



Designing and Evaluation of the Structure and Functions of New Immunotoxins for Ovarian Cancer in Quasi-Physiological Conditions

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Sabagh R.¹ MSc,
Haddad-Mashadrizheh A.A.*² PhD,
Dolatabadi S.³ PhD

How to cite this article

Sabagh R, Haddad-Mashadrizheh A.-A, Dolatabadi S. Designing and Evaluation of the Structure and Functions of New Immunotoxins for Ovarian Cancer in Quasi-Physiological Conditions. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 201-209.

¹Biology Department, Science Faculty, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

²Recombinant Proteins Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³Microbiology Department, Science Faculty, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

*Correspondence

Address: Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Azadi Square, Mashhad, Iran. Postal Code: 9177948974

Phone: +98 (51) 38803796

Fax: +98 (51) 18762227

a.haddad@um.ac.ir

Article History

Received: January 23, 2018

Accepted: April 9, 2018

ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Immunotoxins, as a critical approach for cancer therapy, have ability to induction death in cancerous cells based on specific ligands for targeting cancer-specific antigens and toxin domains in its context. Bearing in mind, discovery the cancer-specific antigens, as well as immunotoxin characterization for modeling based on linkers application, is a critical step for drugs design, which is considered in this study for ovarian cancer based on in-silico biology. The results of this study, led to the detection of 29 antigens with expression capacity on the surface of ovarian cancer cells, with the highest and specific expression associated with MAGE4 and CA125 antigens. Moreover, the 3D structure of MAGE4 was performed, and the pattern of its expression was determined to rely on HLA proteins. On the other hand, among connecting proteins to this antigen TRIM69 selected as the most effective ligand. Subsequently, the assembling between the domain of Corynebacterium diphtheria and this ligand with (GGGGS) 3 linker in 5 positions led to the creation of 50 models, with different quality and structure. However, among these models, S4 drug showed the best structure and function including binding affinity and immunogenicity after simulation in physiological condition. Generally, this result led to present the MAGE4 as a suitable candidate for immunotoxin development for ovarian cancer, as well as an effective immunotoxin which should be considered in an experimental condition.

Keywords Immunotoxin; Toxin; Ligands; Antigen; MAGE4

CITATION LINKS

[1] Principles and practice ... [2] Effect of flunixin on ovarian ... [3] Prognosis and prognostic ... [4] Optimization of chemically ... [5] Clinical evaluation of ... [6] High shed antigen levels ... [7] A multicenter dose-escalation ... [8] Introduction to chemical ... [9] Immunotoxins for ... [10] Immunotoxin treatment ... [11] Novel immunoproteases ... [12] Crystal structure of a monomeric ... [13] Amyloid formation by globular ... [14] Risk analysis of the thermal ... [15] Platelet-derived growth factor ... [16] Specific carcinoembryonic ... [17] Multiple roles of mucins ... [18] Evaluation of Cell-Penetrating ... [19] Proteomic analysis of post- ... [20] p62/SQSTM1 forms ... [21] Mechanisms of nutrient ... [22] Optimization of tether ... [23] Peptide stability in drug ... [24] Nanocarriers as an emerging ... [25] A web server and mobile ... [26] Automatic prediction of ... [27] How amino-acid insertions ... [28] Tissue-based map of ... [29] STRING v10: Protein ... [30] Prediction of post-translational ... [31] Chromosome-wise ... [32] SWISS-MODEL: Modelling ... [33] The I-TASSER suite: Protein ... [34] Molecular characterization ... [35] An investigation ... [36] Structure validation by ... [37] Verification of protein ... [38] Functional analysis and ... [39] GROMACS: High performance ... [40] SVMTriP: A method to predict ... [41] How good is automated ... [42] PatchDock and SymmDock ... [43] The HADDOCK2.2 web server ... [44] Investigation of the complex ... [45] A novel recombinant ... [46] Immunotherapy for ... [47] Search for the standard ... [48] ERBB receptors and cancer ... [49] Recombinant toxins ... [50] Phase I trial of ... [51] Phase I trial of ... [52] Distinct evolution of the ... [53] Structure, chromosomal ... [54] The melanoma-associated ... [55] Cancer testis antigens ... [56] Tripartite-motif proteins ... [57] TRIM67 protein negatively ... [58] A novel TRIM family ... [59] Manual for the production ... [60] Mesospheric hydrogen ... [61] Ribosome-inactivating ... [62] Phase II trial of denileukin ... [63] Recombinant immunotoxins ... [64] Protein engineering of ... [65] STAMP 6.0 structural ... [66] Interactions of different ... [67] Membranes serve as ... [68] GATA2 is required for ... [69] Expression profiling of ... [70] Molecular modeling and ... [71] Studies of the nonlinear problems ... [72] MDSA-an interactive analysis ... [73] Development and current ... [74] Molecular docking studies ... [75] Architecture of P2Y ... [76] Defining the nucleotide ... [77] Structure of an antibody ... [78] Characterization of Zaire ...

طراحی و ارزیابی ساختاری و عملکردی سازه‌های نوین ایمونوتوکسینی موثر بر سرطان تخمدان در شرایط شبه‌فیزیولوژیک

راضیه صباغ MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

علی اکبر حداد مشه‌دیزه* PhD

گروه پژوهشی پروتئین‌های نوترکیب، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

سمانه دولت‌آبادی PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

چکیده

ایمونوتوکسین‌ها با قابلیت هدف‌گذاری هوشمند و القای مرگ سلول‌های سرطانی مبتنی بر حضور لیگاند اختصاصی مرتبط با آنتی‌ژن و بخش توکسینی راهکاری اساسی در درمان بیماری‌های سرطانی هستند. بنابراین آشکارسازی آنتی‌ژن‌های اختصاصی سطح سلول‌های سرطانی و اجزای تشکیل‌دهنده این نوع از داروها و سرهم‌بندی آنها مبتنی بر لینکرهای پپتیدی گام اساسی در طراحی این نوع از داروها است که در این تحقیق مبتنی بر علم محاسبات در ارتباط با سرطان تخمدان در دستور کار قرار گرفته است. نتایج حاصل از این تحقیق در گام نخست، منجر به آشکارسازی ۲۹ آنتی‌ژن با قابلیت بیان در سطح سلول‌های سرطانی تخمدان با بیشترین و اختصاصی‌ترین بیان در ارتباط با آنتی‌ژن‌های MAGE4 و CA125 شد. مدل ساختاری MAGE4 تعیین و الگوی بیانی آن بر سطح غشای مبتنی بر حضور پروتئین‌های HLA تعیین شد. از سویی دیگر، بین مولکول‌های پروتئینی قابل اتصال به این آنتی‌ژن TRIM69 به‌عنوان کارآمدترین لیگاندها انتخاب شد. در ادامه، سرهم‌بندی دمین توکسینی مشتق از کورینه باکتریوم دیفتری به لیگاند انتخابی با استفاده از لینکر ۳ (GGGGS) در ۵ حالت مختلف منجر به ایجاد ۵۰ سازه نوترکیب با کیفیت و ساختار متفاوت شد که در این میان مدل ساختاری داروی پروتئینی کدشده از سازه S4، بهترین پایداری ساختاری و عملکردی از دیدگاه میل اتصال و ایمونوژنسیته پس از قرارگیری در شرایط شبه‌واقعی را نشان داد. به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق منجر به معرفی آنتی‌ژن MAGE4 به‌عنوان نامزدی مناسب در اهداف داروهای ایمونوتوکسینی موثر بر علیه تخمدان و طراحی ایمونوتوکسینی موثر بر این آنتی‌ژن با قابلیت مطلوب ساختاری و عملکردی شد که باید مورد آزمون‌های آزمایشگاهی قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: ایمونوتوکسین، توکسین، لیگاند، آنتی‌ژن، MAGE4 و TRIM69

