ORIGINAL ARTICLE

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 Ghesmati[1],
Khadijeh Ahmadi[2],
Navid Nezafat[3],
Farzaneh Vahedi[4],
Mortaza Taheri-Anganeh[5],
Seyyed Hossein Khatami[6],
Hasan Ghasemi[7],
Rahmatollah Soltani[8],
Vahid Zarezade[8],
Ahmad Movahedpour[9],
Ehsan Ghasemi[10]

[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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و پنجم شماره ۲۴۵ خرداد سال ۱۴۰۴ (۱۵-۲۹)

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[۸]
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 ایمونوتوکسین هایی استفاده شود که سلول‌های سرطانی Her2 مثبت را هدف قرار می‌دهد. توکسینوم شیگا، توکسینوم باکتریایی هستند که اغلب از باکتری‌های *شیگلا دیسنتری* و *اشریشیا 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 پپتیدی به هم متصل شدند. ساختار دوم و سوم، خواص فیزیکوشیمیایی، حلالیت و حساسیت زایی سازه پیش بینی 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 حساسیت زا 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..

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

مولف مسئول: احمد موحدپور- دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی **E-mail:** ahmad.movahed14@gmail.com
احسان قاسمی، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، گروه علوم پایه **E-mail:** Ehsan_ghasemi1980@gmail.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

مقدمه

سرطان پستان، در سراسر جهان به عنوان یکی از شایع‌ترین 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(۷ - ۵).

با توجه به این عوامل، محققان مفهوم جدیدی برای درمان سرطان به نام "ایمونوتوکسین " را بیان کردند(۸). در این روش آنتی‌بادی ها با پلی پپتیدهای "توکسینی " ترکیب می‌شوند که سنتز پروتئین را در سلول هدف مهار کنند(۹). آنتی‌بادی مولکول پروتئین هیبریدی را به توکسینت سلول تومور هدایت می‌کند، جایی که پلی‌پپتید توکسینی به غشای سلول نفوذ می کند 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). ایمونوتوکسین های نسل سوم، که به‌عنوان ایمونوتوکسین های نوترکیب نیز شناخته می‌شوند، در دهه ۱۹۹۰ با استفاده از فناوری DNA نوترکیب توسعه یافتند(۱۳). در جدیدترین نسل، از تکنیک‌های کلونینگ مولکولی برای ایجاد پروتئین‌های فیوژن حاوی قطعات آنتی‌بادی و قتوکسینت‌های توکسینی توکسین با فعالیت آنزیمی استفاده شده است(۱۴). ایمونوتوکسین‌های نوترکیب 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 موفقیت‌آمیز در درمان تجربی سرطان را نشان می‌دهد. دنیلوکین دیفتیتوکس (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 تهاجمی‌تر، افزایش خطر بازگشت بیماری و شانس کم زنده‌مانی همراه است(۲۲). در نتیجه، HER2 یک پیش آگهی برای درمان سرطان پستان است(۲۳).

یکی از جالب‌ترین 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 نوترکیب، درک از ساختار و عملکرد ایمونوگلوبولین افزایش یافته

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

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 می توان با پیوند دادن دامنه‌های VH و VL توسط یک لینکر پپتیدی تولید کرد(۲۹). scFvs نامی است که به این مولکول‌های نوترکیب 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 شیگا (Stx) پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزومی هستند که توسط شیگا دیسانتریا سروتیپ ۱ و سویه‌های خاصی از *اشریشیا 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(۳۶- ۳۴). علاوه بر این، رویکردهای بیوانفورماتیک امکان تجزیه و تحلیل سریع و دقیق داده‌های بیولوژیکی و طراحی پروتئین‌های جدید را فراهم می‌کند(۳۷، ۳۸).

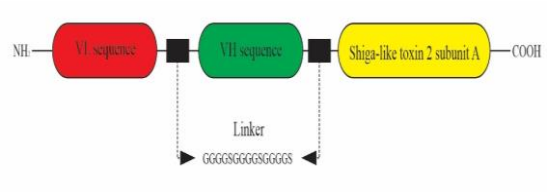
در این مطالعه، یک ایمونوتوکسین موثر را با ترکیب scFv اختصاصی HER2 با زیر واحد A، Shiga- like toxin 2 ایجاد کرده و با استفاده از انواع روش‌های محاسباتی، پایداری ساختار طراحی شد و توانایی پروتئین برای اتصال به گیرنده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

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 به‌ترتیب از بانک اطلاعات پروتئینی PDB و Uniprot به‌دست آمد (PDB ID: 4LLU، شناسه Stx2A: P09385).

