Check for updates

Original Article

Journal of Health and Biomedical Informatics
Medical Informatics Research Center
2023; 10(3): 269-293
10.34172/jhbmi.2023.31

Introduction of an Efficient Multiepitopic Vaccine Against Different SARS-CoV-2 Strains: Reverse Vaccinology

Sarvmeili Javad[1], Baghban Kohnehrouz Bahram[2*], Gholizadeh Ashraf[3], Ofoghi Hamideh[4], Shanehbandi Dariush[5]

• **Received:** 6 Jul 2023 • **Accepted:** 25 Nov 2023

Introduction: In recent years, COVID-19 has been recognized as a health threat. Despite vaccination, people still get the disease because the new variants have mutations in their genomes that allow them to bind to host receptors and evade the immune system's responses. Therefore, the main aim of this study was to use bioinformatics tools to introduce a rapid and practical vaccine to fight against these diverse mutations in different SARS-CoV-2 strains.

Method: To epitopes mapping, 32 different spike protein variants were retrieved. We then used the Immune Epitope Database (IEDB), NetCTL, and NetMHCIIpan to predict T and B cell epitopes. The vaccine based on protected epitopes was evaluated in terms of antigenicity, allergenicity, toxicity, solubility, physicochemical properties, population coverage, and secondary structure with relevant servers. Modeling using Robetta and docking with Toll-like receptor (TLR3) were performed using Cluspro, PatchDock, and FireDock, respectively.

Results: After detailed evaluations, all the results confirmed the optimal quality of the vaccine. According to further investigations, this structure is similar to native proteins and there is a stable and strong interaction between the vaccine and the receptor. Based on molecular dynamics simulation, structural compactness and stability in binding were also observed. In addition, the immune simulation showed that the vaccine can stimulate immune responses similar to real conditions. Finally, codon optimization and in silico cloning confirmed efficient expression in *Escherichia coli*.

Conclusion: Based on the obtained results, the designed multi-epitope vaccine can serve as a prophylactic candidate against SARS-CoV-2.

Keywords: Dynamic Simulation, Immunoinformatics, Immune Simulation, Molecular Docking, Multi-epitope Vaccine

• **Citation:** Sarvmeili J, Baghban Kohnehrouz B, Gholizadeh A, Ofoghi H, Shanehbandi D. Introduction of an Efficient Multiepitopic Vaccine Against Different SARS-CoV-2 Strains: Reverse Vaccinology. Journal of Health and Biomedical Informatics 2023; 10(3): 269-93. [In Persian] doi: 10.34172/jhbmi.2023.31

1. PhD Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. PhD in Molecular Biology and Biotechnology, Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. PhD in Biochmistry, Full Professor, Faculty of Natural Sciences and Research Center for Biosciences and Biotechnology (RCBB), University of Tabriz, Tabriz, Iran
4. PhD in Biotechnology, Associate Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
5. PhD in Immunology, Assistant Professor, Department of Immunology, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
***Corresponding Author:** Bahram Baghban Kohnehrouz
Address: Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
• **Tel:** 09144159661 • **Email:** bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

© 2023 The Author(s); Published by Kerman University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cite

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

مقاله پژوهشی

مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی
مرکز تحقیقات انفورماتیک پزشکی
دوره دهم شماره سوم. ص ۲۹۳-۲۶۹، ۱۴۰۲
10.34172/jhbmi.2023.31

معرفی یک واکسن چند اپی‌توپی کارآمد در برابر سویه‌های مختلف SARS-CoV-2: واکسینولوژی معکوس

جواد سرومیلی[۱]، بهرام باغبان کهنه‌روز[۲*]، اشرف قلی‌زاده[۳]، حمیده افقی[۴]، داریوش شانه‌بندی[۵]

• دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۴/۱۵ • پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۹/۴

مقدمه: در سال‌های اخیر، COVID-19 به عنوان تهدیدی در زمینه سلامت شناخته شده است. با وجود واکسیناسیون هنوز هم افراد به این بیماری مبتلا می‌شوند چراکه واریانت‌های به‌روزتر دارای جهش‌هایی در ژنوم خود هستند که در اتصال به گیرنده‌های میزبان و فرار از پاسخ‌های سیستم ایمنی نقش دارند. از این رو مهم‌ترین هدف این مطالعه معرفی یک واکسن سریع و کاربردی به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی برای مقابله با این جهش‌های متنوع در سویه‌های مختلف SARS-CoV-2 است.

