج: این ایمونوتوکسین پس از انجام مطالعات in vitro و in vivo می‌تواند به عنوان گزینه جهت درمان سرطان پستان به کار رود..

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، Shiga-like toxin 2، هرسپتین، Her2، ایمونوتوکسین

E-mail: ahmad.movahed14@gmail.com

E-mail: Ehsan_ghasemi1980@gmail.com

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

احسان قاسمی، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، گروه علوم پایه

۱. دکتری پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
۳. استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۴. دکتری زیست فناوری پزشکی، 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. دکتری بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۷. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، 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. استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۹/۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۱/۲۴

مقدمه

سرطان پستان، در سراسر جهان به عنوان یکی از شایع ترین سرطان‌ها تشخیص داده شده و علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است (۱). شواهد زیادی نشان می‌دهد که عوامل ژنتیکی و محیطی می‌توانند با شروع و پیشرفت سرطان پستان مرتبط باشند (۲). یکی از مهم ترین جنبه های درمان سرطان پستان، تشخیص زود هنگام این بیماری است (۳). این نوع سرطان در مراحل ابتدایی معمولاً با جراحی، پرتو درمانی یا استفاده از داروها درمان می‌شود (۴). در نتیجه بسیاری از بیماران سرطانی عوارض جانبی درمان‌های مرسوم و طولانی مدت سرطان را متحمل می‌شوند (۵-۷).

با توجه به این عوامل، محققان مفهوم جدیدی برای درمان سرطان به نام "ایمونوتوکسین" را بیان کردند (۸). در این روش آنتی‌بادی‌ها با پلی‌پپتیدهای "توکسینی" ترکیب می‌شوند که سنتز پروتئین را در سلول هدف مهار کنند (۹). آنتی‌بادی مولکول پروتئین هیبریدی را به توکسین سلول تومور هدایت می‌کند، جایی که پلی‌پپتید توکسینی به غشای سلول نفوذ می‌کند و سنتز پروتئین را به صورت آنزیمی مهار می‌کند (۱۰). در نسل اول ایمونوتوکسین‌ها، کل توالی توکسین با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ترکیب می‌گردید که این نسل دارای معایبی از جمله از دست دادن عملکرد اختصاصی و پایداری پایین بوده است (۱۱). در نسل دوم، تنها توالی توکسینی پروتئین که برای کشتن سلول‌های سرطانی ضروری هستند، استفاده شد (۱۲). ایمونوتوکسین‌های نسل سوم، که به عنوان ایمونوتوکسین‌های نو ترکیب نیز شناخته می‌شوند، در دهه ۱۹۹۰ با استفاده از فناوری DNA نو ترکیب توسعه یافتند (۱۳). در جدیدترین نسل، از تکنیک‌های کلونینگ مولکولی برای ایجاد پروتئین‌های فیوژن حاوی قطعات آنتی‌بادی و توکسین‌های توکسینی توکسین با فعالیت آنزیمی استفاده شده است (۱۴). ایمونوتوکسین‌های نو ترکیب فعالیت و ویژگی بسیار خوبی را علیه سلول‌های سرطانی و مدل‌های تومور

حیوانی از خود نشان داده‌اند (۱۵). آزمایش‌های بالینی در حال انجام ارتباط بین داده‌های پیش‌بالینی امیدوار کننده و نتایج موفقیت آمیز در درمان تجربی سرطان را نشان می‌دهد. دنیلوکین دیفیتوکس (DAB389IL2) اولین ایمونوتوکسین تایید شده توسط سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) بود (۱۶).

گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (HER2) به عنوان یک هدف احتمالی برای درمان و تشخیص سرطان شناسایی شده است. گلیکوپروتئین گذرنده HER2 در ۲۰ تا ۳۰ درصد از سرطان‌های سینه بیش از حد بیان می‌شود (۱۷). این گیرنده به همراه سه گیرنده دیگر (HER1، HER2، HER3 و HER4) از خانواده گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) است (۱۸). HER2 رشد و تمایز سلول‌های اپیتلیال را تنظیم می‌کند (۱۹). برخلاف سایر گیرنده های خانواده EGF، دامنه خارج سلولی گیرنده HER2 فاقد لیگاند شناخته شده است (۲۰). این گیرنده در حالت فعال وجود داشته و قادر به تشکیل دایمرهای بدون لیگاند با سایر گیرنده‌های EGF است (۲۱). بیان بیش از حد HER2 با بیماری تهاجمی تر، افزایش خطر بازگشت بیماری و شانس کم زنده ماندن همراه است (۲۲). در نتیجه، HER2 یک پیش آگهی برای درمان سرطان پستان است (۲۳).

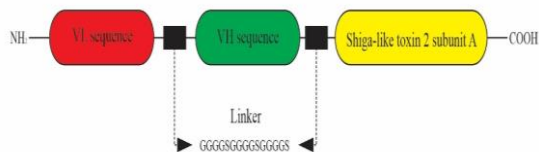
یکی از جالب ترین درمان‌های هدفمند HER2، پروتئینی است که هدف خاصی را شناسایی کرده و به آن متصل می‌شود. تراستوزوماب یک آنتی بادی مونوکلونال است که اولین پروتئین میل ترکیبی است که در سال ۲۰۱۲ برای درمان برخی از سرطان های HER2 مثبت از جمله سرطان سینه تایید شد (۲۴). مشاهده شده که مکانیتوکسین‌های خارج سلولی مانند توکسینیت سلولی وابسته به آنتی‌بادی (ADCC) و مکانیتوکسین‌های درون سلولی مانند آپوپتوز، توقف چرخه سلولی و مهار رگ زایی در عملکرد Pertuzumab دخیل هستند (۲۵). با توجه پیشرفت در فناوری آنتی بادی نو ترکیب، درک از ساختار و عملکرد ایمونوگلوبولین افزایش یافته

مواد و روش‌ها

طراحی سازه

در این مطالعه درون رایانه ای (in-silico)، توالی‌های زیر واحد A توکسین مورد مطالعه و Pertuzumab scFv شامل توالی VL و VH به ترتیب از بانک اطلاعات پروتئینی PDB و Uniprot به دست آمد (PDB ID: 4LLU، شناسه Stx2A: P09385).

