ORIGINAL ARTICLE

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

Sadaf Azdoo[1],
Samira Mokhtari[2],
Navid Nezafat[3],
Farzaneh Vahedi[4],
Mortaza Taheri-Anganeh[5],
Khadijeh Ahmadi[6],
Mehdi Alizadeh[7],
Seyyed Hossein Khatami[7],
Mohamad Sabaghan[8],
Rahmatollah Soltani[8],
Vahid Zarezade[8],
Ahmad Movahedpour[9],
Hassan Ghasemi[10]

[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)

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

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و پنجم شماره ۲۵۲ دی سال ۱۴۰۴ (۳۲-۴۴)

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[۷]
محمد صباغان[۸]
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 نئوادجوانت 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 روش ها: 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 vitro و in vivo برای تأیید اثربخشی ایمونوتوکسین طراحی شده ضروری است.

واژه های کلیدی: ایمونوتوکسین، بیوانفورماتیک، ایمونوتراپی، سرطان پستان، HER2 مثبت

مولف مسئول: احمد موحدپور- دانشگاه علوم پزشکی یاسوج-مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
E-mail: ahmad.movahed14@gmail.com
حسن قاسمی- دانشگاه علوم پزشکی آبادان- گروه علوم پایه
E-mail: clinicalbiochem.1365@gmail.com

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 بیماری های 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 دریافت: ۱۴۰۴/۲/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۲/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۹/۲۳

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

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان از نظر شیوع و دومین علت اصلی مرگ و میر در زنان بر اثر سرطان می‌باشد. از همین رو، تشخیص و درمان به موقع این بیماری می‌تواند میزان بهبودی را تا حد زیادی افزایش دهد(۱، ۲). همانند بسیاری از بدخیمی‌ها، سرطان پستان نیز از تومورهای ناهمگن با ظاهر بافت شناسی متفاوت تشکیل شده است(۳). زیرگروه‌های مولکولی متنوع در این سرطان شامل Luminal-A، Luminal-B ، Basal-like و human epidermal growth factor 2 (HER2) می‌باشند(۴). HER2، گیرنده تیروزین کیناز erbB-2، پروتئینی از خانواده EGFR /ErbB است. افزایش میزان بیان HER2 در ۱۵ تا ۲۰ درصد از سرطان‌های پستان مشاهده می‌شود(۷ - ۵). در این خانواده از پروتئین‌های گیرنده، دومین‌های I و III (Domains) نقش اصلی را در اتصال با لیگاند(ligand) ایفا می‌کنند. دومین‌های II و IV نیز دامنه خارج سلولی گلیکوزیله(Glycosylated) پروتئین کینازهای ErbB را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، دومین II تشکیل همودیمرها و هترودیمرها(Homodimers- heterodimers) را با سایر اعضای خانواده ErbB تسهیل می‌کند(۸). هنگامی که این گیرنده با سایر EGFR ها هترودایمر می‌شود، باقیمانده‌های(Residues) تیروزین در قسمت سیتوپلاسمی به صورت خودکار فسفریله و منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنال دهی متعددی هم‌چون PI3K، STAT3، MAPK و Ras/Raf شده که نهایتا منجر به تومورزایی می‌شود(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). آنتی‌بادی منوکلونال(Monoclonal) Trastuzumab به دومین IV پروتئین HER2 متصل می‌شود و به طور اختصاصی پروتئین HER2 را مورد هدف قرار می‌دهد. 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 سال‌های متمادی، Trastuzumab برای مهار فعالیت گیرنده HER2 مورد استفاده قرار می‌گرفت تا این که به دلیل مقاومت دارویی، چالشی بزرگ در کنترل فعالیت HER ایجاد شد. بنابراین، متعاقباً بسیاری از داروها بر اساس هدف‌گیری HER2 ساخته شدند و ترکیب این آنتی بادی با سایر داروهای شیمی درمانی سنگ‌بنای درمان سرطان پستان شده است به‌طوری که در حال حاضر، درمان استاندارد برای موارد متاستاتیک بیماران سرطان پستان HER2/neu مثبت، ترکیبی از آنتی بادی Pertuzumab و Trastuzumab می‌باشد(۷، ۱۲). Trastuzumab به قسمت غشایی گیرنده HER2 متصل می‌شود و از تشکیل همودیمر HER2 جلوگیری می‌کند. از سوی دیگر، آنتی بادی منوکلونال انسانی شده Pertuzumab، به دامنه خارج سلولی گیرنده HER2 متصل می‌شود و مانع از همو- هترودیمریزاسیون HER2/HER3 می‌شود. در نتیجه چنین عملکردی، مسیرهای مختلف سیگنال‌دهی درون سلولی و رشد سلول متوقف می‌شود به‌طوری 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 کوچک‌ترین جزء یک مولکول آنتی بادی است که دارای توانایی اتصال به آنتی ژن می‌باشد. بخش‌های متغیر زنجیره سبک (VL) (Variable regions of light) و سنگین (VH) (Variable regions of heavy) یک آنتی بادی توسط یک پیوند دهنده پپتیدی انعطاف پذیر در scFv به هم متصل می‌شوند. scFv حاوی VH و VL یک هترودایمر