روش: به‌منظور نقشه‌برداری اپی‌توپ‌ها، پروتئین اسپایک ۳۲ واریانت مختلف بازیابی شد. سپس از (Immune Epitope Database) IEDB، NetCTL و NetMHCIIpan برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول T و B استفاده شد. واکسن مبتنی بر اپی‌توپ‌های حفاظت‌شده از نظر آنتی‌ژنی، حساسیت‌زایی، سمیت، حلالیت، خواص فیزیکوشیمیایی، پوشش جمعیتی و ساختار ثانویه با سرورهای مربوطه بررسی شدند. مدل‌سازی به کمک Robetta و داکینگ با گیرنده شبه (TLR3) Toll، به ترتیب با استفاده از Cluspro، PatchDock و FireDock انجام شد.

نتایج: پس از ارزیابی‌های دقیق، تمامی نتایج کیفیت مطلوب واکسن را تأیید کردند. طبق بررسی‌های بیشتر این ساختار مشابه پروتئین بومی است و برهمکنشی پایدار و قوی بین واکسن و گیرنده وجود دارد. براساس شبیه‌سازی دینامیک مولکولی فشردگی ساختاری و پایداری در اتصال نیز مشاهد شد. علاوه بر این، شبیه‌سازی ایمنی نشان داد که واکسن می‌تواند پاسخ‌های ایمنی مشابه با شرایط واقعی را تحریک نماید. در نهایت، بهینه‌سازی کدون و شبیه‌سازی in silico بیان کارآمد در *Escherichia coli* را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج به دست آمده واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده می‌تواند به عنوان یک کاندیدای پیشگیری کننده در برابر SARS-CoV-2 عمل نماید.

کلیدواژه‌ها: شبیه‌سازی دینامیکی، ایمونوانفورماتیک، شبیه‌سازی ایمنی، داکینگ مولکولی، واکسن چند اپی‌توپی

ارجاع: سرومیلی جواد، باغبان کهنه‌روز بهرام، قلی‌زاده اشرف، افقی حمیده، شانه‌بندی داریوش. معرفی یک واکسن چند اپی‌توپی کارآمد در برابر سویه‌های مختلف SARS-CoV-2: واکسینولوژی معکوس. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۰(۳): ۹۳-۲۶۹. doi: 10.34172/jhbmi.2023.31

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲. دکتری بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی، دانشیار، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. دکتری بیوشیمی، استاد، دانشکده علوم طبیعی و مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴. دکتری بیوتکنولوژی، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
۵. دکتری ایمونولوژی، استادیار گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

*** نویسنده مسئول:** بهرام باغبان کهنه‌روز
آدرس: ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی
شماره تماس: ۰۹۱۴۴۱۵۹۶۶۱ • **Email:** bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

مقدمه

بیش از ۳ سال از شیوع ویروس SARS-CoV-2 می‌گذرد و اثرات منفی آن بر سلامت ذهنی و روانی بسیاری از افراد به ویژه کادر درمان، رسیدگی به بیماری‌های غیر کووید-۱۹ و همچنین اقتصاد بسیاری از کشورها بر کسی پوشیده نیست [۱]. در مجموع تا آوریل ۲۰۲۳، بیش از ۶۸۸ میلیون نفر به این بیماری مبتلا شده‌اند که از این تعداد بیش از ۶ میلیون نفر در سراسر جهان فوت شده‌اند. همچنین براساس آمارهای ثبت شده، از زمان شروع واکسیناسون بر علیه این بیماری بیش از ۱۳ میلیارد دوز واکسن تزریق شده است [۲]. هرچند به لطف فاصله‌گذاری اجتماعی و عرضه واکسن‌های کارآزمایی شده در بیشتر کشورها، شیوع ویروس به شدت کاهش یافته است، اما با این حال، ظهور چندین واریانت جدید سبب شیوع مجدد، افزایش نگرانی‌ها و یادآوری به جهان برای ادامه تلاش‌ها به منظور یافتن روش‌های پیش‌گیری و درمانی جدیدتر و مؤثرتر شده است [۳].

