Iranian Journal of Cancer Care (IJCA) Original Article

Vol. 2 No. 3 Autumn 2023

Design and Analysis of a New Immunogenic Structure Based on Natural Toxins in the Treatment of Cancer Using Bioinformatics Tools

Pirmoradi S[1*]

Corresponding Author: PhD in Biochemistry, Department of Biochemistry, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Email: pirmoradi150@gmail.com

Received: 28 Dec 2021 Accepted: 29 June 2022

Abstract

Introduction: Cancers are one of the most common diseases known worldwide that have many tissue and structural heterogeneities that make the treatment process difficult. Breast cancer is one of the most well-known, and many patients with it are HER2 positive. Conventional cancer treatments today are not effective enough in preventing death. Immunotoxins are hybrid molecules that contain a part of the immune system, one antibody or a binding part of the antibody, and the other part is a toxic part. In this study, we seek to design a new immunotoxin, including the anti-HER2 receptor, trastuzumab, derived from a single-strand variable fragment (scFv) that binds to a functional part of a spider family venom called a neurotoxin.

Methods: We examined the physicochemical properties, secondary structure and solubility of chimeric proteins using ProtParam, respectively. A 3D model of the hybrid protein was created using I-TASSER servers. Then its structure and solubility were evaluated using PROCHECK and protein-sol. AllergenFP v.1.0 server was used to predict immunotoxin sensitivity and mRNA stability was assessed by RNAfold. Finally, docking between immunotoxin and HER2 was performed using the ClusPro server.

Results: The results of the analysis showed that the hybrid protein can be a protein with a stable secondary structure in solution and has a strong three-dimensional structure and also has a relatively stable structure mRNA and can bind to the HER2 receptor.

Conclusions: The results of the designed immunotoxin indicated a stable and soluble protein with the ability to bind optimally to HER2 receptors, which makes it a suitable immunotoxin candidate for use in the treatment of breast cancer, the assurance of which requires studies. And its study is in clinical phases.

keywords : Cancer, Immunotoxin, Bioinformatics, Monoclonal antibodies.

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]

نشریه مراقبت سرطان | مقاله پژوهشی

دوره ۲، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲

طراحی و آنالیز یک سازه ایمنی‌زا جدید بر پایه سموم طبیعی در درمان سرطان با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی

سعید پیرمرادی[1]*

نویسنده مسئول: دکتری بیوشیمی، گروه آموزشی بیوشیمی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
ایمیل: pirmoradi150@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۸

چکیده

مقدمه: سرطان‌ها از رایج‌ترین بیماری‌های شناخته‌شده در سراسر جهان می‌باشد که دارای ناهمگنی‌های بافتی و ساختاری زیادی هستند که این باعث می‌شود فرایند درمان در آن‌ها با مشکل همراه باشد. سرطان سینه از معروف‌ترین آن ها است که بسیاری از بیماران مبتلا به آن HER2 مثبت هستند. امروزه درمان‌های رایج سرطان به اندازه کافی در مهار مرگ‌ومیر افراد مؤثر نیستند. ایمونوتوکسین ها مولکول‌های هیبرید هستند که حاوی یک قسمت ایمنی، که یک آنتی‌بادی یا یک قسمت اتصالی از آنتی‌بادی و قسمت دیگر آن یک بخش سمی است. در این مطالعه، ما به دنبال طراحی یک ایمونوتوکسین جدید، از جمله ضد گیرنده HER2، تراستوزوماب، مشتق شده از یک قطعه متغیر تک زنجیره‌ای (scFv) با اتصال به بخشی عملکردی از زهر خانواده عنکبوتیان بنام نوروتوکسین هستیم.

روش کار: ما به ترتیب با استفاده از ProtParam خصوصیات فیزیکی شیمیایی، ساختار ثانویه و حلالیت پروتئین کایمریک مورد بررسی قرار گرفت. یک مدل سه‌بعدی (3D) با استفاده از سرورهای I-TASSER از پروتئین هیبرید ایجاد شد. سپس بررسی ساختار و حلالیت آن با استفاده از PROCHECK و protein-sol ارزیابی شد. از سرور AllergenFP v.1.0 برای پیش‌بینی حساسیت به ایمونوتوکسین استفاده شد و پایداری mRNA توسط RNAfold نیز ارزیابی شد. سرانجام داکینگ بین ایمونوتوکسین و HER2 با استفاده از سرور ClusPro صورت گرفت.

یافته ها: نتایج بدست آمده از تحلیل‌ها نشان داد که پروتئین هیبرید می‌تواند یک پروتئین با ساختار ثانویه پایدار در محلول باشد و دارای ساختار سه‌بعدی قوی است و همچنین دارای mRNA با ساختار نسبتاً پایدار بود و می‌تواند به گیرنده HER2 متصل شود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از ایمونوتوکسین طراحی شده بیانگر یک پروتئین پایدار و محلول با توانایی اتصال مطلوب به گیرنده‌های HER2 بود که این ویژگی‌ها آن را به عنوان یک کاندیدای ایمونوتوکسینی مناسب برای استفاده در درمان سرطان پستان تبدیل کرده است که اطمینان از آن‌ها نیازمند مطالعات و بررسی آن در فازهای بالینی می‌باشد.

کلیدواژه ها: سرطان ، ایمونوتوکسین، بیوانفورماتیک، انتی بادی مونوکلونال.