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۰

*نویسنده مسئول: a.haddad@um.ac.ir

مقدمه

سرطان دستگاه تناسلی زنان ۱۲/۷٪ بدخیمی‌های این طیف از جامعه، با ششصد نوع متفاوت به‌ترتیب در بافت‌های اندومتر، تخمدان، سرویکس، وولو و واژن را شامل می‌شود^[1]. در این میان، بدخیمی‌های تخمدان بالاترین موارد مرگ‌ومیر را به خود اختصاص داده است^[2]. این نوع از سرطان، به‌علت علائم بالینی ناچیز اصولاً به متاستاز و مرگ منتهی می‌شود^[3]. بنابراین، مانند سایر سرطان‌ها توجه به این نوع از بیماری در جهت تشخیص زودهنگام و درمان موثر آن امری اجتناب‌ناپذیر بوده، که در این میان ایمونوتوکسین‌ها جایگاه ویژه‌ای در درمان هدفمند کسب نموده‌اند. این نوع از ترکیب‌های درمانی، پروتئین‌هایی هیبریدی با قابلیت هدف‌گذاری هوشمند و القای مرگ سلول‌های سرطانی مبتنی بر حضور لیگاند اختصاصی مرتبط با آنتی‌ژن سطح سلول‌های سرطانی و بخش

توکسینی در ساختار آنها هستند^[4]. در همین راستا، توسعه این نوع از داروها در ارتباط با سرطان تخمدان و سایر بیماری‌های سرطانی صورت پذیرفته، که از جمله آنها می‌توان به داروی ایمونوتوکسینی OVB3-PE^[5] و SS1P با قابلیت درمان سرطان تخمدان^[6] و ONTAK با تاییدیه FDA در جهت درمان لنفوم سلول‌های پوستی و لنفوم غیرهوچکین اشاره نمود^[7]. این نوع از داروهای سیتوتوکسیک، مبتنی بر بخش لیگاندی خود به آنتی‌ژنی اختصاصی سطح سلول سرطانی متصل می‌شوند و به‌دنبال آن تمام کمپلکس آنتی‌ژن-ایمونوتوکسین ممکن است وارد سلول شوند^[8]. در داخل سلول اتصال بین بخش لیگاندی و توکسین شکسته، و مرگ سلولی مبتنی بر نوع توکسین از مسیرهای متفاوت از جمله مهار عمل پروتئین‌سازی القا می‌شود^[8, 9]. ایزوفرم‌های مختلفی از آنتی‌بادی‌ها، فاکتورهای رشد و نیز توکسین‌های باکتریایی و غیرباکتریایی همچون توکسین دیفتری، آگزوتوکسین سودوموناس و ریسین در ساختار ایمونوتوکسین‌ها به کار برده شده‌اند^[10]، با این وجود توسعه و بهینه‌سازی آنها در دستور کار بسیاری از مراکز تحقیقاتی است. در مسیر توسعه این نوع از داروها به مانند بسیاری از داروهای نوترکیب پروتئینی توجه به ایمونوژنسیته^[11]، فولدینگ و ساختار دارو^[12]، پایداری پروتئین در شرایط فیزیولوژیکی^[13]، مقاومت دمایی در شرایط استریلاسیون^[14]، اتصال اختصاصی به سلول هدف^[15]، آشکارسازی آنتی‌ژن‌های اختصاصی سطح سلول‌های سرطانی^[16, 17]، نفوذ به سلول^[18]، تغییرات پس از ترجمه^[19] و القای مرگ سلولی^[20] حائز اهمیت و توجه خاص می‌باشند. در این راستا، گزارش‌های مختلفی از آزمون‌های عملی در ارتباط با بهینه‌سازی داروهای ایمونوتوکسینی در جهت کاهش پاسخ ایمنی^[21]، بهینه‌سازی بخش‌های توکسینی و لیگاندی^[22]، نفوذپذیری و افزایش پایداری مبتنی بر جایگزینی اسیدهای آمینه^[23] ارایه شده است. از سویی دیگر، لیگاندهای آنتی‌بادی و غیرآنتی‌بادی نظیر مونوکلونال آنتی‌بادی، نانوبادی‌ها، فولات، ترانسفرین، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها و پپتیدها در جهت اتصال اختصاصی بخش توکسینی به سلول توسعه یافته است^[24]. هرچند توسعه و بهینه‌سازی داروهای ایمونوتوکسینی و سایر داروهای نوترکیب مبتنی بر روش‌های آزمایشگاهی صورت پذیرفته و می‌پذیرد، با این وجود توجه به میزان هزینه‌ها و صرف زمان، به‌کارگیری روش‌های نوین محاسباتی را توجیه‌پذیر می‌سازد^[25]. بنابراین، شناخت بخش‌های مختلف ایمونوتوکسین‌های رایج با هدف بهینه‌سازی یا معرفی توکسین‌های نوین و لیگاندهای اختصاصی مرتبط با آنتی‌ژن‌های سطح سلول‌های سرطانی در جهت طراحی این نوع از داروها مبتنی بر واکاوی داده‌ای و محاسبات زیستی^[25, 26] حائز اهمیت است که در این تحقیق در ارتباط با سرطان تخمدان در دستور کار قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

استحصال توالی پروتئینی و ساختار سه‌بعدی

توالی پروتئینی آنتی‌ژن‌های انتخابی مرتبط با سلول‌های سرطانی تخمدان شامل MAGE4، CA125 یا MUC16، EPCAM، MSLN با شماره‌های دستیابی ۵۸۵۳۰۸۶۹، ۸۳۳۶۷۰۷۷، ۲۱۸۵۰۵۶۷۰، ۱۱۶۲۴۲۶۵۴ از بانک اطلاعات پروتئینی NCBI استحصال شدند. در همین راستا توالی پروتئینی توکسین دیفتری با شماره دستیابی ۳۲۶۹۸۴۴۰، نیز استحصال شد. از سویی دیگر، ساختار سه‌بعدی توالی‌های مورد نیاز شامل آنتی‌ژن‌های MAGE4،

ارزیابی قرار گرفتند. نمایش ساختارها با استفاده از نسخه ۲/۱ برنامه پایمول [35] انجام شد.

تعیین کیفیت ساختارهای پروتئینی مدل شده

تعیین کیفیت ساختارهای مدل شده در مسیر آزمایش با استفاده از آشکارسازی امتیاز موقعیت قرارگیری اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده ساختار مبتنی بر تعیین نمودار رامچاندرا [36] با برنامه RAMPAGE، و فاکتورهای ERRAT [37]، VERIFY_3D [38] در جهت انتخاب بهترین ساختار مدل شده صورت پذیرفت.

بهینه‌سازی ساختاری سازه‌های ایمونوتوکسینی

بهینه‌سازی سازه‌های ایمونوتوکسینی مدل شده و نیز ارزیابی پایداری ساختاری سازه در شرایط شبه‌فیزیولوژیک با استفاده از نرم‌افزار شبیه‌سازی دینامیک مولکولی Gromacs 4.5-5-1 تحت محیط لینوکس و با استفاده از میدان نیروی Gromos 43a1 انجام شد [39]. به این منظور سازه‌های ایمونوتوکسینی پس از طی کردن مراحل nvt و npt در زمان ۱۰۰ پیکوثانیه و فشار یک اتمسفر و در باکس ۱/۰ نانومتري در محیط مائی SPC216 به مدت ۲۰ نانوثانیه در دمای ۳۰۰ درجه کلوین قرار داده شدند.