گلیکوپروتئین اسپایک (S) یک پروتئین ساختاری است که در سطح ویروس SARS-CoV-2 قرار می‌گیرد و ورود ویروس به داخل سلول میزبان را تسهیل می‌کند. طبق گزارش‌ها این پروتئین دارای آنتی‌ژنی و ایمنی‌زایی قابل قبولی است و بر روی آن توالی‌های مشخصی از اسید آمینه‌ها وجود دارند که با گیرنده آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE-2) برای آلوده کردن میزبان انسانی ارتباط برقرار می‌کنند [۴]. اهمیت تریمر S در طول عفونت و بیماری‌زایی، آن را به یک هدف ایده‌آل برای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده (Abs) و طراحی واکسن تبدیل کرده است [۵]. با این حال توالی آن در برخی نواحی به ویژه RBD و NTD مستعد بروز انواع جهش‌ها است. پیش‌بینی می‌شود بیشتر این جهش‌ها یا مضر باشند و به سرعت حذف شوند یا نسبتاً خنثی باشند، بنابراین تعداد کمی از آن‌ها ممکن است عفونت‌زایی، شدت بیماری، تعامل با میزبان، پاسخ سیستم ایمنی و دفاع آنتی‌بادی در زمان انتقال از انسان به انسان و رویدادهای انتشار بین انسان و حیوان را تغییر دهند [۶].

از آنجایی که توالی ژنوم و پروتئوم SARS-CoV-2 به سرعت در دسترس قرار می‌گیرد، واکسن‌هایی که مبتنی بر اپی‌توپ‌های حفاظت‌شده در پاتوژن‌های متغیر یا به سرعت در حال جهش هستند، می‌توانند نقش مهمی در مدیریت این بیماری همه‌گیر داشته باشند [۷]. پیش‌بینی سریع اپی‌توپ‌های ایمنی‌زا بر پیش‌بینی‌های محاسباتی متمرکز است که کاملاً وابسته به الگوریتم‌های پیشرفته و افزایش داده‌های موجود در پایگاه داده اپی‌توپ‌ها است. همزمان با شناخت بیشتر در مورد پاسخ‌های ایمنی میزبان و پیشرفت‌های انجام شده در زمینه ابزارهای ایمونوانفورماتیک، تحولات گسترده‌ای نیز در زمینه طراحی واکسن علیه بیماری‌های نوظهور در شرایط in silico صورت گرفته است [۸]. تاکنون تحقیقات متعددی با هدف استفاده مجدد از داروهای ضدویروسی، تولید داروهای کارآمد و معرفی واکسن‌های به‌روز بر علیه ویروس SARS-CoV-2 در سراسر جهان انجام شده است [۹]. در این مطالعه، رویکرد اصلی ما غربال و شناسایی اپی‌توپ‌های کاملاً مشترک از پروتئین اسپایک واریانت‌های مختلف SARS-CoV-2 و سپس استفاده از روش‌های ایمونوانفورماتیک، مدل‌سازی و شبیه‌سازی برای طراحی یک واکسن چند اپی‌توپی سریع با قابلیت تحریک سیستم ایمنی همراه با پاسخ‌های ایمنی مربوطه است. در واقع هدف این تحقیق معرفی یک واکسن کاندید چند اپی‌توپی حفاظت شده در مقابله با جهش‌های پی در پی سویه‌های مختلف این بیماری است که به دلیل برخورداری از توالی‌های کوتاه (اپی‌توپ‌ها) پاسخ‌های ایمنی مناسبی را فراهم می‌کند و از اضافه بار آنتی‌ژن و پاسخ‌های آلرژیک در میزبان جلوگیری می‌نمایند. همچنین این واکسن در مقایسه با واکسن‌های سنتی این توانایی را دارد که هم پاسخ ایمنی هومورال و هم سلولی را به دلیل وجود هر دو نوع اپی‌توپ سلول‌های T و B ایجاد نماید.