مقدمه

یکی از رایج‌ترین سرطان‌های شناخته در سراسر جهان سرطان پستان است، که بخاطر نامتوازن بودن ساختار بافتی و سلولی آن، فرایند درمان آن با مشکلات زیادی همراه است (۱). روش‌های امروزی درمان سرطان مانند جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی در کاهش میزان مرگ‌ومیر به اندازه کافی مؤثر نیستند (۲) شواهد نشان می‌دهد که ۳۵-۲۵٪ موارد سرطان پستان HER2 انسانی مثبت است. پروتئین HER2 از پروتئین‌های درگیر در مسیرهای انتقال سیگنال است و عضوی از خانواده گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمال انسانی با حوزه‌های داخل سلولی و فعالیت تیروزین کینازی است. این گیرنده‌ها با مورفوژنز، تنظیم طبیعی رشد سلول و تمایز سلول‌ها در ارتباط هستند (۳). نقش HER2 در فرآیند سرطان و ویژگی‌های آن مانند عود بدخیمی، متاستاز و مقاومت دارویی، این پروتئین را به

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]

هدفی بسیار جذاب برای مطالعه به منظور درمان سرطان تبدیل کرده است (۴). امروزه استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال (Herceptin)، (HER2 (mAb به طور قابل توجهی پیامدهای سرطان‌های HER2 مثبت را بهبود بخشیده است. اما مقاومت دارویی در بیماران، توان این‌گونه عوامل را محدود کرده است (۸،۷). از این رو، نیاز به متدهای جدید برای هدف قرار دادن ترکیب HER2 وجود دارد (۹). ترکیبات ایمونولوژیک بر مبنای توکسین ها (IT) از گونه درمان‌های هدفمند هستند که از دو پروتئین mAb و بخش سم که به هم متصلند، تشکیل‌شده‌اند که بخش‌های هدف در این ترکیب هیبریدی، مولکول هیبرید را به مکان‌هایی خاص در سلول‌های هدف جابجا می‌کند. بخش سم از منابع مختلف، از جمله مشتقات گیاهان یا باکتری‌ها و زهر موجودات مختلف تهیه می‌کنند (۱۰،۱۱). امروزه محققین مختلفی با مطالعه روی سم بعضی از عقرب‌ها مثل عقرب Buthus martensii Karsch متوجه شدند که بخش‌هایی از این سموم دارای استفاده های پزشکی متعددی در زمینه سرطان است (۵،۶). بدین خاطر ترکیبات سمی موجود در زهر عقرب‌ها پتانسیل شرکت در تولید ایمونوتوکسین را دارند. اتصال، سم به mAb و به دنبال دیمریزاسیون HER2 و فسفوریلاسیون باقیمانده تیروزین منجر به شروع آبشارهای مختلف سیگنالینگ داخل سلولی مانند PI3K/AKT و ERK/ MAPK مسیرهایی می‌شود که مرگ سلولی را در برخی سلول‌ها شروع می‌کنند (۱۲) در بیوانفورماتیک با استفاده از روش‌های مختلف برای حل مسئله بیولوژیکی به‌ویژه در سطوح مولکولی استفاده می‌شود (۱۳). در مطالعه حاضر، از استراتژی‌های اینسیلیکو مبتنی بر بیوانفورماتیک برای طراحی سازه‌های کایمریک متشکل از scFv و بخشی از سموم موثر بر عصب زهر به دست آمده از عقرب بوتئوس که از طریق یک اتصال‌دهنده انعطاف‌پذیر به scFv خاص HER2 متصل می‌شود جهت هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی پستان HER2 مثبت استفاده شد. پس از اینکه یک مدل سه‌بعدی (3D) برای این پروتئین کایمریک ساخته شد، سپس ساختار، پایداری، حلالیت و اتصال آن به HER2 پیش‌بینی خواهد شد و سپس با استفاده از روش‌های اینسیلیکو ارزیابی می‌شود.

روش کار

تحلیل توالی و طراحی سازه کایمریک

توالی اسیدهای آمینه نوروتوکسین و trastuzumab scFv به ترتیب از پایگاه داده ncbi با شماره دسترسی :UniProt (G4V3T9.1)) و بانک اطلاعات پروتئین (PDB ID: ۱n۸z) به دست آمد. ابتدا، VL و VH هرسپتین توسط لینکرها به هم متصل شدند و scFv را تشکیل دادند. پس از آن، توالی GGSGG به عنوان پیونددهنده مطلوب بین نوروتوکسین و scFv انتخاب شد. در این سازه، همچنین یک مکان شناسایی پروتئین فورین با توالی اسیدآمینه RGRR بین پیونددهنده GGSGG و بخش نوروتوکسین طراحی شد (شکل ۱).

پیش‌بینی ساختار ثانویه

پس از تشکیل scFv، با استفاده از سرور GORV، ساختار ثانویه scFv بعد از اتصال به نوروتوکسین از طریق یک اتصال کوتاه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در پایان، درصد ساختارهای ثانویه در ساختار نهایی محاسبه شد.

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پیش‌بینی حلالیت

خصوصیات فیزیکی شیمیایی ایمونوتوکسین با استفاده از سرور ProtParam مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از نرم‌افزار آنلاین ProteinSol برای پیش‌بینی حلالیت در ایمونوتوکسین استفاده شد که با استفاده از داده‌های تجربی برای ارزیابی صحت پیش‌بینی و حلالیت عمل می‌کند.

پیش‌بینی، پالایش و اعتبارسنجی ساختار سوم

برای بررسی مدل‌های سه‌بعدی برای ساختار هیبرید از I-TASSER و Swiss model استفاده شد. این سیستم عامل ترکیبی برای تجزیه و تحلیل ساختار پروتئین و پیش‌بینی عملکرد استفاده شد. سپس برای اعتبارسنجی مدل‌های سه‌بعدی از سرورهای PROCHECK استفاده شد. سرور PROCHECK که خصوصیات استریوشیمیایی ساختار پروتئین را ارزیابی می‌کنند و با بررسی تعداد باقی‌مانده‌ها را در مناطق مطلوب و مطلوب، کیفیت مدل سه‌بعدی بررسی شد.

پیش‌بینی آلرژی زایی

از ابزار AllergenFP v.1.0 برای پیش‌بینی آلرژی‌زایی بالقوه ساختار هیبرید استفاده شد.

پیش‌بینی پایداری mRNA

از RNA سرور Foldweb برای پیش‌بینی ساختار RNA پروتئین هیبرید با توجه به کمترین میزان انرژی استفاده شد.