برای طراحی سازه نوترکیب، آنتی‌بادی‌ها (VL-VH pertuzumab) را با استفاده از یک لینکر انعطاف‌پذیر (GGGGSGGGGSGGGGS) به هم متصل کرده و پس از تشکیل scFv، با اتصال Stx2A scFv و scFv توسط توالی GGGGSGGGGSGGGGS 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 فیزیکوشیمیایی و حساسیت‌زایی ایمونوتوکسین

از ProtParam به عنوان یک وب سرور آنلاین در دسترس برای ارزیابی چندین پارامتر فیزیکوشیمیایی توالی ایمونوتوکسین (شامل نقطه ایزوالکترونیک PI،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

وزن مولکـولی (MW)، شـاخص آلیفاتیـک، شـاخص ناپایداری و میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) استفاده شـد(۴۰). آلـرژی زایـی بـالقوه سـاختار کایمریـک توسـط AllerTOP v.2.0 مورد بررسی قرار گرفـت. مزیـت سـرور AllerTOP v.2.0 ایـن اسـت کـه از روش Auto Cross-Covariance بسیاری از آلرژن‌هـا و غیـر حساسـیت‌زاها از گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار می دهد(۳۰، ۴۱).

بررسی پایداری mRNA

وب سـرور RNAfold، بـر اسـاس حـداقل سـازی انرژی، جهت پیش بینی ساختار ثانویه mRNA پـروتئین کایمریک استفاده شد.

پیش‌بینـی، اصـلاح و ارزیـابی سـاختار سـه بعـدی سـازه طراحی شده

از وب سرور Iterative Threading (I-TASSER) ASSEmbly Refinement server به عنوان یک سـرور آنلاین رایگان استفاده گردید که به طور گسـترده بـرای پیش‌بینی ساختارهای سه بعـدی ایمونوتوکسـین طراحـی شده استفاده می شود(۴۲). این سرور سـاختار و عملکـرد پـروتئین را بـا یـک رویکـرد سلسـله مراتبـی پیش‌بینـی می کند. در ابتدا با توجه بـه امتیـاز، بهتـرین سـاختار سـه بعدی انتخاب می‌شود. سـپس از سـرور GalaxyRefine برای اصلاح ساختار انتخاب شده و بـرای بهبـود بیش‌تـر استفاده شد(۴۳). سه ابزار وب رایگان در دسـترس بـرای تجزیه و تحلیل اعتبار مدل‌های سه بعدی انتخابی، در دو مرحله قبل و بعد از پالایش استفاده شدند.

ابـزار ProSA-web، خطاهـا را در مـدل‌های سـه بعـدی سـاختارها از طریـق محاسـبه نمـره کیفیـت کلـی (امتیـاز Z) تشخیص می‌دهد(۴۴). اگر امتیاز Z تخمینی ساختار سـه بعـدی پیش‌بینی شده خارج از محدوده مشخصـه بـرای پروتئین‌هـای معیار باشد، احتمالاً خطاهای ساختاری را نشان می‌دهد.

ابـزار PROCHECK از نمـودار Ramachandran بـرای اعتبـار سـنجی اسـتفاده می کنـد. در نهایـت، باقی‌مانده‌ها به سه منطقه مناطق مورد علاقه، مجاز و غیـر مجاز طبقه‌بندی می‌شوند(۴۵).

ابـزار ERRAT، بـه عنـوان یـک روش آزمایشـی مبتنی بر اتم، ساختارهای سه بعدی پیش‌بینـی شـده را بـا محاسبه می کند و بر اساس مقادیر اشتباه برهمکنش‌های اتمی غیر پیونـدی در سـاختارهای پروتئینـی مدل‌سـازی شده اعتبار می‌بخشد(۴۶).