روش

بازیابی توالی پروتئین اسپایک سویه‌های مختلف

توالی‌های پروتئین ساختاری اسپایک ۳۲ سویه مختلف از SARS-CoV-2 که شامل واریانت‌های Wuhan-Hu-1 [۵]، B.1.1.7 (آلفا)، B.1.351 (بتا)، P.1 (گاما)، B.1.617.2 (دلتا)، B.1.1.529 (امیکرون)، BA.1 (امیکرون)، BA.2 (امیکرون)، BA.2.12.1 (امیکرون)، BA.2.75 (امیکرون)، BA.4 (امیکرون)، BA.5 (امیکرون)، BQ.1.1 (امیکرون)، XBB.1.5 (امیکرون)، B.1.1.318، B.1.1.519، B.1.1.523، B.1.214.2، B.1.427 یا B.1.429 (اپسیلون)، B.1.466.2، B.1.525 (اتا)، B.1.526 (یوتا)، B.1.617.1 (کاپا)، B.1.617.3، B.1.619 یا B.1.619.1، B.1.620، B.1.621 (مو)، C.1.2، C.37 (لامبدا)، C.36.3 یا C.36.3.1، P.2 (زتا) و R.1 می‌شوند، از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (National Center for Biotechnology Information; NCBI)، مرکز منابع

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

بیوانفورماتیک باکتریایی و ویروسی (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC ; و ViralZone از Expasy در قالب FASTA بازیابی شدند.

پیش‌بینی و ارزیابی اپی‌توپ‌های سلول T کشنده (CTL)

در این مطالعه، پس از بررسی‌های هم‌ردیفی اولیه، پروتئین اسپایک ویروس Wuhan-Hu-1 به عنوان توالی مرجع برای طراحی اپی‌توپ‌ها به کار گرفته شد. با استفاده از سرورهای NetCTL 1.2 [۱۰] و Immune Epitope Database (IEDB) [۱۱]، اپی‌توپ‌های CTL به طول ۹ باقی‌مانده پیش‌بینی شدند. در سرور NetCTL، ۱۲ سوپرتایپ اصلی A1، A2، A3، A24، A26، B7، B8، B27، B39، B44، B58 و B62 سازگاری بافتی کلاس I (MHC I) که به طور معمول در جمعیت‌های انسانی رخ می‌دهند، در نظر گرفته شد. همچنین در پیش‌بینی اپی‌توپ‌ها با این سرور، برای سه فاکتور کارایی انتقال‌دهنده TAP، برش پروتئازومی C ترمینال و پپتیدهای متصل‌شونده به MHC کلاس I، به ترتیب آستانه‌های پیش‌فرض ۰/۱۵، ۰/۰۵ و ۰/۷۵ تعیین شدند. علاوه بر این مجموعه دیگری از اپی‌توپ‌ها برای تمامی آلل‌های HLA کلاس I توسط سرور IEDB با روش ماتریس تثبیت شده (SMM) شناسایی و پیش‌بینی شدند. اپی‌توپ‌های با رتبه صدک ≤ 2، IC_{50} کمتر از ۲۰۰ nM و رده‌بندی (rank) بالا مورد بررسی قرار گرفتند و به عنوان متصل شونده‌های قوی در نظر گرفته شدند. براساس نتایج به دست آمده از هر دو سرور NetCTL 1.2 و IEDB، اپی‌توپ‌های مشترکی که توسط چندین آلل پیش‌بینی شدند و از نظر شاخص‌های مورد نظر مطلوب بودند، برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شدند. آنتی‌ژن بودن این اپی‌توپ‌ها از طریق سرور VaxiJen مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۲]. علاوه بر این، پیش‌بینی ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های CTL با استفاده از منابع آنالیز IEDB انجام شد. این ابزار ایمنی‌زایی را به صورت مقادیر مثبت و منفی نشان می‌دهد که در واقع اپی‌توپ‌های ایمنی‌زا مثبت هستند و برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند [۱۳]. همچنین سرورهای AllerTOP 2.0 [۱۴] و Toxinpred [۱۵] نیز به ترتیب برای تعیین حساسیت‌زایی و سمیت اپی‌توپ‌های ایمنی‌زا مورد استفاده قرار گرفتند.