برای طراحی سازه نو ترکیب، آنتی‌بادی‌ها (VL-VH) (pertuzumab) را با استفاده از یک لینکر انعطاف‌پذیر (GGGSGGGSGGGSGGGS) به هم متصل کرده و پس از تشکیل scFv، با اتصال Stx2A scFv و scFv توسط توالی GGGSGGGSGGGSGGGS به عنوان یک پیونددهنده ایده آل، ایمونوتوکسین مورد نظر طراحی شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: توالی اسید آمینه ایمونوتوکسین طراحی شده (شامل توالی اسید آمینه VL، VH و توکسین Stx2A)

بررسی ساختار ثانویه ایمونوتوکسین

در این مرحله، ساختار ثانویه scFv متصل به Stx2A از طریق سرور SOPMA مورد بررسی قرار گرفت (۳۹). این سرور خصوصیات ساختاری ثانویه سازه نهایی و هم‌چنین چهار حالت ساختاری (به عنوان مثال، مارپیچ، صفحه، چرخش و سیم پیچ) را پیش‌بینی کرد.

بررسی خواص فیزیکی‌وشیمیایی و حساسیت‌زایی ایمونوتوکسین

از ProtParam به عنوان یک وب سرور آنالیز در دسترس برای ارزیابی چندین پارامتر فیزیکی‌وشیمیایی توالی ایمونوتوکسین (شامل نقطه ایزوالکتریک PI،

است (۲۶). علاوه بر این، این پیشرفت‌ها منجر به ایجاد طیف متنوعی از مولکول‌های آنتی‌بادی مهندسی شده برای تحقیق، تشخیص و درمان با ویژگی‌های فراتر از فناوری آنتی‌بادی مرسوم شده است (۲۷). قطعات Fv کوچک‌ترین بخش عملکردی آنتی‌بادی هستند که برای حفظ اتصال و اختصاصیت کلی آنتی‌بادی لازم است. آنتی‌بادی‌ها از زنجیره‌های سنگین متغیر و زنجیره‌های سبک متغیر تشکیل شده‌اند (۲۷، ۲۸). Fv‌های پایدار را می‌توان با پیوند دادن دامنه‌های VL و VH توسط یک لینکر پپتیدی تولید کرد (۲۹). scFvs نامی است که به این مولکول‌های نو ترکیب داده شده است (۳۰). مشاهده شده که این نوع ساختارهای مهندسی شده در مقایسه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال طبیعی، ایمنی‌زایی را کاهش می‌دهند (۳۱). در نتیجه، آنتی‌بادی‌های طراحی شده می‌توانند به انواع مختلف توکسینوم متصل شوند تا قوی‌ترین ایمونوتوکسین‌ها را تولید کنند (۳۲).

توکسین‌های شیکا (Stx) پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزومی هستند که توسط شیکا دیسانتریا سروتیپ ۱ و سویه‌های خاصی از *شریشیا کلی* تولید می‌شوند. توکسینوم از یک زیر واحد A و پنج زیر واحد B تشکیل شده‌اند که به نام AB5toxins نیز شناخته می‌شوند (۳۳). سلول‌های سرطانی انسانی زمانی که در معرض زیر واحد A، Shiga-like toxin 2 قرار می‌گیرند نسبت به آپوپتوز و توقف چرخه سلولی، حساس‌تر هستند. مطالعات پیشین اهمیت ایمونوتوکسین‌ها را در ایمونوتراپی سرطان، به ویژه برای سرطان پستان نشان داده است (۳۴-۳۶). علاوه بر این، رویکردهای بیوانفورماتیک امکان تجزیه و تحلیل سریع و دقیق داده‌های بیولوژیکی و طراحی پروتئین‌های جدید را فراهم می‌کند (۳۷، ۳۸).

در این مطالعه، یک ایمونوتوکسین موثر را با ترکیب scFv اختصاصی HER2 با زیر واحد A، Shiga-like toxin 2 ایجاد کرده و با استفاده از انواع روش‌های محاسباتی، پایداری ساختار طراحی شد و توانایی پروتئین برای اتصال به گیرنده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

وزن مولکولی (MW)، شاخص آلفاتی، شاخص ناپایداری و میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) استفاده شد (۴۰). آلرژی زایی بالقوه ساختار کایمریک توسط AllerTOP v.2.0 مورد بررسی قرار گرفت. مزیت سرور AllerTOP v.2.0 این است که از روش Auto Cross-Covariance بسیاری از آلرژن‌ها و غیر حساسیت‌زاها از گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌دهد (۳۰، ۴۱).

بررسی پایداری mRNA

وب سرور RNAfold، بر اساس حداقل سازی انرژی، جهت پیش بینی ساختار ثانویه mRNA پروتئین کایمریک استفاده شد.

پیش‌بینی، اصلاح و ارزیابی ساختار سه بعدی سازه طراحی شده

از وب سرور Iterative Threading (I-TASSER) ASSEMBLY Refinement server به عنوان یک سرور آنلاین رایگان استفاده گردید که به طور گسترده برای پیش‌بینی ساختارهای سه بعدی ایمونوتوکسین طراحی شده استفاده می‌شود (۴۲). این سرور ساختار و عملکرد پروتئین را با یک رویکرد سلسله مراتبی پیش‌بینی می‌کند. در ابتدا با توجه به امتیاز، بهترین ساختار سه بعدی انتخاب می‌شود. سپس از سرور GalaxyRefine برای اصلاح ساختار انتخاب شده و برای بهبود بیش‌تر استفاده شد (۴۳). سه ابزار وب رایگان در دسترس برای تجزیه و تحلیل اعتبار مدل‌های سه بعدی انتخابی، در دو مرحله قبل و بعد از پالایش استفاده شدند.

ابزار ProSA-web، خطاها را در مدل‌های سه بعدی ساختارها از طریق محاسبه نمره کیفیت کلی (امتیاز Z) تشخیص می‌دهد (۴۴). اگر امتیاز Z تخمینی ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده خارج از محدوده مشخصه برای پروتئین‌های معیار باشد، احتمالاً خطاهای ساختاری را نشان می‌دهد.