ارزیابی قابلیت‌های عملکردی سازه‌های ایمونوتوکسینی

قابلیت سازه‌های ایمونوتوکسینی طراحی شده پس از بهینه‌سازی در شرایط فیزیولوژیک از دیدگاه تحریک پاسخ ایمنی و قابلیت اتصال به سلول سرطانی مورد آزمون قرار گرفتند. به این منظور آشکارسازی اپی‌توب‌های قابل شناسایی سیستم ایمنی همورال با استفاده از وب سرور svMTripT [40] صورت پذیرفت. از سویی دیگر، میل اتصالی سازه‌ها به آنتی‌ژن مرتبط با آزمون داکینگ مولکولی با برنامه‌های ClusPro 2.0 [41]، PatchDock [42] و HADDOCK2.2 [43] صورت پذیرفت.

ارزیابی آماری داده‌ها

ارزیابی‌های آماری داده در مسیر آزمون‌ها با نرم‌افزار SPSS 21.0 انجام شد. در این مسیر مقایسه میانگین داده‌ها با کمک آزمون دانکن و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد.

یافته‌ها

واکاوی و ارزیابی میزان و گستره بیانی آنتی‌ژن‌های سطحی مرتبط با سرطان تخمدان

مرور منابع منجر به آشکارسازی ۲۹ آنتی‌ژن با قابلیت بیان در سطح سلول‌های سرطانی تخمدان شد، که از این میان آنتی‌ژن‌های MAGE4، MAB21L3، MSLN، SART3، EPCAM، CA125 بیشترین بیان در سطح این نوع از سلول‌ها را آشکار نمودند (نمودار ۱). همان‌طوری‌که در این نمودار نمایش داده شده است در این میان، آنتی‌ژن CA125 یا به عبارتی MUC16 بیشترین بیان را در سطح این نوع از سلول‌ها دارد.

آشکارسازی و مدل‌سازی ساختارهای آنتی‌ژن‌های انتخابی

جستجوی مدل‌ساختاری آنتی‌ژن‌های هدف انتخابی سطح سلول‌های سرطانی تخمدان با میزان بیان یا گستره بیانی بالا در بانک اطلاعاتی و نیز تعیین مدل مربوطه براساس روش‌های محاسباتی، منجر به آشکارسازی ساختار سه‌بعدی آنتی‌ژن‌های MSLN، EPCAM و MAGE4 با ساختار و کیفیت مطلوب و با همسانی به‌ترتیب معادل با ۹۹٪ و ۱۰۰٪ و ۹۹٪ و ارزش E معادل با ۰، ۰ و ۰، ۰ و ۰، ۰ براساس توالی‌های الگو شد (شکل ۱). همان‌طور که در این شکل مشخص شده MSLN با ساختاری غنی از

CA125 یا MUC16، EPCAM، MSLN و توکسین دیفتری با شماره شناسایی 4F3F، 4MZV.1.A، 1IVZ-A، 2WAO و 1MDT از بانک اطلاعات PDB [27] دریافت شدند.

ارزیابی میزان و گستره بیان آنتی‌ژنی

میزان و گستره بیان آنتی‌ژن‌های مرتبط با سرطان تخمدان مبتنی بر پروفایل کردن داده‌های موجود در منابع و سنجش میزان و گستره بیان آنها با استفاده از بانک اطلاعاتی Protein Atlas (PA) (<http://www.proteinatlas.org>) [28] صورت پذیرفت. به این منظور با وارد نمودن نام آنتی‌ژن‌های انتخابی در نوار ابزار مرتبط با این پایگاه از منوی cancer cell میزان بیان آنتی‌ژن در سلول‌های طبیعی و سرطانی تعیین شد. میزان بیان آنتی‌ژن‌ها پس از نرمالایز کردن با آزمون SPSS 21 مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گرفت.

واکاوی موقعیت قرارگیری آنتی‌ژن‌ها نسبت به غشای سلولی

به‌منظور تعیین موقعیت قرارگیری آنتی‌ژن‌های انتخابی مرتبط با سرطان تخمدان نسبت به غشای سلولی از برنامه تحت شبکه پیش‌بینی توالی‌های حفاظتی CCTOP در پایگاه اطلاعاتی ExPASy استفاده شد. نتیجه حاصل از این بررسی موقعیت توالی‌های آنتی‌ژنی در ۳ ناحیه خارج سلولی، گذرنده از غشا و داخل سلولی را آشکار می‌کند.

آشکارسازی لیگندهای اختصاصی مرتبط با آنتی‌ژن

به‌منظور آشکارسازی مولکول‌های پروتئینی قابل اتصال به آنتی‌ژن اختصاصی مرتبط با سلول‌های سرطانی تخمدان از وب سرور تحت شبکه String با آدرس <http://string-db.org> استفاده شد [29]. در همین راستا مونوکلونال آنتی‌بادی‌های اختصاصی مرتبط با آنتی‌ژن انتخابی براساس مرور منابع و بانک اطلاعاتی PA ردیابی شد. میل اتصالی لیگاند به آنتی‌ژن، عدم اتصال به سایر آنتی‌ژن‌ها، تغییرات پس از ترجمه و اندازه لیگاند از جمله فاکتورهای مورد بررسی در انتخاب لیگاند بودند.

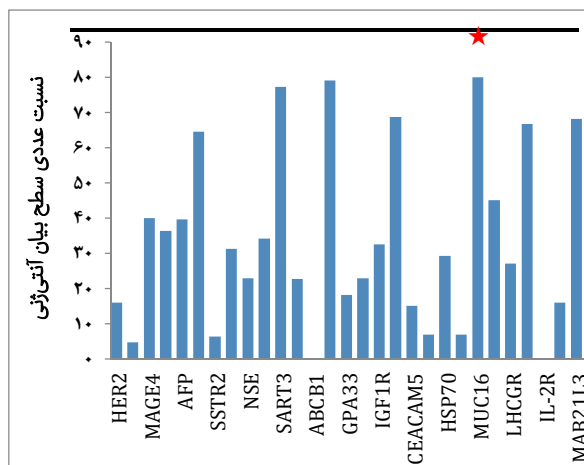
ارزیابی تغییرات پس از ترجمه مولکول‌های قابل اتصال به آنتی‌ژن

پایگاه‌های داده‌ای NetNGlyc [30] و NetPhos [31] با آدرس <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc> و <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos> به‌ترتیب در جهت آشکارسازی جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون و فسفریلاسیون در طول لیگندهای انتخابی مورد استفاده قرار گرفتند.

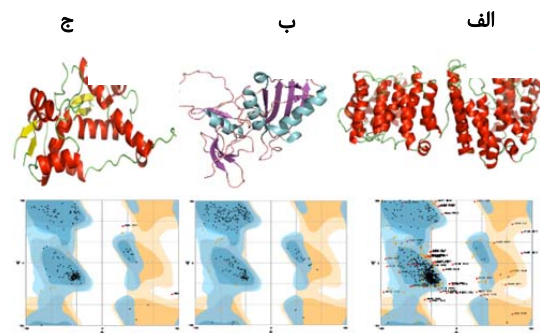
مدل‌سازی ساختاری توالی‌های پروتئینی و سازه‌های ایمونوتوکسینی