اتصال مولکولی ایمونوتوکسین طراحی شـده بـا گیرنـده Her-2

در ایـن مطالعـه بـرای بررسـی بـرهمکنش ایمونوتوکسین طراحی شده به عنوان لیگاند با Her-2 بـه 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 فیزیولـوژیکی آبی، گیرنده Her-2 و توکسین طراحـی شـده بـه مـدت ۱۰۰ نانو ثانیه شـبیه سـازی شـدند. همچنـین، کمـپلکس توکسـین-HER2 بـا بهتـرین طراحـی بـرای مطالعـات دینامیـک مولکـولی (MD) انتخـاب شـد. نرم‌افـزار GROMACS 2018 بـرای اجـرای شبیه‌سـازی MD استفاده شد. ساختارها با استفاده از OPLS (میدان نیروی پتانسیل بهینه برای شبیه‌سازی مایع) برای کشف پایداری و تغییرات مدل‌سازی شـدند. مولکول‌هـا در یـک جعبـه حلال $10\ ^{\circ}A$ پر از مولکول‌هـای آب نقطـه شـارژ سـاده (SPC) قرار داده شدند. با وارد کردن مقدار کـافی Na^+ و Cl^-، بار سیسـتم خنثـی شـد. روش کمینه‌سـازی انـرژی بـرای همـه شبیه‌سـازی‌های MD شـامل دو بخـش بـود. سیستم‌ها بـرای ۱۰۰ پیکوثانیـه (ps) بـا اسـتفاده از تعـداد ذرات ثابت، حجم و دما (NVT) و تعـداد ثابـت ذرات، فشار و دما (NPT) متعادل شـدند. سیسـتم بـا اسـتفاده از باروستات Parrinello-Rahman برای دستیابی به فشار و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

دمای ثابت ۱/۰ بار و K۳۰۰ متعادل شد. روش ذرات مش Ewald (PME) برای درمان الکترواستاتیک دور برد با فاصله شبکه ۰/۱۶ نانومتر و فاصله قطع A۱۰ استفاده شد. با قطع ۱ نانومتر، برهمکنش‌های واندروالس (VDW) محاسبه شد. در نهایت، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای هر سیستم شبیه‌سازی (به مدت ۱۰۰ نانوثانیه (ns) با دو مرحله زمانی فمتوثانیه (fs) استفاده شد. پایداری سیستم‌های شبیه‌سازی با استفاده از ریشه میانگین مربعات انحراف (RMSD) و شعاع چرخش (Rg) ارزیابی شد. علاوه بر این، در طول شبیه‌سازی، از نوسانات ریشه میانگین مربع (RMSF) برای تجزیه و تحلیل نوسان اسیدهای آمینه استفاده شد.