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

غیر کووالانسی است که می‌تواند برای تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب(Recombinant) استفاده شود(۱۶). خواص فارماکوکینتیک(Pharmacokinetic) مناسب scFv آن را به گزینه‌ای مناسب برای توسعه ایمونوتوکسین‌های پیشرفته تبدیل می‌کند(۱۷). درمان با ایمونوتوکسین نوترکیب یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های درمان سرطان است که با هدف قرار دادن مولکول‌های سطحی سلول سرطانی، داروهای توکسیک را به طور اختصاصی به سلول‌های تومور می‌رساند. حداقل بودن عوارض جانبی این ایمونوتوکسین‌ها بر روی سلول‌های طبیعی، آن ها را به طور قابل توجهی ارزشمندتر می‌کند(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 می‌شوند، جداسازی شده‌اند(۲۱). پپتید BmK AGAP عضوی از زیرخانواده پپتیدهای عقرب بلند زنجیره بوده که دارای ۶۶ اسید آمینه و جرم مولکولی ۷۱/۴۲ کیلو دالتون می‌باشد(۲۲). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که پپتید BmK AGAP سبب جلوگیری از تهاجم سلولی، مهاجرت سلولی و انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (EMT) در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 سرطان پستان می‌شود. BmK AGAP، از طریق مسیرهای سیگنالینگ NF-kB, Wnt/β-catenin و PTX3 نیز در فعالیت کاهش التهاب درون سلولی شرکت می‌کند(۲۰). به همین واسطه، در مطالعه پیش‌رو از چندین ابزار و وب سرور بیوانفورماتیکی و ایمونوانفورماتیکی برای طراحی و ارزیابی یک ایمونوتوکسین جدید و موثر با ادغام scFv اختصاصی HER2 و پپتید توکسینی BmK AGAP استفاده شده است.

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 Uniprot (https://www.uniprot.org/) با (BmK AGAP UniProt ID: G4V3T9) بدست آمد. لینکر انعطاف پذیر (GGGGSGGGGSGGGGS) برای اتصال قطعات VH و VL آنتی بادی Pertuzumab مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این، توکسین BmK AGAP و scFv نیز با استفاده از توالی اسید آمینه GGGGSGGGGSGGGGS به عنوان یک لینکر پپتیدی انعطاف پذیر به هم متصل شدند (تصویر شماره ۱).

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIY
SASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG
QGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSV
DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
AGGGGSGGGGSGGGGSVKDGYIVDDKNCAYFCGRNAYCDDECEKNG
AESGYCQWAGVYGNACWCYKLPDKVPIRVPGRCNG



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

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

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

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ایمونوتوکسین

با استفاده از پایگاه داده (http://us.expasy.org/tools/protparam.html) ProtParam، خواص فیزیکی و شیمیایی مختلف سازه نوترکیب، از جمله وزن مولکولی (Mw) (Molecular weight)، نقطه ایزوالکتریک نظری (p) (Theoretical isoelectric point)، شاخص آلیفاتیک(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 کامپیوتری 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 (غیرآلرژن) یا (آلرژن احتمالی) نشان می‌دهد(۲۴).