پیش‌بینی و ارزیابی اپی‌توپ‌های سلول T کمک کننده (HTL)

از طرفی اپی‌توپ‌های HTL نیز به طول ۱۵ باقی‌مانده توسط سرورهای Net MHC II pan 3.2 و IEDB برای آلل‌های HLA کلاس II انسانی که شامل آلل‌های مختلف HLA-DR، HLA-DP و HLA-DQ می‌شوند، پیش‌بینی شدند [۱۶]. در Net MHC II اپی‌توپ‌ها براساس درجه‌بندی صدک تعیین شده که به ترتیب ۲، ۱۰ و بیشتر از ۱۰٪ هستند، به عنوان قوی، متوسط و غیرچسبنده طبقه‌بندی شدند. همچنین در سرور IEDB از روش SMM-align (NetMHCII 1.1) برای پیش‌بینی این گروه از اپی‌توپ‌ها استفاده شد [۱۱]. در این مطالعه، اپی‌توپ‌هایی که IC_{50} کمتر از ۲۰۰ nM و رتبه صدک ≤ 2 داشتند و توسط چندین آلل به وسیله هر دو روش پیش‌بینی شده بودند، به عنوان متصل شونده‌های قوی در نظر گرفته شده و برای تجزیه و تحلیل بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین با استفاده از سرورهای IFNepitope، IL4pred [۱۷] و IL10pred [۱۸]، اپی‌توپ‌های HTL که به‌طور خاص القاکننده‌ی اینترفرون (IFN)، اینترلوکین-۴ (IL-4) و اینترلوکین-۱۰ (IL-10) هستند، ارزیابی شدند. از سرور VaxiJen برای محاسبه میزان آنتی‌ژنی اپی‌توپ‌ها استفاده شد [۱۲]. اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی که غیر سمی و غیر حساسیت‌زا بودند نیز توسط سرورهای ToxinPred و AllerTOP 2.0 انتخاب شدند [۱۹].

پیش‌بینی و ارزیابی اپی‌توپ‌های سلول B خطی (LBL)

از دو سرور BCPreds [۲۰] و BepiPred [۲۱] برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B خطی یا پیوسته (LBL) استفاده شد. پس از بررسی و مقایسه همه اپی‌توپ‌های پیش‌بینی‌شده توسط این سرورها، اپی‌توپ‌های مشترک و همپوشان انتخاب شدند. آنتی‌ژنی اپی‌توپ‌های LBL احتمالی با استفاده از سرور VaxiJen ارزیابی شد و سپس حساسیت‌زایی و سمیت اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی با استفاده از سرور AllerTOP 2.0 و ToxinPred مورد بررسی قرار گرفت [۱۹].