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

یافته‌ها

بررسی ساختار ثانویه ایمونوتوکسین

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

```
SOPMA :
Alpha helix     (Hh) :   125 is  22.56%
3₁₀ 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

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و حساسیت زایی ایمونوتوکسین

سرور ProtParam پارامترهای ویژگی فیزیکوشیمیایی سازه های نوترکیب 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 پیش‌بینی کرد که ساختار پروتئین کایمریک زیر واحد A توکسین +scFv غیر حساسیت‌زا است، به این معنی که ایمونوتوکسین طراحی شده پاسخ‌های التهابی و واکنش‌های آلرژیک را در بدن انسان ایجاد نمی‌کند.

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

ویژگی ها	نتایج
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 (آسپارتات و گلوتامات)	۴۳
تعداد نهایی اسید آمینه های دارای بار مثبت (آرژینین و لیزین)	۴۶
تعداد نهایی اتم ها	۸۳۲۳
شاخص ناپایداری	۳۸/۱۷
شاخص آلیفاتیک	۷۳/۳۶
میانگین هیدروپاتی	- ۰/۲۴۵
امکان آلرژن بودن	احتمالا آلرژن نیست

بررسی پایداری mRNA

برای پیش‌بینی پایداری احتمالی mRNA کایمریک، از نرم‌افزار آنلاین 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 می‌دهد.

اصلاح و ارزیابی ساختار سه بعدی سازه نوترکیب

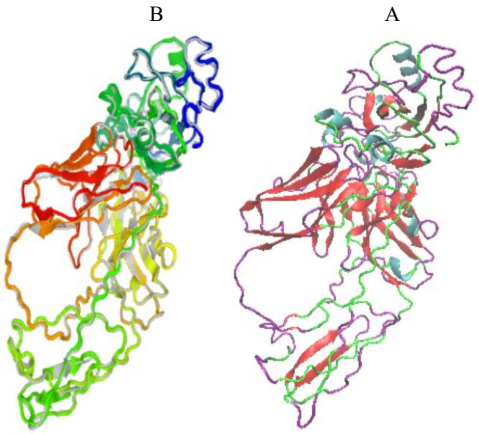
سرور I-TASSER پنج ساختار سه بعدی را برای توالی پروتئین کایمریک پیش‌بینی کرد که از میان آن‌ها بهترین ساختار با بالاترین امتیاز C (۱/۸۰-) انتخاب شد (تصویر شماره ۴، A).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]



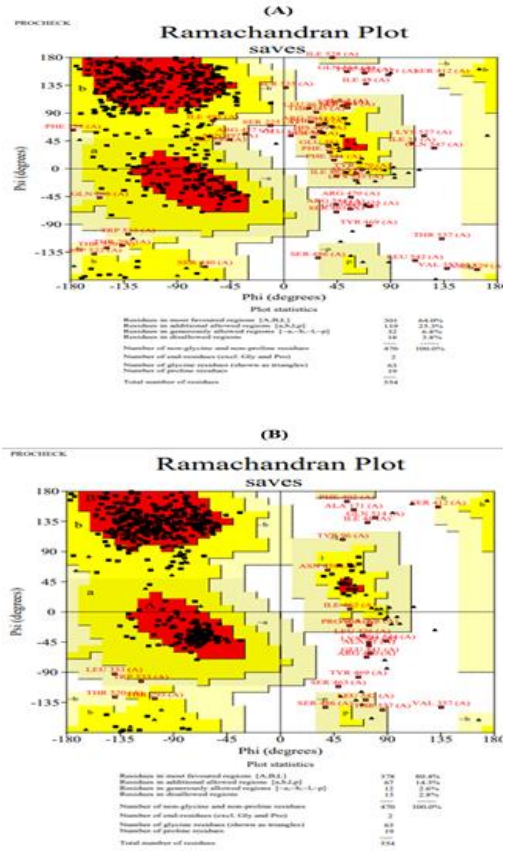
تصویر شماره ۳: بررسی پایداری mRNA براساس پیش بینی انرژی آزاد مجموعه ترمودینامیکی

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



تصویر شماره ٤: A: ساختار سه بعدی پیش بینی شده برای پروتئین فیوژن توسط سرور I-TASSER، B: ساختار اصلاح شده براساس خروجی سرور GalaxyRefine

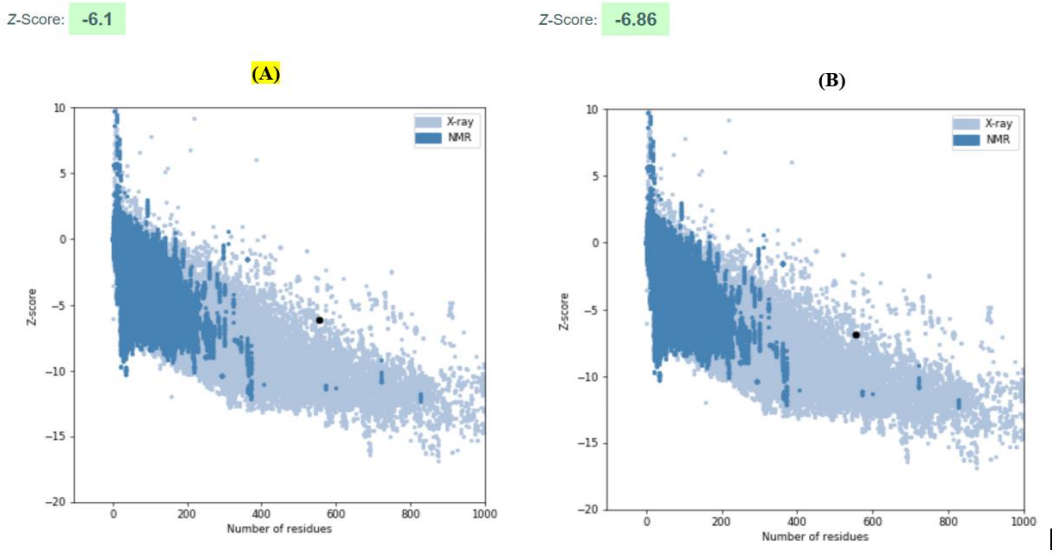
سه سرور شامل ProSA-web، PROCHECK و ERRAT برای اندازه‌گیری سطح کیفیت و خطاهای احتمالی در مدل انتخاب شده از مرحله قبل استفاده شدند. اعتبار ساختار اصلاح شده توسط PROCHECK تأیید کرد که ۸۰/۴ درصد از باقیمانده‌ها در منطقه مطلوب، ۱۴/۳ درصد در منطقه مجاز و تنها ۲/۸ درصد در منطقه غیر مجاز هستند. در حالی که در ساختار اولیه، تجزیه و تحلیل نمودار راماچاندران 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 به‌دست آمده برای سازه‌های اولیه و اصلاح شده در تصویر شماره ۵ آورده شده است.