تعیین ساختار سه‌بعدی توالی‌های پروتئینی مورد نیاز شامل آنتی‌ژن‌ها و نیز قطعات تشکیل‌دهنده ایمونوتوکسین با روش همولوژی مدلینگ براساس برنامه Swiss-Model [32] و با استفاده از بانک اطلاعات ساختارهای پروتئینی RCSB صورت پذیرفت. از سویی، نسخه ۵/۱ برنامه تحت شبکه I-TASSER به‌منظور مدل‌سازی ساختارهای پروتئینی که به لحاظ هم‌پوشانی از سطح خوبی برخوردار نبودند، استفاده شد [33]. علاوه بر این، مدل‌سازی و سرهم‌بندی سازه‌های ایمونوتوکسینی با نسخه 9.15 برنامه Modeller [34] انجام شد. به این منظور در ابتدا قطعات تشکیل‌دهنده ساختار ایمونوتوکسین به واسطه لینکر انتخابی به یکدیگر متصل شدند. سپس مدل‌های ساختاری قطعات تشکیل‌دهنده ایمونوتوکسین به فایل alignment.seg انتقال و صحت عمل با بازخوانی توالی هر ساختار در نرم‌افزار پایمول صورت پذیرفت. در نهایت براساس دستور برنامه در مسیر مدل‌سازی ساختاری، ۱۰ ساختار مرتبط با هر سازه ایمونوتوکسینی آماده و مورد

مارپیچ‌های آلفا کیفیت مطلوبی را در نقشه رامچاندن با ۹۲/۷٪ نشان داده است، به‌طوری که تنها ۷/۳٪ اسیدهای آمینه آن خارج از محیط مجاز قرار گرفته‌اند. در همین راستا کیفیت ساختاری آنتی‌ژن‌های EPCAM و MAGE4 به‌ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۹/۹٪ در ناحیه مجاز تعیین شد.



نمودار (۱) بررسی مقایسه‌ای میزان بیان آنتی‌ژن‌های انتخابی در سطح سلول‌های سرطانی تخمدان در سطح معنی‌داری ۰/۰۵.



شکل (۱) ساختار سه‌بعدی و کیفیت آنتی‌ژن‌های MSLN (الف)، MAGE4 (ب)، EPCAM (پ)

موقعیت توپولوژیکی آنتی‌ژن‌های انتخابی

تعیین موقعیت قرارگیری آنتی‌ژن‌های مرتبط با سلول‌های سرطانی تخمدان در غشای سلولی منجر به آشکارسازی موقعیت اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده آنتی‌ژن نسبت به غشای سلولی شد (جدول ۱). همان‌طور که در این جدول مشخص شده است، آنتی‌ژن MAGE4 موقعیت درون‌سلولی را نمایش داده است که در مواقع

سرطانی‌شدن سلول قطعاتی از آن در سطح سلول سرطانی ظاهر می‌شوند. با این وجود، آنتی‌ژن‌های EPCAM، MSLN دارای یک ناحیه گذرنده از غشا به‌ترتیب در موقعیت ۲۸۸-۲۶۶ و ۳۱-۹ از طول خود هستند.

جدول (۱) موقعیت غشایی آنتی‌ژن‌های مرتبط با سلول‌های سرطانی تخمدان

آنتی‌ژن	طول (اسیدآمینه)	خارج سلولی	غشای پلاسمایی	سیتوپلاسم
MAGE4	۳۱۷	۲۸۶-۲۹۴	-	-
EPCAM	۳۱۴	۲۴-۲۶۵	۲۶۶-۲۸۸	۲۸۹-۳۱۴
MSLN	۶۳۰	۱-۸	۹-۳۱	۳۲-۶۳۰

واکاو و مدل‌سازی لیگندهای قابل اتصال به آنتی‌ژن‌های انتخابی

پایش مولکول‌های قابل اتصال به آنتی‌ژن‌های انتخابی منجر به آشکارسازی طیف گسترده‌ای از مولکول‌های پروتئینی با قابلیت اتصال به آنتی‌ژن‌های MAGE4، EPCAM و MSLN با امتیازهای متفاوت و در نواحی مختلف سلولی شدند، که از این میان ۱۰ مولکول قابل اتصال به هر یک از این آنتی‌ژن‌ها با امتیاز بالا انتخاب و در جدول ۲ نمایش داده شده است. در این میان، ارزیابی شاخص‌های کلیدی در انتخاب لیگاند شامل طول، موقعیت، امتیاز، میل اتصال، و نیز تغییرات بعد از ترجمه گلیکوزیلاسیون و فسفریلاسیون محدود لیگاند، منجر به انتخاب لیگندهای TRIM69 و CLDN7 با قابلیت اتصال اختصاصی به‌ترتیب بر علیه MAGE4 و EPCAM شد که در ادامه مدل ساختاری آنها با کیفیت مطلوب تعیین شد (شکل ۲).

سرمه‌بندی دمین‌های تشکیل‌دهنده ایمونوتوکسین موثر بر سرطان تخمدان

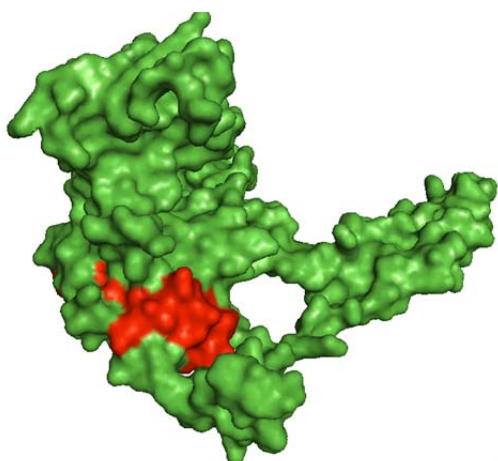
اتصال دمین توکسینی مشتق از کورینه باکتریوم دیفتری به لیگاند انتخابی trim69 با استفاده از لینکر ۳ (GGGGS) در ۵ حالت مختلف منجر به ایجاد ۵۰ سازه نو ترکیب با کیفیت و ساختار متفاوت شد که در این میان بهترین آنها پس از ارزیابی کیفیت (جدول ۳)، تحت شبیه‌سازی در شرایط شبه‌فیزیولوژیک قرار گرفتند (شکل ۳-الف). همان‌طور که در این شکل نمایش داده شده است، و در جدول ۳ ویژگی‌های کیفیتی هر سازه پس از شبیه‌سازی تعیین شده است، در میان ۵ سازه طراحی‌شده سازه شماره ۴ (شکل ۳-ب) بهترین کیفیت از دیدگاه ساختاری را دارد. در همین راستا، کیفیت این سازه براساس نمودار Rg تایید شد (شکل ۳-پ).

جدول (۲) لیگندهای مولکولی قابل اتصال به آنتی‌ژن‌های MAGE4، EPCAM و MSLN

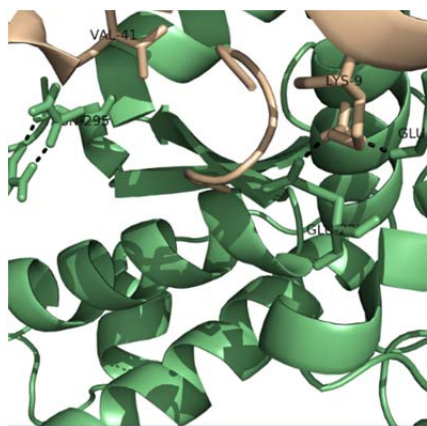
MSLN			EPCAM			MAGE4		
نام لیگاند	موقعیت	امتیاز	نام لیگاند	موقعیت	امتیاز	نام لیگاند	موقعیت	امتیاز
PSMD10	درون‌سلولی	۰/۹۶۰	CLDN7	خارج سلولی	۰/۹۶۷	MUC16	خارج سلولی	۰/۹۷۷
TRIM69	خارج سلولی	۰/۸۸۷	GNPMB	خارج سلولی	۰/۹۱۰	NDUFB5	خارج سلولی	۰/۹۴۸
UQCRB	درون‌سلولی	۰/۷۸۷	TP53	درون‌سلولی	۰/۹۰۸	ZBTB43	درون‌سلولی	۰/۹۳۴
CTAG1B	خارج سلولی	۰/۷۴۹	MYC	درون‌سلولی	۰/۸۸۹	RALA	خارج سلولی	۰/۹۱۴
EID3	درون‌سلولی	۰/۷۱۸	TSPAN8	خارج سلولی	۰/۸۷۸	NDUFB9	درون‌سلولی	۰/۹۰۶
NSMCE4A	هسته	۰/۷۰۰	CCND1	داخل سلولی	۰/۸۷۳	RNMTL1	درون‌سلولی	۰/۹۰۲
NSMCE1	سیتوپلاسمی	۰/۶۸۲	NFKB1	خارج سلولی	۰/۸۳۲	LAMTOR3	درون‌سلولی	۰/۸۹۷
UBC	سیتوپلاسمی	۰/۶۲۰	CDH1	خارج سلولی	۰/۷۳۸	WNT5A	خارج سلولی	۰/۸۳۶
MSX1	هسته	۰/۵۹۷	PTPRC	خارج سلولی	۰/۷۳۰	WFDC2	خارج سلولی	۰/۷۲۰
MSX2	هسته	۰/۵۹۷	PROM1	خارج سلولی	۰/۷۳۰	MPV17	درون‌سلولی	۰/۶۵۵