ابزار PROCHECK از نمودار Ramachandran برای اعتبار سنجی استفاده می‌کند. در نهایت،

باقی‌مانده‌ها به سه منطقه مناطق مورد علاقه، مجاز و غیر مجاز طبقه‌بندی می‌شوند (۴۵).

ابزار ERRAT، به عنوان یک روش آزمایشی مبتنی بر اتم، ساختارهای سه بعدی پیش‌بینی شده را با محاسبه می‌کند و بر اساس مقادیر اشتباه برهمکنش‌های اتمی غیر پیوندی در ساختارهای پروتئینی مدل‌سازی شده اعتبار می‌بخشد (۴۶).

اتصال مولکولی ایمونوتوکسین طراحی شده با گیرنده Her-2

در این مطالعه برای بررسی برهمکنش ایمونوتوکسین طراحی شده به عنوان لیگاند با Her-2 به عنوان گیرنده، آنالیز داکینگ مولکولی با استفاده از وب سرور Cluspro انجام شد و پارامترهای پیش‌فرض سرور اعمال شد (۴۷).

شبیه سازی دینامیک مولکولی

برای تثبیت ساختارها در یک محیط فیزیولوژیکی آبی، گیرنده Her-2 و توکسین طراحی شده به مدت ۱۰۰ نانو ثانیه شبیه سازی شدند. همچنین، کمپلکس توکسین-HER2 با بهترین طراحی برای مطالعات دینامیک مولکولی (MD) انتخاب شد. نرم‌افزار GROMACS 2018 برای اجرای شبیه‌سازی MD استفاده شد. ساختارها با استفاده از OPLS (میدان نیروی پتانسیل بهینه برای شبیه‌سازی مایع) برای کشف پایداری و تغییرات مدل‌سازی شدند. مولکول‌ها در یک جعبه حلال 10°A پر از مولکول‌های آب نقطه شارژ ساده (SPC) قرار داده شدند. با وارد کردن مقدار کافی Na^+ و Cl^- ، بار سیستم خنثی شد. روش کمینه‌سازی انرژی برای همه شبیه‌سازی‌های MD شامل دو بخش بود. سیستم‌ها برای ۱۰۰ پیکوثانیه (ps) با استفاده از تعداد ذرات ثابت، حجم و دما (NVT) و تعداد ثابت ذرات، فشار و دما (NPT) متعادل شدند. سیستم با استفاده از باروستات Parrinello-Rahman برای دستیابی به فشار و

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و حساسیت زایی
ایمونوتوکسین

سرور ProtParam پارامترهای ویژگی فیزیکوشیمیایی
سازه های نو ترکیب را تجزیه و تحلیل کرد و برای بررسی
حساسیت ایمونوتوکسین طراحی شده، از سرور
AllerTOP v.2.0 استفاده شد (جدول شماره ۱).

این سرور پیش بینی کرد که ساختار پروتئین
کایمریک زیر واحد A توکسین scFv+ 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.

جدول شماره ۱: پارامترهای فیزیکوشیمیایی و حساسیت زایی
ایمونوتوکسین طراحی شده

ویژگی ها	نتیجه
تعداد اسید آمینه ها	۵۵۴
وزن مولکولی	۵۹۹۹۶/۸۸ دالتون
فرمول شیمیایی	C ₂₆₄₃ H ₄₀₉₄ N ₇₄₀ O ₈₃₂ S ₁₄
pI تئوری	۸.۳۹
تعداد نهایی اسید آمینه های دارای بار منفی (آسپارات و گلوتمات)	۴۳
تعداد نهایی اسید آمینه های دارای بار مثبت (آرژینین و لیزین)	۴۶
تعداد نهایی اتم ها	۸۳۲۳
شاخص ناپایداری	۳۸/۱۷
شاخص آلفا تیک	۷۳/۳۶
میانگین هیدروپاتی	-۰/۲۴۵
امکان آلرژن بودن	احتمالا آلرژن نیست

بررسی پایداری mRNA

برای پیش بینی پایداری احتمالی mRNA
کایمریک، از نرم افزار آنالین RNAfold برای تخمین
حداقل انرژی آزاد استفاده شد. نتایج نشان داد که انرژی
آزاد مجموعه ترمودینامیکی ۷۳۵/۱۱- کیلوکالری بر
مول (پایدار) بود. تصویر شماره ۳ ساختار ثانویه سازه
mRNA را نشان می دهد.

اصلاح و ارزیابی ساختار سه بعدی سازه نو ترکیب

سرور I-TASSER پنج ساختار سه بعدی را برای
توالی پروتئین کایمریک پیش بینی کرد که از میان آنها
بهترین ساختار با بالاترین امتیاز C (۱/۸۰-) انتخاب شد
(تصویر شماره ۴، A).

دمای ثابت ۱/۰ بار و K_{3۰۰} متعادل شد. روش ذرات
مش (PME) Ewald برای درمان الکترواستاتیک دور
برد با فاصله شبکه ۰/۱۶ نانومتر و فاصله قطع A_{1۰}
استفاده شد. با قطع ۱ نانومتر، برهمکنش های واندروالس
(VDW) محاسبه شد. در نهایت، شبیه سازی دینامیک
مولکولی برای هر سیستم شبیه سازی (به مدت ۱۰۰
نانوثانیه (ns) با دو مرحله زمانی فمتوثانیه (fs) استفاده
شد. پایداری سیستم های شبیه سازی با استفاده از ریشه
میانگین مربعات انحراف (RMSD) و شعاع چرخش
(Rg) ارزیابی شد. علاوه بر این، در طول شبیه سازی، از
نوسانات ریشه میانگین مربع (RMSF) برای تجزیه و
تحلیل نوسان اسیدهای آمینه استفاده شد.

این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش های زیست
پزشکی دانشگاه علوم پزشکی آبادان با کد اخلاق
IR.ABADANUMS.REC.1401.106 مورد بررسی
قرار گرفت و تصویب شد.