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 بیش‌تر 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.

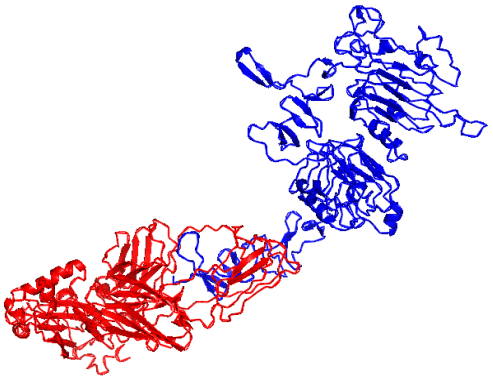
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]



تصویر شماره ٦: A: امتیازهای Z پیش بینی شده توسط وب سرور PROSA برای ساختار اولیه، B: ساختار اصلاح شده

اتصال مولکولی Her-2 با ایمونوتوکسین طراحی شده

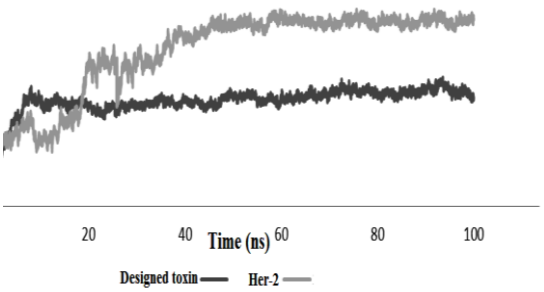
مدل‌های سه‌بعدی برای برهم‌کنش بین گیرنده Her-2 و زیر واحد A توکسین مورد مطالعه + scVF با استفاده از وب سرور Cluspro ایجاد شد. بهترین مدل پیش‌بینی شده برای ایمونوتوکسین طراحی شده و مجموعه گیرنده Her-2 انتخاب شده است. مدل شماره ۱۰ بهترین نتایج را از برهمکنش‌های اتصال بین لیگاند و گیرنده و کم ترین امتیاز 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)

مطالعه شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس Her2-toxin

پایداری گیرنده غیر متصل Her-2، توکسین طراحی شده و توکسین متصل به گیرنده Her2 با شبیه‌سازی 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. هم‌چنین، تجزیه و تحلیل مقادیر RMSD نشان داد که کمپلکس توکسین-Her2 پس از ۴۰ ns به ثبات رسیده است (تصویر شماره ۸).



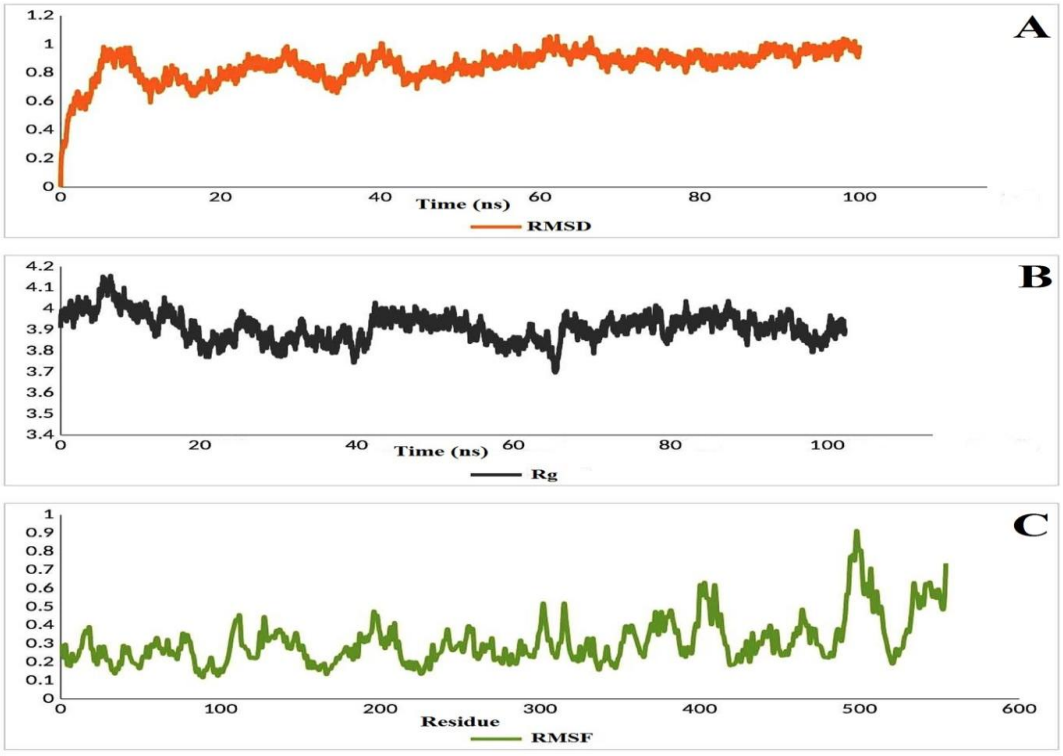
تصویر شماره ۸: مقادیر RMSD ایمونوتوکسین طراحی شده بدون پیوند با گیرنده Her-2 و ایمونوتوکسین طراحی شده متصل شده به گیرنده Her-2 در طول شبیه سازی 100 ns

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

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 باقیمانده ها 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 می دهند(۵۳). تراستوزوماب، اولین درمان علیه HER2 با تایید FDA، یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی نوترکیب 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 می کشند(۵۸).



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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