داکینگ ایمونوتوکسین و HER2

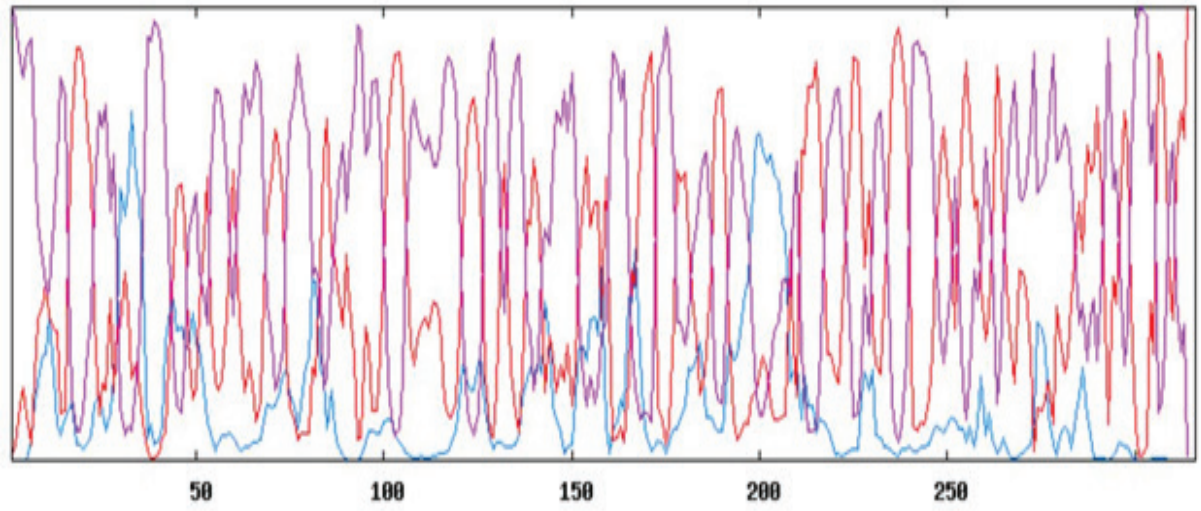
[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]

فرایند داکینگ بین پروتئین هیبرید و رسپتور HER2 با استفاده از سرور ClusPro انجام شد. این سرور می‌تواند اتصال پروتئین-لیگاند را تخمین بزند.

یافته ها

نتایج پیش‌بینی ساختار ثانویه

از بررسی نتایج حاصل از سرور GORV مشخص شد که تشکیل scFv ساختار ثانویه آن‌ها را تغییر نمی‌دهد و ساختار ثانویه با ثباتی ایجاد شده است. علاوه بر این، ساختار ثانویه scFv با اتصال نوروتوکسین و scFv از طریق لینکرهای کوتاه و تشکیل scFv+نوروتوکسین تغییر نمی‌کند. ساختار ثانویه پروتئین کایمریک حاوی ۸/۷۶٪ مارپیچ آلفا، ۳۸/۱۸٪ رشته گسترش یافته و ۵۲/۰۳٪ پیچ تصادفی است (شکل ۱).



شکل ۱: نتایج وب سرور GORV

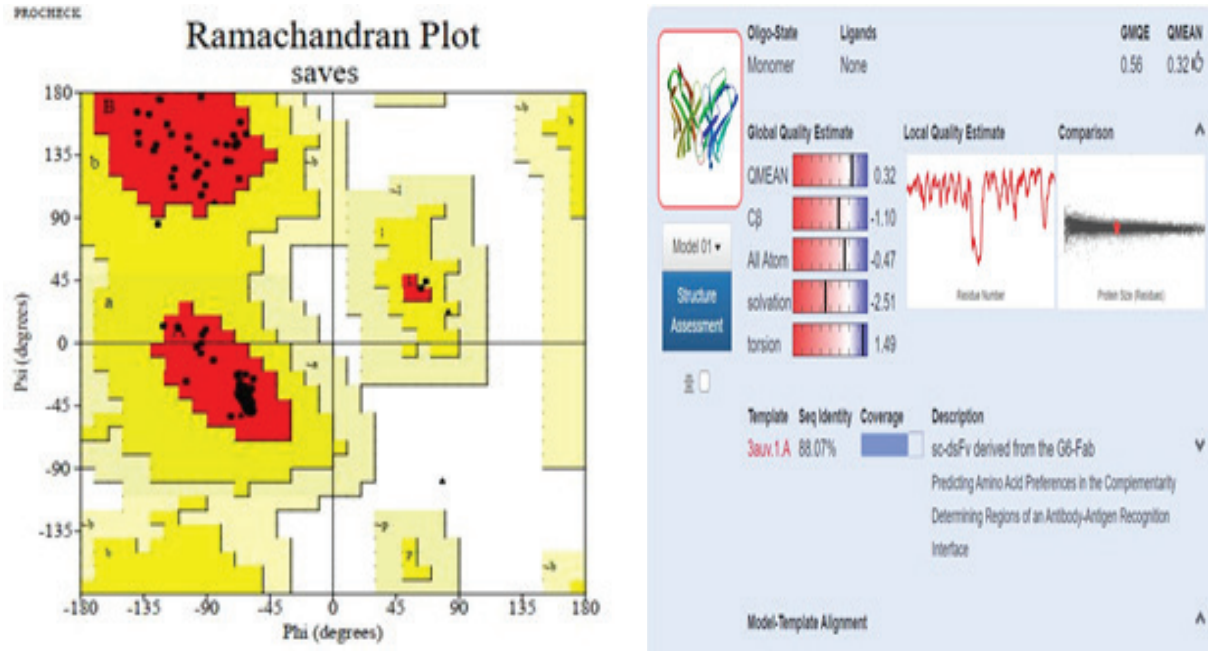
نتایج خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پیش‌بینی حلالیت

نتایج حاصل از سرور ProtParam، وزن مولکولی، pI نظری و بار خالص به ترتیب۳۲۳۴۸/۸۱ ، ۸/۴۹ و ۱۲+ بود. شاخص آلیفاتیک و گراویتی پروتئین کایمر به ترتیب ۵۶/۴۸ و-۰/۵۶۱- بود. scFv+نوروتوکسین به عنوان یک پروتئین پایدار مشخص شد (شاخص ناپایداری ۳۴/۷۳، شاخص زیر ۴۰ به معنای پایدار بودن پروتئین است) و بر اساس نتیجه پیش‌بینی میزان حلالیت بر اساس سرور protein-sol پروتئین کایمریک، نشان داده شد که یک پروتئین محلول (۰/۵۴۲=امتیاز محلول بودن در protein-sol) است.