یافته ها

بررسی ساختار ثانویه ایمونوتوکسین

سرور SOPMA برای پیش بینی ساختار ثانویه
پروتئین کایمریک استفاده شد (تصویر شماره ۲). طبق
پیش بینی درصد حالت های ساختاری پیش بینی شده در
ساختار نهایی شامل ۲۲/۵۶ درصد نواحی آلفا-مارپیچ،
۳۱/۴۱ درصد رشته های توسعه یافته، ۹/۲۱ درصد
چرخش بتا و ۳۶/۸۲ درصد پیچش تصادفی است.

MA :

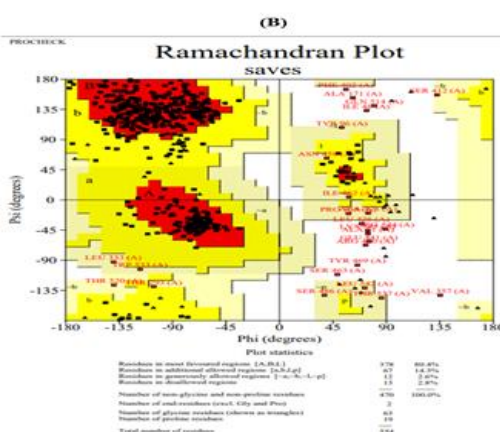
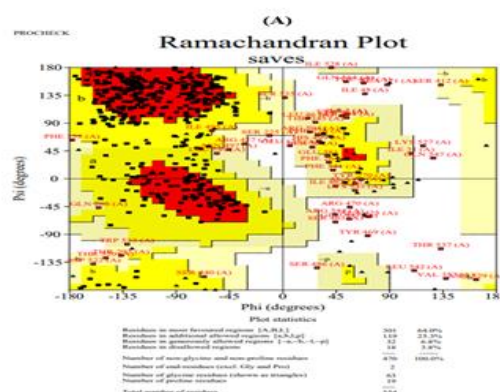
Alpha helix	(Hh)	: 125 is	22.56%
3 ₁₀ helix	(Gg)	: 0 is	0.00%
Pi helix	(Ii)	: 0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	: 0 is	0.00%
Extended strand	(Ee)	: 174 is	31.41%
Beta turn	(Tt)	: 51 is	9.21%
Bend region	(Ss)	: 0 is	0.00%
Random coil	(Cc)	: 204 is	36.82%
Ambiguous states (?)		: 0 is	0.00%
Other states		: 0 is	0.00%

تصویر شماره ۲: نتایج مربوط به تحلیل ساختار ثانویه ایمونوتوکسین

در منطقه غیر مجاز هستند. در حالی که در ساختار اولیه، تجزیه و تحلیل نمودار رامچاندرا نشان داد که ۶۴/۰، ۲۵/۳ و ۳/۸ درصد از باقیمانده‌ها به ترتیب در مناطق مطلوب، مجاز و غیر مجاز قرار داشتند. قطعات Ramachandran به دست آمده برای سازه‌های اولیه و اصلاح شده در تصویر شماره ۵ آورده شده است.



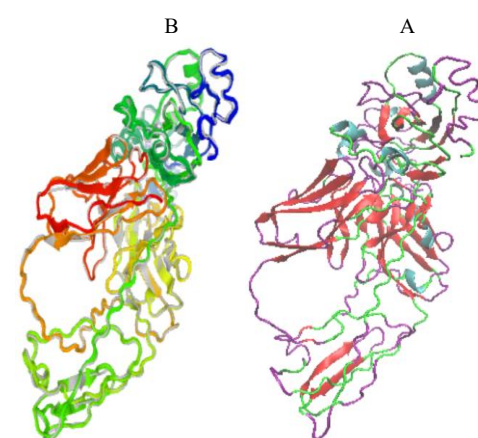
تصویر شماره ۳: بررسی پایداری mRNA براساس پیش بینی انرژی آزاد مجموعه ترمودینامیکی



تصویر شماره ۵: A: آنالیز PROCHECK برای ساختارهای اولیه، B: اصلاح شده

ProSA-web کیفیت مدل را بیش تر ارزیابی کرد، با توجه به نتایج ProSA-web، امتیاز Z مدل اصلی ۶/۱- بود که برای بهبود بیش تر این مدل، پس از تمام اصلاحات، مدل تصفیه شده به امتیاز Z به ۶/۸۶- رسید (تصویر شماره ۶). علاوه بر این، نتایج تجزیه و تحلیل نمودار ERRAT نشان داد که فاکتورهای کیفی کلی در سازه‌های اولیه و اصلاح شده به ترتیب ۶۷/۹۵۳۷ و ۷۶/۳۷۴۷ بود.

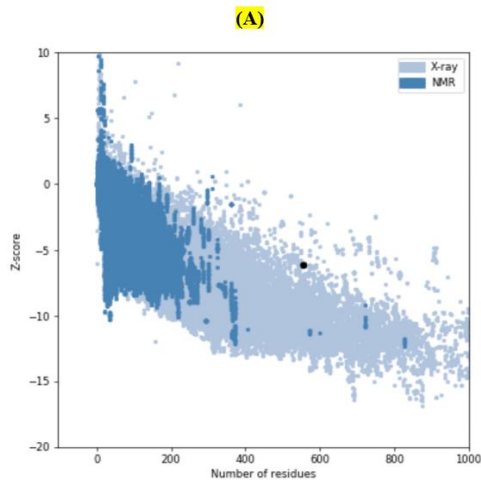
ساختار سه بعدی مدل انتخابی با استفاده از سرور GalaxyRefine اصلاح شد و اطلاعات تغییرات ساختاری از ساختار اولیه بر حسب RMSD، MolProbity plot، Ramachandran، GDT-HA، روتامرهای ضعیف و امتیاز مجموع ارائه شده است. مدل ساخته شده با مطلوب ترین منطقه در نمودار Ramachandran انتخاب شد (تصویر شماره ۴، B). مدل ۴ به عنوان بهترین مدل تصفیه شده در نظر گرفته شد.