پیش بینی، اصلاح و اعتبار سنجی مدل ساختار سه بعدی

مدل سازی سه بعدی سازه نوترکیب scFv-BmK AGAP توسط وب سرور Galaxy TBM (http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/) انجام شد. در ادامه از سرور GalaxyRefine نیز برای اصلاح ساختار و بهبود کیفیت سازه نوترکیب 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. به‌طوری 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 با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD

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

D) (Molecular dynamics) با استفاده از نرم افزار GROMACS 2018 انجام شد(۳۰). ساختارها با استفاده از میدان نیروی پتانسیل بهینه برای شبیه‌سازی مایع (OPLS) (Simple point charge) جهت کشف پایداری و تغییرات، مدل‌سازی شدند. روش ذرات مش (Particle mesh Ewald) Ewald (PME) برای درمان الکترواستاتیک استفاده شد. در نهایت، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای هر سیستم شبیه‌سازی به مدت ۱۰۰ نانوثانیه (ns) (Nanosecond) با دو مرحله زمانی فمتوثانیه (fs) (Femtoseconds) استفاده شد. پایداری سیستم‌های شبیه‌سازی 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 شبیه‌سازی، از نوسانات ریشه میانگین مربع (RMSF) (Root mean square fluctuation) برای تجزیه و تحلیل نوسان اسیدهای آمینه استفاده شد. هم‌چنین 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 پژوهش‌های 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 پیش‌بینی ساختار ثانویه ایمونوتوکسین استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که ادغام توکسین BmK AGAP با scFv، سبب تغییر در ساختار ثانویه این توالی‌ها نشده است. پیش بینی درصد حالت‌های ساختاری در سازه نهایی طراحی شده با دقت ۷۳/۵، به صورت ۳/۴۲ درصد نواحی آلفا-مارپیچ، ۳۸/۸۲ درصد رشته‌های توسعه یافته و ۵۷/۷۶ درصد پیچش تصادفی را در محتوای ساختار ثانویه نشان داد.

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و حساسیت زایی ایمونوتوکسین

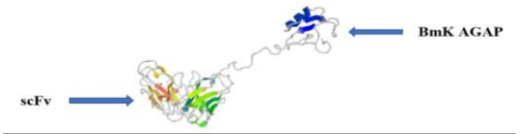
پایگاه داده ProtParam برای محاسبه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی scFv-BmK AGAP استفاده شد. مشخص شد که این پروتئین دارای ۳۲۲ اسید آمینه با میانگین وزن مولکولی ۳۴ کیلودالتون و pI = ۷/۵۲ است. علاوه بر این، ۲۶ اسید آمینه با بار منفی (Asp + Glu) و ۲۷ اسید آمینه با بار مثبت (Arg + Lys) در ساختار پروتئین نوترکیب وجود دارند. میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) و شاخص آلیفاتیک پروتئین کایمریک به ترتیب ۰/۳۶۶- و ۵۷/۵۲ بوده است. برای بررسی حساسیت ایمونوتوکسین طراحی شده، از سرور AlgPred استفاده شد. این سرور پیش‌بینی کرد که ساختار پروتئین کایمریک طراحی شده scFv+BmK AGAP غیر حساسیت‌زا است، به این معنی که ایمونوتوکسین طراحی شده پاسخ‌های التهابی و واکنش‌های آلرژیک را در بدن انسان ایجاد نمی‌کند.

مدل سازی، اصلاح و اعتبار سنجی ساختار سه بعدی ایمونوتوکسین

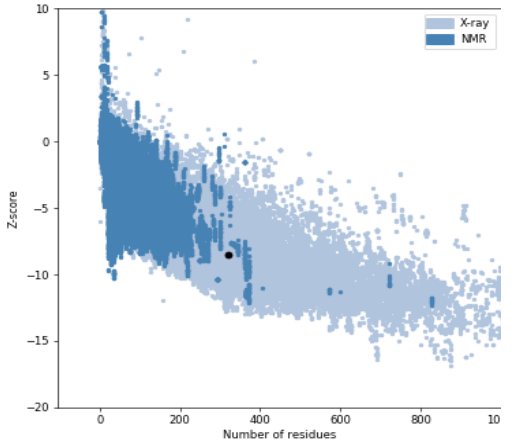
برای ساخت مدل‌های سه بعدی پروتئین کایمریک، از سرور GalaxyTBM استفاده شد. مدل با بیش‌ترین امتیاز اطمینان (c-score)، به عنوان مدل نهایی انتخاب شد (تصویر شماره ۲). اندازه‌گیری کیفیت و هر گونه خطای احتمالی در مدل سه بعدی با وب سرور ProSA-web انجام شد. امتیاز z (z-score) مدل نهایی در محدوده قابل قبول برای 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