نتایج اعتبارسنجی ساختار سوم

چند مدل سه‌بعدی از پروتئین هیبرید توسط سرور I-TASSER و Swiss model ساخته شد و مدل دارای بالاترین امتیاز (۱/۹۲-) اطمینان (نمره c) انتخاب شد که نمرات C بین ۲/۶۰-و ۱/۹۰- بود. مقدار بالاتر نمره بیانگر مدل مطمئن‌تر است. در میان پنج مدل به دست آمده از سرور I-TASSER، مدل با منطقه مطلوب بالا (۷۴/۴٪) و مجاز (۱۸/۲٪) آن در کل (۹۲/۶٪) و (c-Score=-۲,۲۴) در نمودار راماچاندران انتخاب شد این مدل توسط سرور 3Drefine بهبود یافت و منطقه مطلوب بالا (۷۶/۴٪) و مجاز (۱۹/۳٪) آن در کل (۹۵/۷٪) تغییر یافت. کیفیت مدل‌ها بعد از اصلاح توسط سرورهای PROCHECK ارزیابی شد. از طریق نمودار Ramachandran مدل انتخابی حاصل از PROCHECK، این مدل از نظر محل قرارگیری رزیدوها در ساختارش مشخص شد (شکل ۲).

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]



ب الف

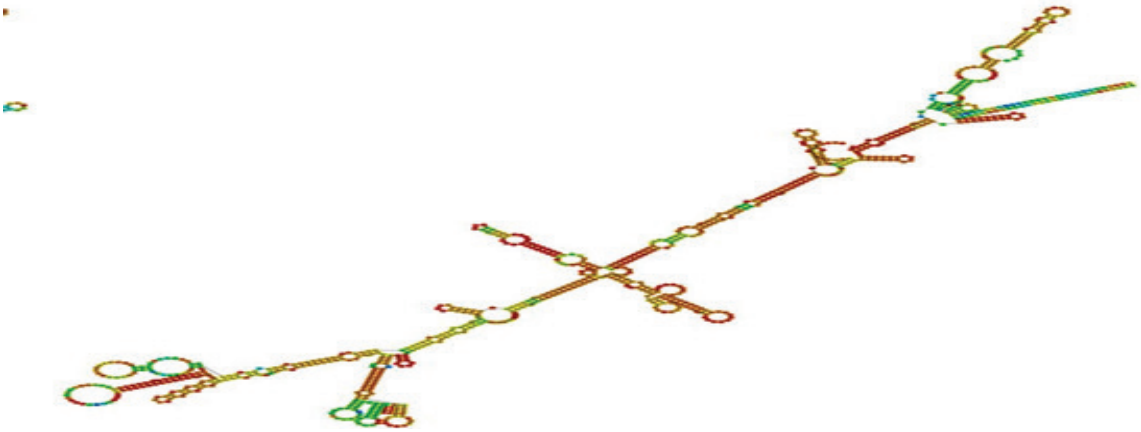
شکل ۲: الف: تصویر حاصل از Swiss model ب: ارزیابی موقعیت صحیح آمینواسیدهای مدل به دست آمده از سرور I-TASSER توسط نمودار راماچاندران حاصل از نرم‌افزار PROCHECK می‌باشند.

نتایج پیش‌بینی آلرژی

نتایج حاصل از ارزیابی سرور تحت وب AllergenFP v.1.0 نشان داد که ساختار هیبرید scFv+Bmk برای بدن انسان حساسیت‌زا نیست.

نتایج پیش‌بینی پایداری mRNA

نتایج حاصل از سرور تحت وب RNAfold که به منظور پیش‌بینی ساختارهای ثانویه RNA، حداقل سازی انرژی آزاد را محاسبه می‌کند، انرژی آزاد گروه ترمودینامیکی -۷۹/۳۸۵ کیلوکالری بر مول بود (پایدار) (شکل۳).

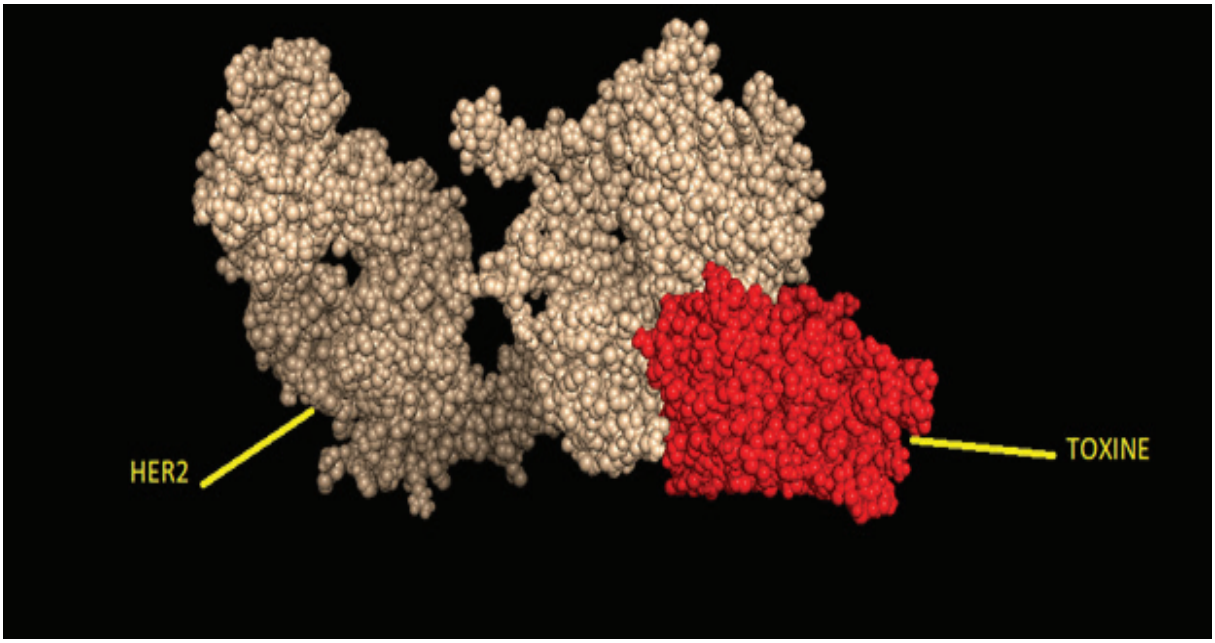


شکل ۳: ساختار ثانویه ساختار RNA توسط سرور تحت وب RNAfold

نتایج داکینگ

مدل‌های مختلف سه‌بعدی گیرنده HER2 و پروتئین کایمریک scFv+نوروتوکسین توسط سرور ClusPro تولید شد. پروتئین هیبرید حاصل به گیرنده HER2 با میل ترکیبی و ویژگی بالا به گیرنده HER2 متصل شد. یکی از بهترین مدل‌های به تصویر کشیده شده برای این اتصال با میزان انرژی ۱۱۳۶/۳-که نسبت به دیگر مدل‌ها که توسط نرم‌افزار Pymol نمایش داده شده نشان داده شده است (شکل۴).