ارزیابی عملکرد سازه ایمونوتوکسینی S4

ارزیابی عملکرد سازه ایمونوتوکسینی S4 براساس وجود اپی‌توپ‌های تحریک‌کننده پاسخ ایمنی و میل اتصال سازه به آنتی‌ژن هدف صورت پذیرفت. همان‌طور که در شکل ۴ نمایش داده شده، در این سازه یک ناحیه اپی‌توپ به طول ۱۹ آمینواسید در موقعیت ۲۳۱-۲۱۲ قرار گرفته است. از سویی دیگر براساس اتصالات نمایش داده شده در شکل ۴-ب، این سازه میل اتصال مناسبی به آنتی‌ژن هدف نسبت به کنترل منفی دارد، به‌طوری که سطح انرژی حاصل از اتصال داروی طراحی‌شده با آنتی‌ژن MAGE4 بزرگی ۲۶/۵- کیلوژول را آشکار نمود.



الف



ب

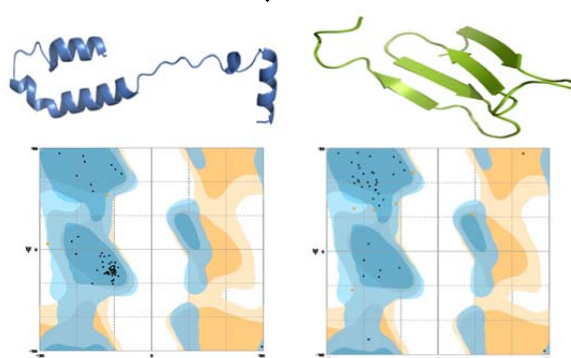
شکل ۴) ارزیابی عملکرد سازه ایمونوتوکسینی S4: (الف) موقعیت اپی‌توپ در ساختار سه‌بعدی ایمونوتوکسین، (ب) میل اتصال سازه ایمونوتوکسینی S4 با آنتی‌ژن MAGE4

بحث

شیوع گسترده بیماری‌های سرطانی و ناکارآمدی روش‌های رایج مانند جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی منجر به توسعه داروها و راهکارهای نوین درمانی شده است که از جمله آنها می‌توان به ایمونوتوکسین‌ها اشاره نمود [44]. این نوع از داروها، پروتئین‌هایی هستند که با هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی از آسیب به بافت‌های سالم بدن تا حد زیادی جلوگیری می‌کند [45]. در این راستا، می‌توان به حضور منوکلونال آنتی‌بادی‌هایی نظیر ترازتوزوماب و پرتازوماب با قابلیت اتصال اختصاصی به HER2 در درمان سرطان پستان اشاره نمود [46, 47]. با این وجود، این نوع از داروها نیز عوارض جانبی متعددی دارند و در برخی موارد مقاومت دارویی را به دنبال داشته‌اند [48]. بنابراین توسعه این نوع از داروها

الف

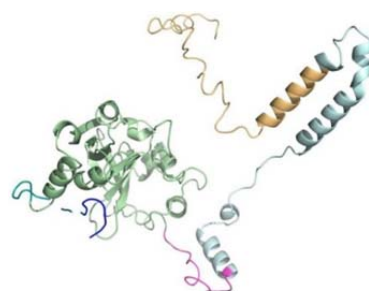
ب



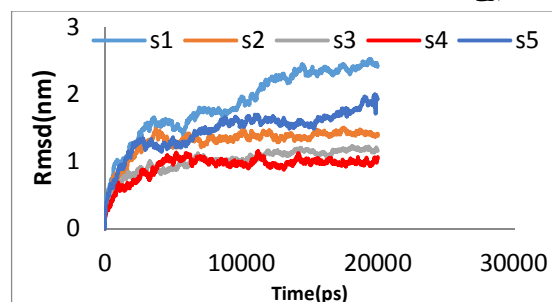
شکل ۲) ساختار سه‌بعدی و کیفیت لیگندهای TRIM69 (الف) و CLDN7 (ب)

جدول ۳) بررسی مقایسه‌ای کیفیت بهترین سازه‌های مدل‌شده براساس شاخص‌های پایداری پروتئین قبل و بعد از شبیه‌سازی (R:RAMPAGE, V:Verify, E:ERRAT)

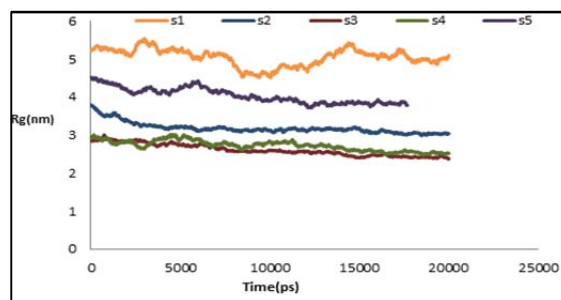
سازه	قبل از شبیه‌سازی			بعد از شبیه‌سازی		
	V	E	R	V	E	R
S1	۴۵/۳۰	۷۶/۹۹۵	۱۰۰	۳۶/۵۹	۶۹/۲۱۶	۹۰/۹
S2	۶۱/۷۲	۵۵/۱۵۹	۹۷	۴۲/۹۷	۶۲/۱۴۶	۸۶/۶
S3	۷۵/۴۴	-	۹۷/۷	۶۱/۲۷	۷۳/۱۱۱	۹۷/۲
S4	۷۴/۴۷	۶۶/۶۶	۹۸/۱	۶۶/۶۳	۷۶/۱۶۷	۹۷/۵
S5	۵۹/۹۳	-	۹۸/۱	۳۷/۸۰	۶۶/۹۲۰	۸۹



الف



ب



پ

شکل ۳) مدل کارتونی بهترین سازه طراحی‌شده ایمونوتوکسینی موثر بر بدخیمی‌های تخمدان از دیدگاه پایداری ساختاری در شرایط شبه‌فیزیولوژیک (الف)، کیفیت سازه شبیه‌سازی شده مبتنی بر نمودار RMSD (ب)، و شعاع ژیراسیون (پ)