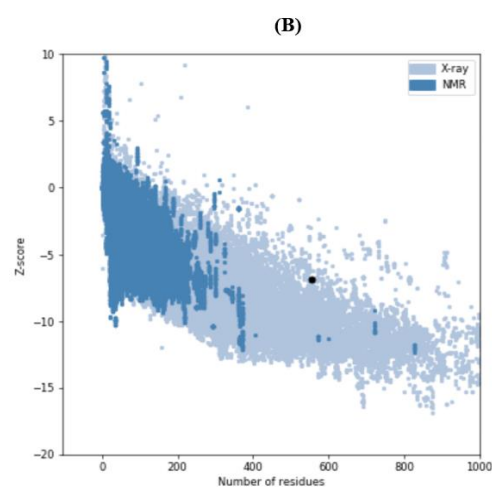
تصویر شماره ۶: A: ساختار سه بعدی پیش بینی شده برای پروتئین فیوژن توسط سرور I-TASSER، B: ساختار اصلاح شده براساس خروجی سرور GalaxyRefine

سه سرور شامل ProSA-web، PROCHECK و ERRAT برای اندازه گیری سطح کیفیت و خطاهای احتمالی در مدل انتخاب شده از مرحله قبل استفاده شدند. اعتبار ساختار اصلاح شده توسط PROCHECK تأیید کرد که ۸۰/۴ درصد از باقیمانده‌ها در منطقه مطلوب، ۱۴/۳ درصد در منطقه مجاز و تنها ۲/۸ درصد

Z-Score: -6.1



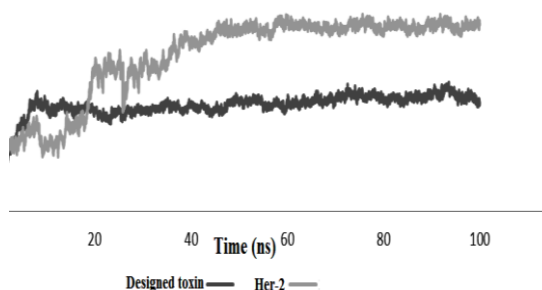
Z-Score: -6.86



تصویر شماره ۶: A: امتیازهای Z پیش بینی شده توسط وب سرور PROSA برای ساختار اولیه، B: ساختار اصلاح شده

مطالعه شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس Her2-toxin

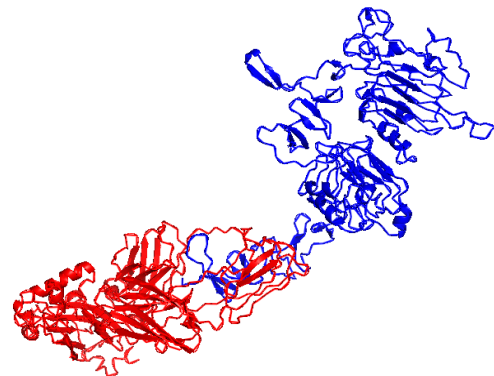
پایداری گیرنده غیر متصل Her-2، توکسین طراحی شده و توکسین متصل به گیرنده Her2 با شبیه سازی MD ارزیابی شد. مقادیر RMSD گیرنده و لیگاند ناپیوسته نشان داد که ساختارهای گیرنده ناپیوسته Her-2 و توکسین طراحی شده قبل از برهمکنش پایدار بودند. هم چنین، تجزیه و تحلیل مقادیر RMSD نشان داد که کمپلکس توکسین-Her2 پس از ۴۰ ns به ثبات رسیده است (تصویر شماره ۸).



تصویر شماره ۸: مقادیر RMSD ایمونوتوکسین طراحی شده بدون پیوند با گیرنده Her-2 و ایمونوتوکسین طراحی شده متصل شده به گیرنده Her-2 در طول شبیه سازی 100 ns

اتصال مولکولی Her-2 با ایمونوتوکسین طراحی شده

مدل های سه بعدی برای برهم کنش بین گیرنده Her-2 و زیر واحد A توکسین مورد مطالعه + scVF با استفاده از وب سرور Cluspro ایجاد شد. بهترین مدل پیش بینی شده برای ایمونوتوکسین طراحی شده و مجموعه گیرنده Her-2 انتخاب شده است. مدل شماره ۱۰ بهترین نتایج را از برهمکنش های اتصال بین لیگاند و گیرنده و کم ترین امتیاز انرژی (۱۰۶۷/۷- کیلوکالری بر مول) ارائه کرد (تصویر شماره ۷).



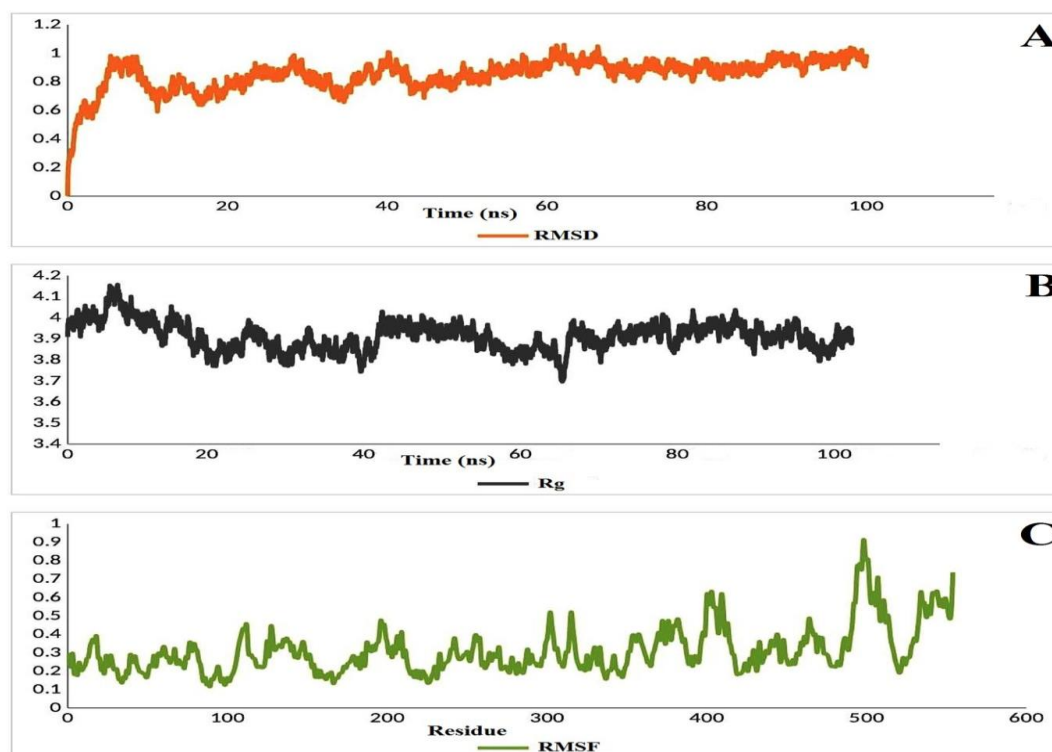
تصویر شماره ۷: اتصال مولکولی زیر واحد A توکسین در ساختار کلی ایمونوتوکسین مورد مطالعه به عنوان یک لیگاند با گیرنده Her-2 (آبی) (۴۸)