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

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



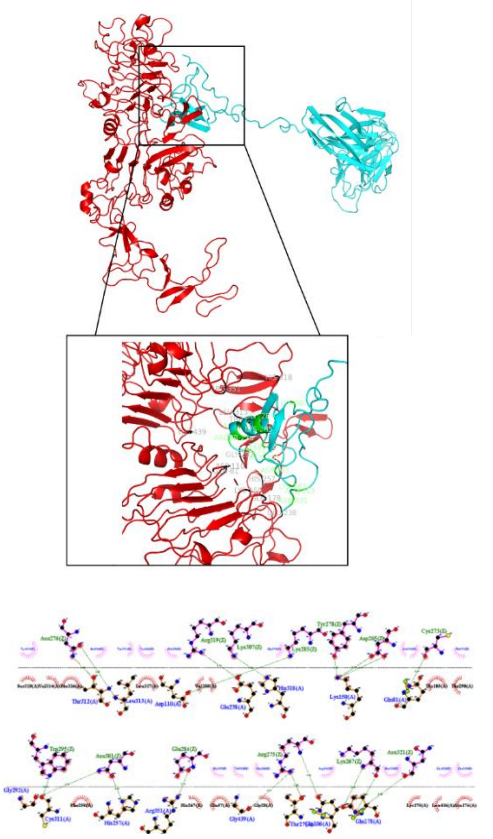
تصویر شماره ۲: ساختار سه بعدی پیش بینی شده برای ایمونوتوکسین، قسمت بالایی (آبی) توکسین BmK AGAP است، قسمت پایینی زنجیره‌های سنگین و سبک از mAb است که از طریق لینکر انعطاف پذیر به هم متصل شده‌اند.



تصویر شماره ۳: نمودار z-Score برای ساختار سه بعدی سازه، Z-Score مدل نهایی ۸٫۵۲- است که با نقطه سیاه نشان داده شده است.

اتصال مولکولی Her-2 با ایمونوتوکسین طراحی شده

از سرور ClusPro 2 جهت ارزیابی هم ترازی بهینه برای گیرنده HER2 و ایمونوتوکسین scFv-BmK AGAP استفاده شد. بهترین جهت‌گیری 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). هم‌چنین با استفاده از سرور LIGPLOT، برهمکنش‌های بین مولکولی بین گیرنده HER2 و ایمونوتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر شماره ۴، ب).



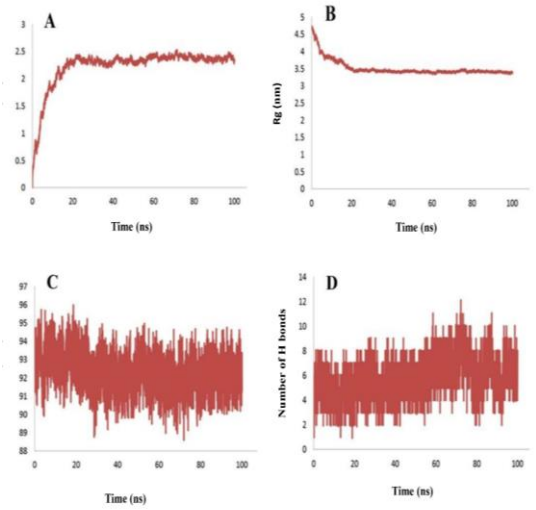
تصویر شماره ٤: اتصال مولکولی کمپلکس پروتئینی ایمونوتوکسین scFv-BmK AGAP الف: HER2 به عنوان گیرنده (قرمز) و ایمونوتوکسین به عنوان لیگاند (آبی)، ب: نمایش LIGPLOT از تعامل آبگریزی و پیوند هیدروژنی بین پروتئین HER2 و ایمونوتوکسین، پیوندهای هیدروژنی با خطوط آبی بین باقی مانده گیرنده HER2 (آبی) و ایمونوتوکسین (سبز) نشان داده می‌شوند، همچنین برهمکنش‌های آبگریز با خطوط منقطع قرمز بین باقی‌مانده‌های HER2 (سیاه) و توکسین (آبی) نشان داده می‌شوند.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