توکسین‌های پروتئینی با منشا باکتریایی و گیاهی با آنتی‌بادی‌های scFv برای هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی ترکیب شدند(۵۹، ۶۰). در رویکردهای درمانی جدید، سلول هدف توسط خواص اتصالی scFv انتخاب شده تعیین می‌شود. بنابراین توکسین هم به عنوان دارو برای درمان بیماری‌های انسانی و هم به عنوان پروب‌های عملکرد سلولی در نظر گرفته می‌شوند(۶۰). نشان داده شده است که زیر واحد A مربوط به Stx2، یکی از قوی‌ترین توکسین‌های شناخته شده، باعث ایجاد سمیت سلولی، آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی انسان می‌شود(۶۱). زیر واحد A مربوط به Stx2، در هر دو شکل طبیعی یا مهندسی شده، می‌تواند به عنوان یک عامل ضد سرطان استفاده شود(۶۲).

ایمونوانفورماتیک برای ایجاد آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها و تست‌های تشخیص ایمنی ضروری است. پیشرفت‌های جدید در بخش ایمونولوژیک بیوانفورماتیک منجر به ابزارهای ارزشمندی برای کاهش هزینه و مدت ساخت واکسن و آنتی‌بادی شده است(۶۳).

هدف مطالعه حاضر استفاده از سرورهای مختلف بیوانفورماتیک برای ایجاد یک ایمونوتوکسین موثر در برابر سرطان سینه بود. توالی‌های DELTA-stichotoxin-Hmg2a و scFv Pertuzumab در ابتدا از پایگاه داده پروتئین Uniprot به دست آمدند.

ساختار نوترکیب، که شامل DELTA-stichotoxin-Hmg2a و scFv Pertuzumab بود، با استفاده از یک پیونددهنده انعطاف‌پذیر (GGGGSGGGGGSGGGGS) ایجاد شد. ساختار ثانویه‌سازه طراحی شده با استفاده از سرور SOPMA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این سرور ویژگی‌های ساختاری و هم‌چنین چهار حالت ساختاری (مارپیچ، صفحه، پیچش و سیم پیچ) را پیش‌بینی کرد.

پارامترهای فیزیکوشیمیایی ساختار طراحی شده با استفاده از وب سرور protParam مورد ارزیابی قرار گرفت. با بررسی پارامترهایی مانند شاخص آلیفاتیک، شاخص ناپایداری، وزن مولکولی (MW) و نشان داده شد که ایمونوتوکسین طراحی شده یک پروتئین پایدار است. این ترکیب ایمونوتوکسین به دلیل حلالیت آن به سرعت در بدن رسوب نمی کند و تجزیه نمی‌شود.

با توجه به این که ثبات رونویسی mRNA برای بیان کارآمد پروتئین مورد نیاز است وب سرور آنلاین RNAfold برای پیش‌بینی ساختار ثانویه mRNA ایمونوتوکسین استفاده شد. بر اساس نتایج، mRNA ایمونوتوکسین طراحی شده به دلیل انرژی آزاد منفی، ساختاری پایدار دارد.

سرور I-TASSER پنج ساختار سه بعدی را برای پروتئین کایمریک پیشنهاد کرد که بهترین ساختار بالاترین امتیاز C (۱/۸۰-) را دریافت کرد. سپس ساختار سه بعدی مدل انتخابی با استفاده از سرور GalaxyRefine اصلاح شد. مدل ۴ به دلیل دارا بودن مساعدترین مساحت در قطعه راماچاندران به عنوان بهترین مدل تصفیه شده انتخاب شد.