هم‌ردیفی چندگانه و انتخاب اپی‌توپ‌های کاملاً حفاظت شده

پس از هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های پروتئین اسپایک سویه‌های مختلف به منظور تعیین محل تغییرات صورت گرفته از قبیل حذف، اضافه و جایگزینی با استفاده از ClustalW [۲۲] ارائه شده توسط نرم‌افزار MEGA X [۲۳]، اپی‌توپ‌های CTL، HTL و LBL پیش‌بینی شده با نتیجه این هم‌ترازی منطبق شدند. در نهایت اپی‌توپ‌هایی که در تمامی سویه‌ها بدون تغییر بودند به عنوان اپی‌توپ‌های کاملاً حفاظت شده برای قرار

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

گرفتن در ساختار نهایی واکسن انتخاب شدند [۲۴].

پیش‌بینی پوشش جمعیتی، محاسبه حفاظت‌شدگی اپی‌توپ‌ها و شناسایی خود ایمنی

از آن‌جایی که SARS-CoV-2 یک بیماری همه‌گیر جهانی است، بایستی پوشش جمعیتی اپی‌توپ‌های CTL و HTL انتخاب شده در واکسن طراحی شده به صورت جداگانه و ترکیبی مورد مطالعه قرار گیرد که این امر با ابزار پوشش جمعیت IEDB برای مناطق مختلف جهان بررسی شد [۲۵]. از طرفی دیگر، ارزیابی حفاظت‌شدگی هر اپی‌توپ نیز توسط منبع تجزیه و تحلیل IEDB انجام گرفت [۲۶]. علاوه بر این، با انجام BLASTp علیه پروتئوم انسانی برای پایگاه داده Uniprot، وجود شباهت بین اپی‌توپ‌های انتخاب شده با پروتئین‌ها و احتمال خودایمنی، ارزیابی شد. به طوری که هر اپی‌توپ از واکسن که دارای همسانی برابر یا بالاتر از ۳۵ درصد بود، به عنوان پروتئین همولوگ با پروتئوم انسانی در نظر گرفته شده و حذف گردید [۲۷].

طراحی واکسن چند اپی‌توپی

در این مطالعه برای یافتن اپی‌توپ‌های مناسب از میان اپی‌توپ‌های متعدد پیش‌بینی شده جهت معرفی واکسن، یک روش همپوشانی برای جلوگیری از انتخاب اپی‌توپ‌های تکراری تعیین شد. همچنین اپی‌توپ‌های مورد استفاده برای ساخت واکسن براساس معیارهایی مانند آنتی‌ژن بودن، غیرسمی بودن، عدم حساسیت‌زایی، خاصیت القای سیتوکین (فقط برای اپی‌توپ‌های HTL)، استقرار در سطح پروتئین هدف (در مورد اپی‌توپ‌های سلول B)، حفاظت‌شدگی، برهمکنش آللی زیاد، پوشش جمعیتی بالا و عدم همپوشانی با ژن‌های انسانی برای قرار گرفتن در ترکیب نهایی واکسن انتخاب شدند [۲۸]. سازه حاصل متشکل از ۳۹۸ باقی‌مانده اسید آمینه است که شامل ۷ اپی‌توپ CTL، ۵ اپی‌توپ HTL، ۲ اپی‌توپ القاکننده سیتوکین‌ها (IFN-γ، IL-4 و IL-10)، ۷ اپی‌توپ LBL و اپی‌توپ عمومی PADRE (Pan HLA-DR reactive epitope) می‌شود. در ساختار این واکسن کاندید، اپی‌توپ‌های CTL به واسطه لینکر AAY (Ala-Ala-Tyr)، اپی‌توپ‌های HTL از طریق لینکر GPGPG (-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly) و اپی‌توپ‌های LBL با لینکرهای KK (Lys-Lys) به هم متصل شدند [۲۹]. همچنین لینکر HEYGAEALERAG برای اتصال دو گروه اپی‌توپی CTL و HTL به کار گرفته شد. برای تقویت پاسخ ایمنی نیز ادجوانت β-defensin [۳۰] به واسطه لینکر EAAAK، در N ترمینال سازه واکسن قرار گرفت. علاوه بر این اپی‌توپ PADRE هنگامی که با این ادجوانت همراه می‌شود، پاسخ مؤثری ارائه می‌دهد [۳۱]. در نهایت H5E (HEHEHEHEH) به عنوان برچسب با لینکر RVRR به C ترمینال ساختار واکسن اضافه شد.