چین خوردگی و تراکم پذیری با استفاده از شعاع چرخش (Rg) ارزیابی شد. نمودار Rg گیرنده توکسین-Her2 نشان می‌دهد که کمپلکس با نوسانات جزئی در محدوده ۳/۸ تا ۴/۱ نانومتر، نسبتاً پایدار است. مقادیر RMSF نیز برای تعیین میانگین انعطاف پذیری باقیمانده‌ها در مجتمع اندازه گیری شد (تصویر شماره ۹، A، B، C).

بحث

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان و علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است (۴۸). با شیوع تخمینی ۲۰۰۰۰۰ مورد، سرطان پستان تقریباً ۳۰ درصد موارد سرطانی تازه تشخیص داده شده را در هر سال تشکیل می‌دهد (۴۹). گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (HER-2) تیروزین کیناز، تکثیر و رشد سلولی را تنظیم می‌کند (۵۰). گیرنده HER2 که به آن ErbB2 یا گیرنده p185 نیز گفته می‌شود (۵۱). در زیر مجموعه‌ای از

سرطان‌های پستان، بیان بیش از حد گیرنده HER2 عامل اصلی توسعه و پیشرفت تومور است (۵۲). تقریباً ۲۰ درصد از بیماران در مراحل اولیه سرطان پستان، تقویت ژن HER2 و/یا بیان بیش از حد را در سطح RNA یا پروتئین پیام رسان نشان می‌دهند (۵۳). تراستوزوماب، اولین درمان علیه HER2 با تایید FDA، یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی نو ترکیب است که علیه ناحیه خارج سلولی HER2 فعالیت دارد (۵۴). علل بالقوه مقاومت به درمان هدفمند HER2 (از جمله تراستوزوماب) در سرطان پستان شناسایی شده است (۵۵، ۵۶). واضح است که رویکردهای درمانی جدید برای حذف محدودیت‌های درمانی و بهبود نتایج درمان در سرطان پستان HER2 مثبت حیاتی هستند (۵۷). ایمونوتوکسین‌ها مولکول‌های آنتی‌بادی-توکسین دو عملکردی هستند که سلول‌های هدف (بیش‌تر سلول‌های سرطانی) را از طریق عمل توکسین در داخل سلول می‌کشند (۵۸).



تصویر شماره ۹: تجزیه و تحلیل RMSD، Rg، و RMSF کمپلکس طراحی شده توکسین-Her2 در طول شبیه‌سازی MD، A: مقادیر نوسان RMSD، B: نمودار Rg، C: مقادیر RMSF

24

سرطان پستان طراحی شد که نتایج نشان داد که سازه طراحی شده می تواند پروتئینی پایدار با حلالیت مناسب باشد که حساسیت زا نیست و ساختار مناسبی دارد که می تواند به طور مناسب به HER2 متصل شود. در نهایت، این سازه می تواند یک کاندید امیدوار کننده برای تولید یک ایمونوتوکسین هدفمند HER2 باشد. نتایج این مطالعه با مطالعه هم خوانی داشت (۶۵).

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی آبادان انجام شد (کد طرح: 1401U-1503). از تمام کسانی که در این مطالعه یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

طول شبیه سازی به ثبات نسبی دست یافتند. ساختار توکسین آزاد و کمپلکس توکسین-Her2 نوسانات کمتری نسبت به گیرنده غیر متصل Her-2 نشان می دهد که نشان می دهد سازه به خوبی طراحی شده و ساختاری پایدار دارد. موحدپور 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 می تواند ساختاری طبیعی داشته باشد و آلرژن نباشد، بنابراین این ایمونوتوکسین می تواند به طور موثر گیرنده های HER2 را هدف قرار دهد که نتایج مطالعه حاضر با نتایج این مطالعه مطابقت داشت (۶۴). هم چنین در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۲۲ با استفاده از توکسین DFF40 و گیرنده Her2 ایمونوتوکسینی برای درمان

References

1. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol* 2022; 95(1130): 20211033. PMID: 34905391.
2. Jafari SH, Saadatpour Z, Salmaninejad A, Momeni F, Mokhtari M, Nahand JS, et al. Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *J Cell Physiol* 2018; 233(7): 5200-5213. PMID: 29219189.
3. Mashekova A, Zhao Y, Ng EY, Zarikas V, Fok SC, Mukhmetov O. Early detection of the breast cancer using infrared technology—A comprehensive review. *Therm Sci Eng Prog* 2022; 27: 101142.
4. Blaes AH, Konety S, Hui J, Dusenbery K, Yuan J, Dent S, et al. How to treat breast cancer after childhood cancer: management of oncologic and cardiovascular concerns. *Cardio Oncol* 2022; 4(1): 126-129. PMID: 35492817.
5. Milliron B-J, Packel L, Dychtwald D, Klobodu C, Pontiggia L, Ogbogu O, et al. When eating becomes torturous: understanding nutrition-related cancer treatment side effects among individuals with cancer and their caregivers. *Nutrients* 2022; 14(2): 356. PMID: 35057538.
6. Herrmann J. Cardio-oncology practice manual: a companion to Braunwald's Heart Disease. Elsevier Health Sciences; 2022.
7. Henry G, Butow P, Juraskova I, Laidsaar-Powell R, Shaw J. Measuring female breast cancer survivors' concerns about late effects of treatment: initial development of the Concerns about Late Effects in Oncology Questionnaire (CLEO). *Support Care Cancer* 2022; 30(1): 1-10. PMID: 35022883.
8. Bortolotti M, Polito L, Bolognesi A. Toxin and immunotoxin based therapeutic approaches. *MDPI*; 2022. p. 63. PMID: 35051040.