و برش پذیر تقسیم می‌شوند^[64]. در این میان، لینکر مورد استفاده در این تحقیق از نوع انعطاف پذیر بوده است که ویژگی‌هایی همچون افزایش پایداری و فولدینگ مطلوب را به دنبال دارد^[64]. نتایج حاصل از سرهم‌بندی منجر به دستیابی ۵۰ مدل، با کیفیت مطلوب ساختاری و عملکردی در ارتباط با سازه ایمونوتوکسینی S4 شد (شکل‌های ۳ و ۴). سرهم‌بندی قطعات تشکیل دهنده دارو در این تحقیق با استفاده از روش همولوژی مدلینگ و با استفاده از نرم‌افزار مدلر صورت پذیرفت^[34]، از سویی دیگر ارزیابی ساختار مدل‌های تولید شده با آزمون‌های ERRAT و RAMPAG انجام شد (شکل ۲). هم‌راستا با این تحقیق، مدل‌سازی در ارتباط با طیف گسترده‌ای از پروتئین‌ها نظیر GVIA iPLA2 از سال ۱۹۹۳ با استفاده از این نوع نرم‌افزارها در محیط مجازی صورت پذیرفته است^[65-67]. همچنین ارزیابی کیفیت مدل‌های پروتئینی ساخته شده با روش‌هایی مشابه در ارتباط با بسیاری از پروتئین‌ها از جمله آنتی‌ژن GPA33^[36, 68]، TRIM69^[69] و پروتئین SG2NA^[70] مبین تطابق داده‌های محاسباتی با آزمایشگاهی است که در این تحقیق مورد کاربرد بود. با وجود تایید کیفیت ساختار سازه‌های مدل شده، همان‌طوری که در شکل ۳ نمایش داده شده است در این تحقیق پایداری سازه S4 در شرایط شبه‌واقعی با آزمون گرومکس صورت پذیرفت. این برنامه که براساس حرکت فیزیکی اتم‌ها و مولکول‌ها پایه‌گذاری شده است، نوعی شبیه‌سازی است که در آن اتم‌ها و مولکول‌های یک پروتئین در یک دوره زمانی ثابت براساس حرکت ذرات به تعامل رسیده و کیفیت آن قابل ارزیابی است^[71]. در این راستا، برای اولین بار شبیه‌سازی پروتئینی در سال ۱۹۹۷ در ارتباط با مهارکننده‌های تربپسین پانکراس گاو انجام شد^[72] و تاکنون در مواردی گوناگون از جمله شبیه‌سازی ایزوفرم‌های پروتئین SG2NA در راستای این تحقیق هستند^[70]،^[73]. علاوه بر این، همان‌طوری که مطرح شد داروی طراحی شده از دیدگاه عملکردی کیفیت مطلوبی را نشان داده است که این مهم در ارتباط با میل اتصالی به آنتی‌ژن هدف و ایمونژنستی آن برآورد شده است (شکل ۴). در همین راستا، می‌توان به تحقیقات بسیار گسترده‌ای در ارتباط با تطابق میل اتصالی و عملکرد مطلوب فرآیند اشاره نمود. به عنوان مثال میل اتصالی پروتئین‌های ASMT-B22^[74] و GPR17 با گیرنده‌ای به نام P2Y در گزارش‌هایی مبین صحت عملکرد است^[75, 76]. از سوی دیگر، همان‌طوری که مطرح شد تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی توسط این سازه در محیط مجازی با حضور اپی‌توپ‌های ایمینوژن همراه است، با این وجود این اپی‌توپ‌ها در محدود دومین توکسینی استقرار یافته است. در این راستا می‌توان به هم‌راستایی این تحقیقات با گزارش‌های مرتبط با توسعه آنتی‌بادی^[77]، منوکلونال آنتی‌بادی ZEBOV^[78] و ایموگلوبولین McPC603 و استفاده محققان از برنامه IEDB اشاره نمود. بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق در ارتباط با قابلیت ایمونژنستی قابل استنباط است. به‌طور کلی، نتایج حاصل از این تحقیق منجر به معرفی آنتی‌ژن‌هایی با قابلیت بیان بالا در سطح سلول‌های سرطانی به عنوان شاخص در تشخیص و هدفی در توسعه داروهای ایمونوتوکسینی برای درمان شد. در همین راستا در این تحقیق ایمونوتوکسینی با قابلیت عملکردی مطلوب برای درمان سرطان تخمدان در شرایط محاسباتی توسعه یافت که باید در شرایط آزمایشگاهی مورد آزمون قرار گیرد.

محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم شبیه‌سازی واکنش‌های اتصالی و نیز شبیه‌سازی غشا بوده است، بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده شبیه‌سازی آنتی‌ژن در غشا صورت گیرد.

براساس واکاوی آنتی‌ژن و لیگاند‌های نوین می‌تواند راهکاری امیدبخش در توسعه دارو باشد، که در این تحقیق در ارتباط با سرطان تخمدان در دستور کار قرار گرفت. در این راستا، تاکنون ایمونوتوکسین‌هایی نظیر OVB3-PE^[5]، DT388-GM-CSF^[49]، anti-Tac(Fv)-PE38^[50] و RFB4(dsFv)-PE38^[51] بر علیه سرطان تخمدان توسعه یافته و به فازهای درمانی نیز رسیده‌اند. با این وجود، نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند منجر به طراحی ایمونوتوکسین‌هایی نوین در این حوزه باشد. نتایج حاصل از این تحقیق در گام اول ۲۹ آنتی‌ژن با قابلیت بیان در سطح سلول‌های سرطانی تخمدان را آشکار نمود، که از میان آنها CA125 بیشترین بیان را نشان داد (نمودار ۱). CA125 که با نام MUC16 نیز نامیده می‌شود، یکی از اعضای خانواده گلیکوپروتئینی مورین است که امروزه به عنوان شاخص سرطانی شدن سلول‌ها مطرح است^[52]. در همین راستا، مدل‌سازی و ارزیابی موقعیت سلولی آنتی‌ژن‌های مرتبط با بیشترین بیان منجر به انتخاب EPCAM، MSLN و EPCAM با بیان و مدل ساختاری مناسب در سطح سلول‌های سرطانی تخمدان شد (شکل ۱). در این میان، MAGE4 موقعیت درون‌سلولی را نمایش داد (جدول ۱)، که در مواقع سرطانی شدن در سطح سلول ظاهر می‌شوند. خانواده آنتی‌ژنی MAGE4، نقش مهمی در رشد و توسعه تومور و تحول جنینی یا مراحل پیشرفته تومور بازی می‌کنند^[53]؛ و درواقع از این آنتی‌ژن‌ها به عنوان شاخص‌های پیش‌آگاهی و پیش‌بینی سرطان‌هایی از جمله سرطان پستان و غیره استفاده می‌شود^[54]. در همین راستا، موقعیت این آنتی‌ژن‌های براساس تحقیقات، درون‌سلولی بوده که به وسیله MHC رده یک یا همان HLA هنگام سرطانی شدن سلول در سطح ظاهر می‌شوند^[55]. علاوه بر این، واکاوی و مدل‌سازی لیگاند‌های قابل اتصال به آنتی‌ژن‌های انتخابی منجر به آشکارسازی طیف گسترده‌ای از مولکول‌های پروتئینی با قابلیت اتصال شد (جدول ۲)، که از این میان TRIM69 و CLDN7 با قابلیت اتصال اختصاصی و شاخص‌های مطلوب عملکردی به ترتیب بر علیه MAGE4 و EPCAM انتخاب و TRIM69 مدل‌سازی شد (شکل ۲). Tripartite motif containing 69 که به اختصار TRIM69 نامیده می‌شود، پروتئینی هست با قابلیت عملکردی در بسیاری از فرآیندهای زیستی نظیر ایمنی ذاتی، عفونت‌های ویروسی، سرطان‌های پیشرفته و مرگ سلولی^[56-58]، که دومینی با قابلیت اتصال اختصاصی به MAGE4 دارد. پس از آشکارسازی دمین اتصالی به آنتی‌ژن هدف، سرهم‌بندی آن با دمین مرگ توکسین دیفتری با استفاده از لینکر ۳ (GGGGS) منجر به ایجاد مدل‌های مختلف شد (جدول ۳). همان‌گونه که مطرح شد، داروهای ایمونوتوکسینی فیوژن پروتئین‌هایی هستند که از ترکیب بخش سیتوتوکسیک با لیگاند‌های اختصاصی مرتبط با آنتی‌ژن‌های ویژه سلول‌های سرطانی حاصل آمده‌اند. امروزه در ساختار این نوع از داروها توکسین‌های مختلف باکتریایی و غیرباکتریایی استفاده شده است که از مهم‌ترین آنها می‌توان به توکسین دیفتری^[59]، اگریتوکسین A سودوموناس^[60] و رپسین^[61] اشاره نمود. با این وجود، در طراحی این نوع از داروها گستره بسیار زیادی از توکسین‌ها به کار رفته‌اند، در همین راستا در این تحقیق توکسین دیفتری با توجه به کاربرد گسترده آن در طراحی داروهای ایمونوتوکسینی از جمله ONTAK^[62]، DT388-GM-CSF^[63] مورد استفاده قرار گرفت. از سوی دیگر، لینکر مورد استفاده در این تحقیق ۳ (GGGGS) است. به‌طور کلی لینکرهای مورد استفاده در فیوژن پروتئین‌ها به سه دسته انعطاف‌پذیر، سخت