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]



شکل ٤: تصویر حاصل از داکینگ Bkm scFv+ با گیرنده HER2 توسط سرور ClusPro که توسط نرم‌افزار PYMOL تهیه شده است.

بحث

یکی از رایج‌ترین سرطان‌های شناخته در سراسر جهان سرطان پستان است که به خاطر ناهمگنی در توده ساختاری و بافتی فرایند درمان در ان با مشکلات زیادی همراه است (۱۴) که ۲۵-۳۰٪ موارد مبتلا به سرطان پستان HER2 مثبت هستند. و به عنوان شایع‌ترین بدخیمی در نژادها و سنین مختلف و دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان شناخته می‌شود (۱۵). بر اساس مطالعات و مشاهدات متعدد، مشخص شد که روش‌های درمانی معمول مانند جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی میزان مرگ‌ومیر را کاهش نداده است (۱۶). در میان انواع مختلف سرطان پستان بیماران HER2 مثبت پیش‌آگهی بدتر و بقای کوتاه‌تری را از خود نشان می‌دهند. از طرف دیگر مقاومت در برابر شیمی‌درمانی مانع برجسته‌ای در درمان سرطان است (۱۷،۱۸). HER2 یک هدف جذاب برای شیمی‌درمانی بوده است که طی مطالعات مختلف توالی‌های منحصربه‌فردی را که تمایل زیادی به گیرنده HER2 دارند را در ان شناسایی کرده‌اند (۱۹،۲۰) و با استفاده از انواع اصلاح شده این توالی‌ها که به یک پپتید سیتولیتیک متصل می‌گردد موفق به از بین بردن سلول‌های خاص سرطانی HER2 مثبت دست شده‌اند. بنابراین HER2 یک گیرنده با بیان بیش از حد در سطح سلول‌های سرطانی پستان است که برای درمان هدفمند انتخاب می‌شود و مشاهده شده است که در نتیجه این نوع درمان و با گذشت سال‌ها، بقای بیماران HER2 مثبت افزایش یافته است (۲۱). اولین آنتی‌بادی مونوکلونال ضد HER2 انسانی تراستوزوماب (هرسپتین) است که تنها ۲۰٪ از بین بیماران با بیان بیش از حد HER2 به تراستوزوماب پاسخ می‌دهند. اگرچه این دارو وضعیت بیماران HER2 مثبت را بهبود می‌بخشد و متاستاز را کاهش می‌دهد اما نمونه‌های زیادی از مقاومت در برابر تراستوزوماب گزارش شده است (۲۲). امروزه درمان به‌واسطه ایمونوتوکسین به دلیل اثربخشی بر سلول‌های سرطانی زیاد مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیب سمیت خود را از طریق یک قطعه سم پروتئینی متصل به بخشی از آنتی‌بادی‌های خاص مثل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بدست می‌آورند (۲۳). منشأ سم مورد استفاده در ایمونوتوکسین ها گوناگونی زیادی دارد طوری که در سال های گذشته گزارش‌های مختلف پژوهشی از اثرات ضد سرطانی سم عقرب نوروتوکسین در شرایط in vitro یا in vivo. منتشر شده است. بدین گونه که بخش‌هایی از عصاره سم نوروتوکسین باعث آپوپتوز سلول‌های بدخیم گلیومای U251-MG در شرایط in vitro به خصوص با دوز ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌شود (۲۴) مطالعه دیگری توسط Gao و همکاران (۲۵) نشان داد که سم نوروتوکسین همچنین می‌تواند با مهار چرخه سلولی و ایجاد آپوپتوز، از رشد سلول‌های لنفومای انسان Jurkat و Raji جلوگیری

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]