9. Shipunova VO, Deyev SM. Artificial scaffold polypeptides as an efficient tool for the targeted delivery of nanostructures in vitro and in vivo. *Acta Naturae* 2022; 14(1): 54. PMID: 35441046.
10. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Mojzych M, Marciniak B, Drozda R, et al. Targeting carbonic anhydrase IX and XII isoforms with small molecule inhibitors and monoclonal antibodies. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2022; 37(1): 1278-1298. PMID: 35506234.
11. Sefid F, Alagheband Bahrami A, Payandeh Z, Khalili S, Azamirad G, Kalantar SM, et al. Ofatumumab and Granzyme B as immunotoxin against CD20 antigen. *In Silico Pharmacol* 2022; 10(1): 6. PMID: 35369404.
12. Hashemi Yeganeh H, Heiat M, Kieliszek M, Alavian SM, Rezaie E. DT389-YP7, a recombinant immunotoxin against glypican-3 that inhibits hepatocellular cancer cells: An in vitro study. *Toxins* 2021; 13(11): 749. PMID: 34822533.
13. Zuppone S, Fabbrini MS, Vago R. Hosts for hostile protein production: the challenge of recombinant immunotoxin expression. *Biomedicines* 2019; 7(2): 38. PMID: 31108917.
14. Lee S, Park S, Nguyen MT, Lee E, Kim J, Baek S, et al. A chemical conjugate between HER2-targeting antibody fragment and *Pseudomonas* exotoxin A fragment demonstrates cytotoxic effects on HER2-expressing breast cancer cells. *BMB Rep* 2019; 52(8): 496. PMID: 30670149.
15. Xing Y, Xu K, Li S, Cao L, Nan Y, Li Q, et al. A single-domain antibody-based anti-PSMA recombinant immunotoxin exhibits specificity and efficacy for prostate cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2021; 22(11): 5501. PMID: 34071152.
16. Bayat S, Zeinoddini M, Azizi A, Nasiri Khalili M. Co-solvents effects on the stability of recombinant immunotoxin denileukin diftotox: Structure and function assessment. *Iran J Sci Technol Trans A Sci* 2019; 43: 2091-2097.
17. Wang S, Wang Y, Li Q, Li X, Feng X. A novel circular RNA confers trastuzumab resistance in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer through regulating ferroptosis. *Environ Toxicol* 2022; 37(7): 1597-1607. PMID: 35234341.
18. Xie J, Zou Y, Gao T, Xie L, Tan D, Xie X. Therapeutic Landscape of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *Cancer Control* 2022; 29: 10732748221099230. PMID: 35499382.
19. Mohanapure NS, Khandeparkar SGS, Saragade PB, Gogate BP, Joshi AR, Mehta SR. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor, human epidermal growth factor receptor 2/neu, p53, and Ki67 in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 2022; 26(1): 127-128. PMID: 35571320.
20. Sikorski E, Rizzo S, Gerritsen J, White F, Lazzara M, Thevenin D. Promoting receptor protein tyrosine phosphatase activity by targeting transmembrane domain interactions. *Biophys J* 2022; 121(3): 83a-84a.
21. Ramić S, Paić F, Smajlbegović V, Perić Balja M, Hiršl L, Marton I, et al. Non-phosphorylated Tyr-1248 form of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) predicts resistance to trastuzumab therapy and poor disease-free survival of HER2-positive breast cancer patients. *Croat Med J* 2022; 63(2): 126-140. PMID: 35505646.

22. Solek J, Chrzanowski J, Cieslak A, Zielinska A, Piasecka D, Braun M, et al. Subtype-specific tumour immune microenvironment in risk of recurrence of ductal carcinoma in situ: prognostic value of HER2. *Biomedicines* 2022; 10(5): 1061. PMID: 35625798.
23. Mills MN, King W, Soyano A, Pina Y, Czerniecki BJ, Forsyth PA, et al. Evolving management of HER2+ breast cancer brain metastases and leptomeningeal disease. *J Neurooncol* 2022; 157(2): 249-269. PMID: 35244835.
24. Robert M, Frenel J-S, Bourbouloux E, Berton Rigaud D, Patsouris A, Augereau P, et al. Pertuzumab for the treatment of breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2020; 20(2): 85-95. PMID: 30884986.
25. Derakhshani A, Rezaei Z, Safarpour H, Sabri M, Mir A, Sanati MA, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. *J Cell Physiol* 2020; 235(4): 3142-3156. PMID: 31566722.
26. Schmid AS, Neri D. Advances in antibody engineering for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2019; 15(4): 197-207. PMID: 30814691.
27. Ahangarzadeh S, Payandeh Z, Arezumand R, Shahzamani K, Yarian F, Alibakhshi A. An update on antiviral antibody-based biopharmaceuticals. *Int Immunopharmacol* 2020; 86: 106760. PMID: 32645633.
28. Aires-da-Silva F, Dias J, Aguiar S, Marques F, André A, Gil S, et al. Novel Diagnostic and Therapeutic Immunologic Strategies to Overcome Infectious, Oncologic and Neurodegenerative Disorders. *Adv Anim Health Med Prod* 2020: 436-459.
29. Karim-Silva S, Becker-Finco A, Jiacomini IG, Boursin F, Leroy A, Noiray M, et al. Loxoscelism: Advances and challenges in the design of antibody fragments with therapeutic potential. *Toxins* 2020; 12(4): 256. PMID: 32316084.
30. Sandomenico A, Sivaccumar JP, Ruvo M. Evolution of Escherichia coli expression system in producing antibody recombinant fragments. *Int J Mol Sci* 2020; 21(17): 6324. PMID: 32878291.
31. Goulet DR, Chatterjee S, Lee W-P, Waight AB, Zhu Y, Mak AN-S. Engineering an enhanced EGFR engager: humanization of cetuximab for improved developability. *Antibodies* 2022; 11(1): 6. PMID: 35076451.
32. 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: 1-17. PMID: 34488747.
33. Lee K-S, Jeong Y-J, Lee M-S. Escherichia coli Shiga toxins and gut microbiota interactions. *Toxins* 2021; 13(6): 416. PMID: 34208170.
34. Danielewicz N, Rosato F, Dai W, Römer W, Turnbull WB, Mairhofer J. Microbial carbohydrate-binding toxins—From etiology to biotechnological application. *Biotechnol Adv* 2022; 59: 107951. PMID: 35398203.
35. Samavarchi Tehrani S, Gharibi S, Movahedpour A, Goodarzi G, Jamali Z, Khatami SH, et al. Design and evaluation of scFv-RTX-A as a novel immunotoxin for breast cancer treatment: an insilico approach. *J Immunoassay Immunochem* 2021; 42(1): 19-33. PMID: 32845824.
36. Subhan MA, Torchilin VP. Advances with antibody-drug conjugates in breast cancer treatment. *Eur J Pharm Biopharm* 2021; 169: 241-255. PMID: 34748933.

37. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021; 596(7873): 583-589. PMID: 34265844.
38. Pappas N, Roux S, Hölzer M, Lamkiewicz K, Mock F, Marz M, et al. *Virus bioinformatics. Encycl Virol* 2021; 124. PMCID: PMC7567488.
39. Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics* 1995; 11(6): 681-684. PMID: 8808585.
40. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Springer; 2005. PMID: 10027275.
41. Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP-a server for in silico prediction of allergens. *BMC Bioinformatics* 2013; 14(Suppl 6): S4. PMID: 23735058.
42. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(W1): W174-W181. PMID: 25883148.
43. 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.
44. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 2007; 35 (suppl_2): W407-W410. PMID: 23737448.
45. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993; 26(2): 283-291.
46. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci* 1993; 2(9): 1511-1519. PMID: 8401235.
47. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc* 2017; 12(2): 255-278. PMID: 28079879.
48. Cao W, Chen H-D, Yu Y-W, Li N, Chen W-Q. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chin Med J* 2021; 134(7): 783-791. PMID: 33734139.
49. Vanni G, Pellicciaro M, Materazzo M, Bruno V, Oldani C, Pistolese CA, et al. Lockdown of breast cancer screening for COVID-19: possible scenario. *In Vivo* 2020; 34(5): 3047-3053. PMID: 32871851.
50. Mishra A, Kumari N, Jha CK, Bichoo RA, Mishra SK, Krishnani N, et al. Distribution and prognostic significance of estrogen receptor α (ER α), estrogen receptor β (ER β), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) in thyroid carcinoma. *J Thyroid Res* 2020; 2020: 6935724. PMID: 32426104.
51. Torres-Jiménez J, Esteban-Villarrubia J, Ferreira-Monteagudo R. Precision medicine in metastatic colorectal cancer: targeting ERBB2 (HER-2) oncogene. *Cancers* 2022; 14(15): 3718. PMID: 35954382.
52. Jarman EJ, Ward C, Turnbull AK, Martinez-Perez C, Meehan J, Xintaropoulou C, et al. HER2 regulates HIF-2 α and drives an increased hypoxic response in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2019; 21: 1-18. PMID: 30670058.

53. Oh D-Y, Bang Y-J. HER2-targeted therapies—a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2020; 17(1): 33-48. PMID: 31548601.
54. Costa RL, Czerniecki BJ. Clinical development of immunotherapies for HER2+ breast cancer: a review of HER2-directed monoclonal antibodies and beyond. *NPJ Breast Cancer* 2020; 6(1): 10. PMID: 32195333.
55. Malyszko J, Tesarova P, Capasso G, Capasso A. The link between kidney disease and cancer: complications and treatment. *Lancet* 2020; 396(10246): 277-287. PMID: 32711803.
56. Mitani S, Kawakami H. Emerging targeted therapies for HER2 positive gastric cancer that can overcome trastuzumab resistance. *Cancers* 2020; 12(2): 400. PMID: 32050652.
57. Wang J, Xu B. Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2019; 4(1): 34. PMID: 31637013.
58. Knödler M, Buyel J. Plant-made immunotoxin building blocks: A roadmap for producing therapeutic antibody-toxin fusions. *Biotechnol Adv* 2021; 47: 107683. PMID: 33373687.
59. Wang Z, Chi L, Shen Y. Design, expression, purification and characterization of the recombinant immunotoxin 4D5 scFv-TRAIL. *Int J Pept Res Ther* 2020; 26: 889-897.
60. Marino M, Zhou L, Rincon MY, Callaerts-Vegh Z, Verhaert J, Wahis J, et al. AAV-mediated delivery of an anti-BACE1 VHH alleviates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Mol Med* 2022; 14(4): e09824. PMID: 35352880.
61. Sharma PC, Sharma D, Sharma A, Bhagat M, Ola M, Thakur VK, et al. Recent advances in microbial toxin-related strategies to combat cancer. *Semin Cancer Biol* 2022; 86(Pt 2): 1136-1154. PMID: 34271147.
62. Robert A, Wiels J. Shiga toxins as antitumor tools. *Toxins* 2021; 13(10): 690. PMID: 34678982.
63. Kazi A, Chuah C, Majeed ABA, Leow CH, Lim BH, Leow CY. Current progress of immunoinformatics approach harnessed for cellular-and antibody-dependent vaccine design. *Pathog Glob Health* 2018; 112(3): 123-131. PMID: 29528265.
64. 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 insilico study. *J Mol Model* 2022; 28(12): 392. PMID: 36400988.
65. Movahedpour A, Ahmadi K, Taheri-Anganeh M, Amiri A, Ahmadi N, Khatami SH, et al. Designing a humanized immunotoxin based on HER2 specific scFv and DFF40 toxin against breast cancer: an in-silico study. *Int J Pept Res Ther* 2022; 28(5): 130.