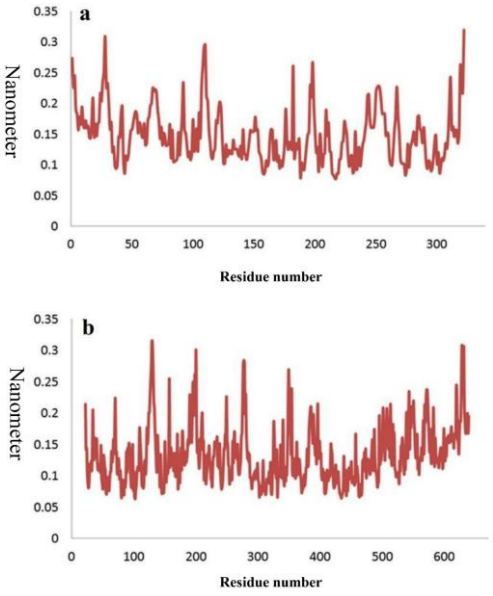
پایداری کمپلکس HER2–ایمونوتوکسین با استفاده از مدل‌سازی دینامیک مولکولی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که میزان RMSD کمپلکس به‌طور مداوم در کل دوره شبیه سازی ۱۰۰ نانو ثانیه ثابت بود. در شروع زمان شبیه‌سازی بی ثباتی مشاهده شد ولی کمپلکس ۲۵ نانو ثانیه پس از شبیه سازی به حالت پایدار رسید و نوسانات RMSD کمپلکس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

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

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 باقیمانده ها در کمپلکس اندازه گیری شد. مساحت سطح در دسترس حلال (SASA) برای اندازه‌گیری 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 می کند (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 می شود بیش‌تر است (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۵: تجزیه و تحلیل شبیه سازی MD کمپلکس - HER2ایمونوتوکسین در دوره ۱۰۰ نانوثانیه، A: مقادیر نوسان RMSD، B: نمودار Rg، C: مقدار SASA، D: تعداد پیوندهای هیدروژنی



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

بحث

در این مطالعه، سعی شده تا یک پپتید کایمریک 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 BmK AGAP از Buthus martensii Karsch گرفته شده است که به زیر خانواده پپتیدهای عقرب با زنجیره بلند تعلق دارد. طراحی این ایمونوتوکسین شبیه سازه‌های کایمریک 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 کایمریک متشکل از یک قطعه scFv آنتی‌بادی تراستوزوماب با سم عقرب (نوروتوکسین Bmk) طراحی کردند(۳۵). بنابراین، ساختار پروتئین کایمریک در

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

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 پرتوزوماب 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، تاخوردگی صحیح، افزایش فعالیت بیولوژیکی و به‌دست آوردن پروفایل‌های فارماکوکینتیک مناسب پروتئین‌های همجوشی دارد(۳۶). علاوه بر این، هر گونه انعطاف‌پذیری در کمپلکس های چند پروتئینی به‌طور 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 آبگریز G4S برای پیوستن به دامنه‌های متعدد انتخاب شد. با نگاهی به ساختار ثانویه پروتئین کایمریک، مشاهده شد که افزودن توکسین به قطعه scFv آنتی‌بادی، 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 scFv-BmK AGAP استفاده شد. مشخص شد که این پروتئین فیوژن طراحی شده آبدوست بوده که نشان می دهد به راحتی می‌تواند با مولکول های آب برهمکنش داشته باشد. علاوه بر این، شاخص آلیفاتیک 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 scFv+BmK AGAP با استفاده از سرور آنلاین AlgPred ارزیابی گردید و نتایج نشان داد که این پروتئین واکنش آلرژیک در بدن انسان ایجاد نمی کند.

برای ساخت مدل های سه بعدی پروتئین کایمریک، از سرور GalaxyTBM استفاده شد. از مدل های 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 راماچاندران 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 راماچاندران انجام شد.

ابزارها و سرورهای محاسباتی به طور قابل توجهی برای شناسایی اتصال مولکولی استفاده می شوند. 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. یافته ها 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، برهمکنش های 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 مدل‌سازی دینامیک مولکولی ارزیابی شد.

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

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

غیرمتصل 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 ایمنوتوکسینی 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 می تواند 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 بیش‌تر SASA نشان دهنده میل ترکیبی لیگاند کم‌تری برای برهمکنش و منطقه قابل دسترسی بیش‌تر 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 اتم های 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 کایمریک پایدار دارای خواص فیزیکوشیمیایی قبولی 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:1341-1400U). از تمام کسانی که در این مطالعه یاری رساندند تشکر و قدردانی می گردد.

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

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

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, Titaux-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

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

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, Kastritis 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:

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

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, Vodeneev 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).

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