کند (۲۶) همچنین مشاهده شد که ترکیباتی جدا شده از زهر عقرب نوروتوکسین ، دارای پتانسیل ضد سرطانی هستند. یکی از آن‌ها پروتئین پروتئیناز مانند سرین به نام Neurotoxin -CBP است که می‌تواند وابسته به دوز با سلول‌های سرطانی پستان DCF-7.31 متصل شود. دیگری BmHYA1 یک هیالورونیداز همگن از عقرب نوروتوکسین است که بیان CD44 به‌عنوان یک نشانگر سطح سلول را در رده سلول‌های سرطانی پستان MDA-MB-231 تعدیل می‌کند (۲۷). از زهر Buthus martensii Karsch و عصاره‌های آن دهه‌های زیادی در آسیا و برخی مناطق جهان برای درمان سرطان و درد استفاده می‌شده است. پپتید ضد درد Buthus martensii، بنام نوروتوکسین AGAP به گروهی از پپتیدهای عقرب با زنجیره بلند تعلق دارد و دارای جرم مولکولی 7142Da با ۶۶ بقایای اسیدآمینه است (۲۸، ۲۹) که هم اثرات ضد درد و هم اثر ضد توموری دارد (۳۰). در مطالعه حاضر، از روش‌های مبتنی بر بیوانفورماتیک برای طراحی یک کایمر (ایمونوتوکسین) خاص متشکل از scFv خاص HER2 مشتق شده از تراستوزوماب و یک بخش عملکردی سم نوروتوکسین موجود در زهر عقرب (نوروتوکسین) جهت استفاده در درمان بیماران سرطان پستان استفاده شد. طراحی ما مشابه مطالعه Sokolova و همکاران در سال ۲۰۱۷ بود. آن‌ها از قطعه scFv آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی HER2 «تراستوزوماب» و PE40 که بخشی از اکسیدوتوکسین سودوموناس (A)PE است برای ساخت یک ترکیب هیبرید سمی استفاده کرده بودند و همچنین مطالعه ما شبیه کار Vafadar و همکاران در سال ۲۰۱۹ است که آن‌ها از قطعه scFv آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی HER2 و Cj-) CdtB) که بخشی سمی از توکسین کمپیلوباکترژژونی است و برای ساخت یک کایمر سمی استفاده کرده بودند است. این پروتئین‌های کایمریک ایمونوتوکسین های کارآمد در برابر سلول‌های سرطانی پستان با HER2 مثبت در شرایط in vitro و in vivo بودند که نتایج کار آن‌ها پتانسیل ضد سرطانی قدرتمند scFv-PE40 را تأیید کرد. در این مطالعه نیز با استفاده از VL و VH تراستوزوماب یک scFv ایجاد شد و این بخش‌های کوچک آنتی‌بادی را از طریق یک اتصال‌دهنده پپتید کوتاه متصل گردید. در حقیقت دلیل استفاده از scFv خواص برتر آن از جمله وزن مولکولی پایین، آنتی‌ژنی کمتر، اتصال بیشتر و ویژگی بیشتر در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها بود (۳۱). VL و VH توسط پیوند دهنده انعطاف‌پذیر KKKKSKKKKSKKKKS به هم متصل شد و scFv را تشکیل دادند. (۳۲). سپس scFv به قطعه سمی نوروتوکسین متصل شد (۳۳) و به منظور ایجاد ارتباط بین scFv و نوروتوکسین اسیدآمینه GGSGG آب‌گریز به عنوان اتصال‌دهنده انعطاف‌پذیر مطلوب انتخاب شد. ژانگ و همکاران دو ایمونوتوکسین بر اساس تراستوزوماب scFv و داروی سیتوتوکسیک DM1 به نام های T-SA1-HAS-DM1 و TSA2-HAS-DM1 ساخته‌اند. T-SA1-HAS-DM1 فعالیت ضد توموری بالقوه‌ای را نشان داد و در مدل‌های زنوگرافت استفاده شد. طراحی ایمونوتوکسین ما تقریباً مشابه T-SA1-HSA بود. T-SA1-HAS شامل VL و VH تراستوزوماب بود که با هم توسط لینک دهنده GGGGSGGGGSGGGGS. به همدیگر متصل شده‌اند و اتصال‌دهنده بین scFv و HSA نیز توالی GGSGG بود (۳۴). اخیراً Goleij و همکارانش یک ایمونوتوکسین طراحی کردند که حاوی scFv بود که VL و VH در آن توسط لینکر GGGGSGGGGSGGGGS به هم متصل شده بودند که این scFv پایدار بود و توانست به طور مؤثر به HER2 متصل شود (۳۵). نتایج حاصل از آنالیز scFv ما نیز بیانگر پایداری آن بود و اتصال ایمونوتوکسین و HER2 اتصال مطلوبی از خود نشان داد. کارایی ایمونوتوکسین به اندوسیتوز موفقیت‌آمیز بستگی دارد که بر اساس scFv و تعامل گیرنده و داخلی سازی ایمونوتوکسین متصل به گیرنده است (۳۶). کمپلکس ایمونوتوکسین–HER2 از طریق اندوسیتوز با واسطه گیرنده داخلی می‌شود. پس از داخلی سازی مجموعه در اندوزوم های اولیه، سرانجام HER2 در غشاء بازیافت می‌شود و ایمونوتوکسین می‌تواند به گلژی (۳۷) برود. توسط فورین پروتئاز سیستم گلژی جداسازی سم انجام می‌شود و به شبکه آندوپلاسمی (ER) و در نهایت به هسته منتقل می‌شود و منجر به آسیب DNA می‌شود (۳۸). مطابق با این مسیر و بر اساس این واقعیت که فورین در مجموعه گلژی به عنوان پروتئاز برای تجزیه پروتئین عمل می‌کند یک سایت شناسایی پروتئین فورین (توالی اسیدآمینه RGRR) بین اتصال‌دهنده GGSGG و HSA قرار داده شد. پیش‌بینی شده است که وقتی پروتئین کایمریک scFv+نوروتوکسین وارد گلژی می‌شود فورین این سایت را تشخیص داده و پیوند دهنده پپتید را می‌شکند

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]

که این منجر به جداسازی scFv و نوروتوکسین می‌شود و با جدا شدن نوروتوکسین می‌تواند به‌تنهایی به هسته برسد (۳۹). Weldon و همکاران ایمونوتوکسین های بر اساس سودوموناس اگزوتوکسین A طراحی کردند که حاوی سایت های برش فورین بودند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که محل تجزیه فورین برای فعال شدن سم در دستگاه گلژی ضروری است (۴۷). در مطالعه حاضر ابتدا از سرور وب GORV برای پیش‌بینی ساختارهای ثانویه scFv و scFv+نوروتوکسین استفاده شد. این سرور با پیش‌بینی تأثیر اسیدهای آمینه بر شرایط و ساختار اسیدهای آمینه مجاور، ساختارهای ثانویه احتمالی پروتئین‌ها را تخمین زده شد که از مقایسه بین ساختارهای ثانویه scFv و پروتئین همجوشی وقتی نوروتوکسین از طریق اتصال‌دهنده‌های کوتاه به scFv متصل می‌شود هیچ تغییری در ساختارهای ثانویه آن‌ها نشان نداد. از تجزیه‌وتحلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، شاخص بی‌ثباتی پروتئین همجوشی ۳۶.۵۸ بود که نشان‌دهنده پایداری پروتئین scFv+نوروتوکسین بود. شاخص آلیفاتیک بالای آن نیز با پایداری پروتئین در طیف وسیعی از دما مرتبط است (۴۰). از وب سرور I-TASSER و SWISSMODEL برای ایجاد مدل سه بعدی پروتئین نوترکیب scFv+نوروتوکسین در I-TASSE بر اساس نمره c استفاده شد. نمره C معمولاً در محدوده ۵- تا ۲+ است و مثبت بودن بیشتر نشان‌دهنده اطمینان بیشتر مدل و بالعکس است (۴۱) که مدل با بالاترین نمره c برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شد. پس از اصلاح ساختار مدل، ارزیابی مدل‌های اصلاح شده با استفاده از PROCHECK انجام شد. نتایج طرح راماچاندران نشان‌دهنده پایداری مدل بود. زیرا بیشتر رزیدوها در مناطق مطلوب قرار داشتند و با اصلاح مدل حتی، میزان مطلوبیت افزایش یافت که این نشان می‌دهد که مدل‌ها در زاویه پیوند و محل اسیدهای آمینه بهبود یافته است و این نتایج توسط PROCHECK تأیید شدند. پیش‌بینی ساختار ثانویه mRNA نیز نشان داد که انرژی آزاد پیچیده ترمودینامیکی ۳۸۵/۷۹- ترکیب scFv+نوروتوکسین کیلوکالری در مول بود که این نشان می‌دهد که mRNA پروتئین کایمریک پایدار است. از آنجا که سازه کایمریک حاوی نوروتوکسین است که بخشی سمی است ممکن است به عنوان آلرژن در بدن برای انسان عمل کند (۴۲) که نتایج حاصل از سرور AllergenFP v.1.0 حاکی از آلرژی‌زا نبودن ترکیب داشت. از داکینگ گیرنده/ لیگاند برای بررسی اینکه آیا scFv مشتق از تراستوزوماب می‌تواند ظرفیت اتصال خود را به گیرنده HER2 حفظ کند و Neurotoxin را به سلول‌های سرطانی پستان HER2 مثبت منتقل کند استفاده شد که نتایج CLUSPRO نشان داد که پروتئین کایمریک scFv+نوروتوکسین می‌تواند به گیرنده‌های HER2 با میل و ویژگی مطلوبی متصل شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که ترکیب scFv+نوروتوکسین می‌تواند یک پروتئین هیبرید پایدار و غیر حساسیت‌زا با میل مناسب برای افزایش گیرنده‌های HER2 در سلول‌های سرطانی پستان باشد. بنابراین، ساختار ایمونوتوکسین ایجاد شده را می‌توان یک کاندیدای جدید ایمونوتوکسین در جهت استفاده در مسیر درمان سرطان پستان HER2 مثبت در نظر گرفت که اثبات این عملکرد نیازمند آزمایش ها و فرایندهای دقیق بالینی می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم میدانند از همکاری اساتید گروه بیوشیمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز قدردانی کنند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافعی از طرف نویسندگان در مورد مقاله مذکور گزارش نشده است.