- https://patents.google.com/patent/EP2730289A1/en
- 12- Khatib F, Di Maio F, Foldit Contenders Group, Foldit Void Crushers Group, Cooper S, Kazmierczyk M, et al. Crystal structure of a monomeric retroviral protease solved by protein folding game players. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(10):1175-7.
- 13- Chiti F, Dobson CM. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol*. 2009;5(1):15-22.
- 14- Akterian SG, Fernandez PS, Hendrickx ME, Tobback PP, Periago PM, Martinez A. Risk analysis of the thermal sterilization process, analysis of factors affecting the thermal resistance of microorganisms. *Int J Food Microbiol*. 1999;47(1-2):51-7.
- 15- Huang JS, Huang SS, Kennedy B, Deuel TF. Platelet-derived growth factor, specific binding to target cells. *J Biol Chem*. 1982;257(14):8130-6.
- 16- Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*. 1965;122(3):467-81.
- 17- Moniaux N, Andrianifahanana M, Brand RE, Batra SK. Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging malignancy. *Br J Cancer*. 2004;91(9):1633-8.
- 18- Bendifallah N, Rasmussen FW, Zachar V, Ebbesen P, Nielsen PE, Koppelhus U. Evaluation of Cell-Penetrating Peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense Peptide Nucleic Acid (PNA). *Bioconjug Chem*. 2006;17(3):750-8.
- 19- Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*. 2003;21(3):255-61.
- 20- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171(4):603-14.
- 21- Cunningham-Rundles S, Mc Neeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(6):1119-28.
- 22- Kitov PI, Shimizu H, Homans SW, Bundle DR. Optimization of tether length in nonglycosidically linked bivalent ligands that target sites 2 and 1 of a Shiga-like toxin. *J Am Chem Soc*. 2003;125(11):3284-94.
- 23- Powell MF, Stewart T, Otvos L Jr, Urge L, Gaeta FC, Sette A, et al. Peptide stability in drug development. II, effect of single amino acid substitution and glycosylation on peptide reactivity in human serum. *Pharm Res*. 1993;10(9):1268-73.
- 24- Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(12):751-60.
- 25- Chaudhary K, Kumar R, Singh S, Tuknait A, Gautam A, Mathur D, et al. A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. *Sci Rep*. 2016;6:22843.
- 26- Meier A, Söding J. Automatic prediction of protein 3D structures by probabilistic multi-template homology modeling. *PLoS Comput Biol*. 2015;11(10):e1004343.
- 27- Heinz DW, Baase WA, Dahlquist FW, Matthews BW. How amino-acid insertions are allowed in an alpha-helix of T4 lysozyme. *Nature*. 1993;361(6412):561-4.
- 28- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
- 29- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: Protein-

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق منجر به معرفی آنتی‌ژن MAGE4 به‌عنوان نامزدی مناسب در اهداف داروهای ایمونوتوکسینی موثر علیه سرطان تخمدان و طراحی ایمونوتوکسینی موثر بر این آنتی‌ژن در شرایط شبه‌واقعی شد. با این وجود عملکرد سازه ایمونوتوکسینی طراحی‌شده بایستی در شرایط آزمایشگاهی مورد سنجش قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از مجموعه پژوهشی زیست‌اقتصاد خیام برای فراهم‌آوردن امکانات محاسباتی و فضای پژوهشی به‌منظور انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: راضیه صباغ (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ علی‌اکبر حداد مشه‌ریزه (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۶۰٪)؛ سمانه دولت‌آبادی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: منابع مالی اجرای این طرح از بخش محاسبات مولکولی شرکت زیست‌اقتصاد خیام تأمین شده است.

منابع

- Steinfeld AD. Principles and practice of radiation oncology. *Radiology*. 1988;167(3):612.
- Keramati K, Mehranpoor M, Babakhani A, Vaezi GH, Habibi F. Effect of flunixin on ovarian cancer induced by DMBA in female wistar rats. *Knowl Health*. 2012;7(1):44-9. [Persian]
- Wen H, Sun W, Guo Y. Prognosis and prognostic factor analysis epithelial ovarian cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1997;32(3):159-62. [Chinese]
- Heydari M, Robatjazi SM, Zeinoddini M, Darabi E. Optimization of chemically defined cell culture media for recombinant ONTAK immunotoxin production. *Iran J Med Microbiol*. 2014;8(3):51-7. [Persian]
- Pai LH, Bookman MA, Ozols RF, Young RC, Smith JW, Longo DL, et al. Clinical evaluation of intraperitoneal *Pseudomonas* exotoxin immunoconjugate OVB3-PE in patients with ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1991;9(12):2095-103.
- Zhang Y, Pastan I. High shed antigen levels within tumors: An additional barrier to immunoconjugate therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):7981-6.
- Martin A, Gutierrez E, Muglia J, Mc Donald CJ, Guzzo C, Gottlieb A, et al. A multicenter dose-escalation trial with denileukin diftix (ONTAK, DAB(389)IL-2) in patients with severe psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45(6):871-81.
- Beladi Mousavi SS, Hajibabaei Kh, Hamledari A, Tamadon MR, Ardalan MR. Introduction to chemical construction of immunotoxins and their applications in the treatment of diseases. *Immunopathologia Persa*. 2016;2(1):e02.
- Wayne AS, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ, Pastan I. Immunotoxins for leukemia. *Blood*. 2014;123(16):2470-7.
- Pastan I, Hassan R, Fitz Gerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med*. 2007;58:221-37.
- Barth S, Schiffer S. Novel immunoproteases [Internet]. Mountain View: Google Patents; 2013 [cited 2014 May 14]. Available from:

- 2015;13(11):1083-90. [Persian]
- 45- Wang R, Gan C, Gao W, He W, Wang X, Peng Y, et al. A novel recombinant immunotoxin with the smallest ribosome-inactivating protein Luffin P1: T-cell cytotoxicity and prolongation of allograft survival. *J Cell Mol Med*. 2010;14(3):578-86.
- 46- Maloney DG. Immunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma: Monoclonal antibodies and vaccines. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6421-8.
- 47- Chatrchyan S, Khachatryan V, Sirunyan AM, Tumasyan A, Adam W, Bergauer T, et al. Search for the standard model Higgs boson produced in association with a W or a Z boson and decaying to bottom quarks. *Phys Rev D*. 2014;89(1):012003.
- 48- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-54.
- 49- Kreitman RJ, Pastan I. Recombinant toxins containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and either pseudomonas exotoxin or diphtheria toxin kill gastrointestinal cancer and leukemia cells. *Blood*. 1997;90(1):252-9.
- 50- Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, et al. Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2000;18(8):1622-36.
- 51- Kreitman RJ, Squires DR, Stetler-Stevenson M, Noel P, Fitz Gerald DJ, Wilson WH, et al. Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6719-29.
- 52- Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16. *Gene*. 2006;373:28-34.
- 53- De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*. 1994;40(5):360-9.
- 54- Hussein YM, Gharib AF, Etewa RL, El-Shal AS, Abdel-Ghany ME, Elsayy WH. The melanoma-associated antigen-A3, -A4 genes: Relation to the risk and clinicopathological parameters in breast cancer patients. *Mol Cell Biochem*. 2011;351(1-2):261-8.
- 55- Mirandola L, J Cannon M, Cobos E, Bernardini G, Jenkins MR, Kast WM, et al. Cancer testis antigens: Novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. *Int Rev Immunol*. 2011;30(2-3):127-37.
- 56- Mc Nab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(1):46-56.
- 57- Yaguchi H, Okumura F, Takahashi H, Kano T, Kameda H, Uchigashima M, et al. TRIM67 protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuritogenesis. *J Biol Chem*. 2012;287(15):12050-9.
- 58- Han R, Zhao Q, Zong S, Miao S, Song W, Wang L. A novel TRIM family member, Trim69, regulates zebrafish development through p53-mediated apoptosis. *Mol Reprod Dev*. 2016;83(5):442-54.
- 59- Kasauli H. Manual for the production and standardization of Diphtheria-Pertussis-Tetanus Vaccine. India: Central Research Institute; 1989.
- 60- Liu SC, Donahue TM. Mesospheric hydrogen related to exospheric escape mechanisms. *J Atmos Sci*. protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D447-52.
- 30- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 2004;4(6):1633-49.
- 31- Kirk IK, Weinhold N, Belling K, Skakkebæk NE, Jensen TS, Leffers H. Chromosome-wise protein interaction patterns and their impact on functional implications of large-scale genomic aberrations. *Cell Syst*. 2017;4(3):357-64.e3.
- 32- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Web Server issue):W252-8.
- 33- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2015;12(1):7-8.
- 34- Patnaik S, Mohanty M, Bit A, Sahoo L, Das S, Jayasankar P, et al. Molecular characterization of Activin Receptor Type IIA and its expression during gonadal maturation and growth stages in rohu carp. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*. 2017;203:1-10.
- 35- Fisher SJ, Helliwell JR, Khurshid S, Govada L, Redwood C, Squire JM, et al. An investigation into the protonation states of the C1 domain of cardiac myosin-binding protein C. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2008;64(Pt 6):658-64.
- 36- Lovell SC, Davis IW, Bryan Arendall III W, De Bakker PIW, Michael Word J, Prisant MG, et al. Structure validation by α geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. *Proteins*. 2003;50(3):437-50.
- 37- Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci*. 1993;2(9):1511-9.
- 38- Syed R, Rani R, Sabeena, Masoodi TA, Shafi G, Alharbi K. Functional analysis and structure determination of alkaline protease from *Aspergillus flavus*. *Bioinformation*. 2012;8(4):175-80.
- 39- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19-25.
- 40- Yao B, Zhang L, Liang S, Zhang C. SVMTriP: A method to predict antigenic epitopes using support vector machine to integrate tri-peptide similarity and propensity. *PLoS One*. 2012;7(9):e45152.
- 41- Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, et al. How good is automated protein docking?. *Proteins*. 2013;81(12):2159-66.
- 42- Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Web Server issue):W363-7.
- 43- Van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 web server: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *J Mol Biol*. 2016;428(4):720-5.
- 44- Heydari M, Robatjazi SM, Zeinoddini M. Investigation of the complex culture medium composition for improved production of ONTAK immunotoxin by recombinant *Escherichia coli*. *J Rafsanjan Univ Med Sci*.

- 70- Soni S, Tyagi C, Grover A, Goswami SK. Molecular modeling and molecular dynamics simulations based structural analysis of the SG2NA protein variants. *BMC Res Notes*. 2014;7:446.
- 71- Fermi E, Pasta P, Ulam S, Tsingou M. Studies of the nonlinear problems [Internet]. Oak Ridge: OSTI; 1955 [cited 2014 May 14]. Available from: <https://www.osti.gov/biblio/4376203-studies-nonlinear-problems>
- 72- Bakar NAAB, Hashim SZM, Omar MSS. MDSA-an interactive analysis tool for Protein Molecular Dynamic Simulations: Preliminary Study. 2013.
- 73- Mac Kerell AD Jr, Banavali N, Foloppe N. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers*. 2000-2001;56(4):257-65.
- 74- Azam SS, Abbasi SW. Molecular docking studies for the identification of novel melatoninergic inhibitors for acetylserotonin-O-methyltransferase using different docking routines. *Theor Biol Med Model*. 2013;10:63.
- 75- Costanzi S, Mamedova L, Gao ZG, Jacobson KA. Architecture of P2Y nucleotide receptors: Structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling. *J Med Chem*. 2004;47(22):5393-404.
- 76- Ivanov AA, Costanzi S, Jacobson KA. Defining the nucleotide binding sites of P2Y receptors using rhodopsin-based homology modeling. *J Comput Aided Mol Des*. 2006;20(7-8):417-26.
- 77- Olal D, Kuehne AI, Bale S, Halfmann P, Hashiguchi T, Fusco ML, et al. Structure of an antibody in complex with its mucin domain linear epitope that is protective against Ebola virus. *J Virol*. 2012;86(5):2809-16.
- 78- Qiu X, Alimonti JB, Melito PL, Fernando L, Ströher U, Jones SM. Characterization of Zaire ebolavirus glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Clin Immunol*. 2011;141(2):218-27.
- 1974;31(5):1466-70.
- 61- Stirpe F, Battelli MG. Ribosome-inactivating proteins: Progress and problems. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(16):1850-66.
- 62- Dang NH, Pro B, Hagemeister FB, Samaniego F, Jones D, Samuels BI, et al. Phase II trial of denileukin diftitox for relapsed/refractory T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2007;136(3):439-47.
- 63- FitzGerald DJ, Kreitman R, Wilson W, Squires D, Pastan I. Recombinant immunotoxins for treating cancer. *Int J Med Microbiol*. 2004;293(7-8):577-82.
- 64- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, et al. Brucoleri, E. Haber and R. Crea (1988). Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(16):5879-83.
- 65- Koopman SJ, Harvey AC, Doornik JA, Shephard N. STAMP 6.0 structural time series analyzer, modeller and predictor. London: Timberlake Consultants; 2000.
- 66- Skrt M, Benedik E, Podlipnik C, Ulrih NP. Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. *Food Chem*. 2012;135(4):2418-24.
- 67- Mouchlis VD, Bucher D, Mc Cammon JA, Dennis EA. Membranes serve as allosteric activators of phospholipase A2, enabling it to extract, bind, and hydrolyze phospholipid substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(6):E516-25.
- 68- Kazenwadel J, Betterman KL, Chong CE, Stokes PH, Lee YK, Secker GA, et al. GATA2 is required for lymphatic vessel valve development and maintenance. *J Clin Invest*. 2015;125(8):2979-94.
- 69- Jiang MX, Hong X, Liao BB, Shi SZ, Lai XF, Zheng HY, et al. Expression profiling of TRIM protein family in THP1-derived macrophages following TLR stimulation. *Sci Rep*. 2017;7:42781.