برای ارزیابی سطح کیفیت و خطاهای احتمالی در مدل انتخاب شده قبلی، از سرورهای ProSA-web، PROCHECK و ERRAT استفاده شد. تجزیه و تحلیل نمودار نشان داد که اکثر طول‌ها و زوایای پیوند باقی مانده در این مدل در نواحی مورد نظر قرار دارند.

یک مدل سه بعدی از تعامل بین گیرنده Her-2 و زیر واحد A توکسین مورد مطالعه + scVF با استفاده از وب سرور Cluspro ایجاد شد. محتمل ترین مدل برای اتصال ایمونوتوکسین و گیرنده Her-2 ایجاد و انتخاب شده است. مدل ۱۰ موثرترین برهمکنش‌های اتصال لیگاند-گیرنده را تولید کرد و کم‌ترین امتیاز انرژی را داشت. توانایی ایمونوتوکسین برای اتصال به گیرنده Her2 در نهایت نشان داده شد. برای تجزیه و تحلیل پایداری ساختار توکسین طراحی شده در اشکال آزاد و پیچیده آن، مقادیر RMSD تا ۱۰۰ ns با شبیه‌سازی MD ارزیابی گردید. به طور کلی، هر سه ساختار (توکسین آزاد، گیرنده Her2، و کمپلکس توکسین-Her2) در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

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 می‌دهد که نشان می‌دهد 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 می‌تواند ساختاری طبیعی داشته باشد و آلرژن نباشد، بنابراین این ایمونوتوکسین می‌تواند به‌طور موثر گیرنده‌های HER2 را هدف قرار دهد که نتایج مطالعه حاضر با نتایج این مطالعه مطابقت داشت(۶۴). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۲ با استفاده از توکسین DFF40 و گیرنده Her2 ایمنوتوکسینی برای درمان 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 می‌تواند به‌طور مناسب به HER2 متصل شود. در نهایت، این سازه می‌تواند یک کاندید امیدوارکننده 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: 1503-1401U). از تمام کسانی که در این مطالعه یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

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 diftitox: 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

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 (ERα), estrogen receptor β (ERβ), 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, Ferreiro-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-2α and drives an increased hypoxic response in breast cancer. Breast Cancer Res 2019; 21: 1-18. PMID: 30670058.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-24]