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]

References

1. Jafari SH, Saadatpour Z, Salmaninejad A, Momeni F, Mokhtari M, Nahand JS. & Kianmehr, M.(2018). Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. Journal of cellular physiology.;233(7):5200-13. https://doi.org/10.1002/jcp.26379
2. Lanari C, Wargon V, Rojas P, Molinolo AA. Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready?. Endocrine Related Cancer. 2012 Jun 1;19(3):R35. https://doi.org/10.1530/ERC-11-0378
3. Tan M, Yu D. Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance. Breast Cancer Chemosensitivity. 2007:119-29. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74039-3_9
4. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. Lancet.2017;389(10087):2415-29.DOI:10.1016/S0140-6736(16)32417-5. [PubMed: 27939064]. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5
5. Zhou XH, Yang D, Zhang JH, Liu CM, Lei KJ. Purification and N-terminal partial sequence of anti-epilepsy peptide from venom of the scorpion Buthus martensii Karsch. Biochemical Journal. 1989 Jan 15;257(2):509-17. https://doi.org/10.1042/bj2570509
6. Shao J, Kang N, Liu Y, Song S, Wu C, Zhang J. Purification and characterization of an analgesic peptide from Buthus martensii Karsch. Biomedical Chromatography. 2007 Dec;21(12):1266-71. https://doi.org/10.1002/bmc.882
7. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. Journal of controlled release. 2010 Sep 15;146(3):264-75. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.009
8. Liu Y, Xu J, Choi HH, Han C, Fang Y, Li Y, Van der Jeught K, Xu H, Zhang L, Frieden M, Wang L. Targeting 17q23 amplicon to overcome the resistance to anti-HER2 therapy in HER2+ breast cancer. Nature communications. 2018 Nov 9;9(1):1-6. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07264-0
9. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. J Control Release. 2010;146(3):264-75. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.04.009. [PubMed: 20385184]. [PubMed Central: PMC2918695]. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.009
10. Pal SK, Pegram M. HER2 targeted therapy in breast cancer... beyond Herceptin. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2007 Sep;8(3):269-77. https://doi.org/10.1007/s11154-007-9040-6
11. Niu DG, Peng F, Zhang W, Guan Z, Zhao HD, Li JL, Wang KL, Li TT, Zhang Y, Zheng FM, Xu F. Morphine promotes cancer stem cell properties, contributing to chemoresistance in breast cancer. Oncotarget. 2015 Feb;6(6):3963. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2894
12. Yang HF, Yu M, Jin HD, Yao JQ, Lu ZL, Yabasin IB, Yan Q, Wen QP. Fentanyl promotes breast cancer cell stemness and epithelial-mesenchymal transition by upregulating α1, 6-fucosylation via Wnt/β-catenin signaling pathway. Frontiers in Physiology. 2017 Jul 26;8:510. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00510
13. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene. 2007 Oct;26(45):6469-87. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477
14. Mahboobi M, Sedighian H, Hedayati CH, Bambai B, Soofian SE, Amani J. Applying bioinformatic tools for modeling and modifying type II E. coli L-Asparginase to present a better therapeutic agent/drug for acute lymphoblastic leukemia. Iranian Journal of Cancer Prevention. 2017;10(3):10. https://doi.org/10.5812/ijcm.5785
15. Takahashi S, Nakagawa T, Banno T, Watanabe T, Murakami K, Nakayama K. Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. J Biol Chem. 1995;270(47):28397-401. doi: 10.1074/jbc.270.47.28397. [PubMed: 7499343]. https://doi.org/10.1074/jbc.270.47.28397
16. Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. J Biochem. 1980;88(6):1895-8. [PubMed: 7462208].
17. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nature Reviews Cancer. 2013 Oct;13(10):714-26. https://doi.org/10.1038/nrc3599
18. Ménard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. Oncology. 2001;61(Suppl. 2):67-72. https://doi.org/10.1159/000055404
19. Urbanelli L, Ronchini C, Fontana L, Menard S, Orlandi R, Monaci P. Targeted gene transduction

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]

of mammalian cells expressing the HER2/neu receptor by filamentous phage. Journal of molecular biology. 2001 Nov 9;313(5):965-76. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5111

20. Pero SC, Shukla GS, Armstrong AL, Peterson D, Fuller SP, Godin K, Kingsley-Richards SL, Weaver DL, Bond J, Krag DN. Identification of a small peptide that inhibits the phosphorylation of ErbB2 and proliferation of ErbB2 overexpressing breast cancer cells. International journal of cancer. 2004 Oct 10;111(6):951-60. https://doi.org/10.1002/ijc.20306
21. Zhang FT, Xu ZS, Qi YX. A preliminary research of the antineoplastic effects induced by Buthus martensii of Chinese drug-I. Observation of the effect on mice with tumor. J Gannan Med Coll. 1987;6:1-5.
22. Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. Journal of neuro-oncology. 2005 May;73(1):1-7. https://doi.org/10.1007/s11060-004-4205-6
23. Allahyari H, Heidari S, Ghamgosha M, Saffarian P, Amani J.Immunotoxin: A new tool for cancer therapy. Tumour Biol.2017 ;39(2):1.0104283176922E+15. https://doi.org/10.1177/1010428317692226
24. Kelso JM, Greenhawt MJ, Li JT, Nicklas RA ,Bernstein DI ,Blessing-Moore J, et al. Adverse reactions to vaccines practice parameter 2012 update. J Allergy Clin Immunol. 2012;130(1):25-43. doi:10.1016/j.jaci.2012.04.003. [PubMed: 22608573]. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.003
25. Gao F, Li H, Chen YD, Yu XN, Wang R, Chen XL. Upregulation of PTEN involved in scorpion venom-induced apoptosis in a lymphoma cell line. Leukemia & lymphoma. 2009 Jan 1;50(4):633-41. https://doi.org/10.1080/10428190902755505
26. Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. J Neurooncol 2005;73:1-7. https://doi.org/10.1007/s11060-004-4205-6
27. Cao P, Yu J, Lu W, Cai X, Wang Z, Gu Z, Zhang J, Ye T, Wang M. Expression and purification of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Mesobuthus martensii Karsch by small ubiquitin-related modifier fusion in Escherichia coli. Biotechnology progress. 2010 Sep;26(5):1240-4. https://doi.org/10.1002/btpr.433
28. Zhao Y, Cai X, Ye T, Huo J, Liu C, Zhang S, Cao P. Analgesic-antitumor peptide inhibits proliferation and migration of SHG-44 human malignant glioma cells. Journal of cellular biochemistry. 2011 Sep;112(9):2424-34. https://doi.org/10.1002/jcb.23166
29. Feng L, Gao R, Gopalakrishnakone P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion Buthus martensi. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2008 Sep 1;148(3):250-7. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.003
30. Taheri-Anganeh M, Khatami SH, Jamali Z, Savardashtaki A, Ghasemi Y, Mostafavi-Pour Z. In silico analysis of suitable signal peptides for secretion of a recombinant alcohol dehydrogenase with a key role in atorvastatin enzymatic synthesis. Molecular Biology Research Communications. 2019 Mar;8(1):17.
31. Liu D, Du L, Chen D, Ye Z, Duan H, Tu T, Feng J, Yang Y, Chen Q, Yan X. Reduced CD146 expression promotes tumorigenesis and cancer stemness in colorectal cancer through activating Wnt/β-catenin signaling. Oncotarget. 2016 Jun 28;7(26):40704. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9930
32. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NB, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. Clinical and developmental immunology. 2012 Oct;2012. https://doi.org/10.1155/2012/980250
33. Chen X, Zaro J, Shen WC. Fusion protein linkers: effects on production, bioactivity, and pharmacokinetics. Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, ed. SR Schmidt (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons). 2013 Mar 8:57-73. https://doi.org/10.1002/9781118354599.ch4
34. He Z, Gharaibeh RZ, Newsome RC, Pope JL, Dougherty MW, Tomkovich S, Pons B, Mirey G, Vignard J, Hendrixson DR, Jobin C. Campylobacter jejuni promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin. Gut. 2019 Feb 1;68(2):289-300. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317200
35. Zhang H, Wang Y, Wu Y, Jiang X, Tao Y, Yao Y, Peng Y, Chen X, Fu Y, Yu L, Wang R. Therapeutic potential of an anti-HER2 single chain antibody-DM1 conjugates for the treatment

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]

of HER2-positive cancer. Signal transduction and targeted therapy. 2017 May 19;2(1):1-1. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.15

36. Goleij Z, Hosseini H, Amin M, Amani J, Behzadi E, Fooladi AA. In silico evaluation of two targeted chimeric proteins based on bacterial toxins for breast cancer therapy. International Journal of Cancer Management. 2019 Feb 1;12(2). https://doi.org/10.5812/ijcm.83315
37. Raja SM, Desale SS, Mohapatra B, Luan H, Soni K, Zhang J, Storck MA, Feng D, Bielecki TA, Band V, Cohen SM. Marked enhancement of lysosomal targeting and efficacy of ErbB2-targeted drug delivery by HSP90 inhibition. Oncotarget. 2016 Mar 1;7(9):10522. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7231
38. Shilova ON, Proshkina GM, Lebedenko EN, Deyev SM. Internalization and recycling of the HER2 receptor on human breast adenocarcinoma cells treated with targeted phototoxic protein DARPinminiSOG. Acta Naturae (англоязычная версия). 2015;7(3 (26)):126-32. https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-3-126-132
39. Guerra L, Teter K, Lilley BN, Stenerlöw B, Holmes RK, Ploegh HL, Sandvig K, Thelestam M, Frisan T. Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. Cellular microbiology. 2005 Jul;7(7):921-34. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00520.x
40. Weldon JE, Skarzynski M, Therres JA, Ostovitz JR, Zhou H, Kreitman RJ, Pastan I. Designing the furin-cleavable linker in recombinant immunotoxins based on Pseudomonas exotoxin A. Bioconjugate chemistry. 2015 Jun 17;26(6):1120-8. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00190
41. Zhang Y. I-TASER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics. 2008;9:40. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40
42. JT KJ. Adverse reactions to vaccines practice parameter 2012 update [published online May 16, 2012].JAllergyClinImmunol.2012;130(1):25-43. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.003

[Downloaded from ijca.ir on 2026-06-10]