پیش‌بینی آنتی‌ژنی، حساسیت‌زایی، سمیت و خواص فیزیکوشیمیایی سازه واکسن

سرورهای VaxiJen 2.0 با مقدار آستانه ۰/۴ در دسته ویروسی [۱۲] و ANTIGENpro [۳۲] با آستانه بالاتر از ۰/۸ برای پیش‌بینی آنتی‌ژنی ساختار نهایی واکسن به کار گرفته شدند. برای بررسی حساسیت‌زایی نیز از دو سرور AllergenFP 1.0 [۱۴] و AllerTOP 2.0 [۳۳] استفاده شد. همچنین ابزار آنلاین ToxinPred برای ارزیابی سمی بودن یا نبودن واکسن طراحی شده مورد استفاده قرار گرفت [۱۵]. از طرفی برای درک ماهیت اساسی ساختار واکسن، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن با استفاده از سرور ProtParam پیش‌بینی شدند [۳۴]. علاوه بر این، حلالیت توسط دو سرور Protein-sol [۳۵] و SolPro [۳۶] ارزیابی شد. وجود مارپیچ‌های غشایی و پپتیدهای سیگنال در ساختار واکسن نیز به ترتیب توسط سرور TMHMM v2.0 [۳۷] و SignalP4.1 [۳۸] مورد بررسی قرار گرفت.

پیش‌بینی ساختار ثانویه

برای ارزیابی ساختار ثانویه توالی واکسن چند اپی‌توپی از سرورهای PSIPRED v4.0 (PSI-blast based secondary structure prediction) [۳۹] و SOPMA (Self-Optimized Prediction Method with Alignment) [۴۰] با پارامترهای پیش‌فرض استفاده شد. در SOPMA پس از وارد کردن توالی واکسن، پارامترهای عرض خروجی، تعداد حالت‌های فضایی، آستانه تشابه و عرض پنجره به ترتیب بر روی مقادیر ۷۰، ۴ (Helix، β-sheet، turn و coil)، ۸ و ۱۷ تنظیم شدند.

مدل‌سازی، پالایش و اعتبارسنجی ساختار سه بعدی

ساختار سوم واکسن طراحی شده به منظور درک بهتر عملکرد بیولوژیکی آن با استفاده از ابزار وب Robetta پیش‌بینی شد [۴۱]. سپس از وب سرور GalaxyRefine برای اصلاح مدل سه بعدی ارائه شده توسط سرور پیش‌بینی کننده ساختار سوم استفاده شد [۴۲]. این سرور از طریق بازسازی مجدد زنجیره‌های جانبی و پایدارسازی ساختار به وسیله شبیه‌سازی دینامیک

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

مولکولی، مدل‌های اصلاح شده در مقایسه با مدل اولیه ارسال شده به آن را از نظر امتیاز GDT-HA، امتیاز RMSD، امتیاز Molprobity، امتیاز برخورد و نمودار راماچاندران ارزیابی می‌کند. همچنین اعتبارسنجی مدل انتخابی از بین مدل‌های ارائه شده توسط GalaxyRefine، با استفاده از وب سرور ProSA [۴۳] و سرور SAVES v6.0 انجام شد. زیر مجموعه‌های ERRAT [۴۴]، VERIFY3D [۴۵]، PROVE [۴۶]، PROCHECK [۴۷] و WHATCHECK [۴۸] که از طریق SAVES v6.0 در اختیار کاربران قرار می‌گیرد، کیفیت ساختاری و انواع پارامترهای استریوشیمیایی مدل مورد نظر را تعیین می‌کنند. در این مطالعه از سرور PDBsum برای ارائه نمودار راماچاندران استفاده شد [۴۹] و مدل نهایی سازه واکسن نیز با استفاده از نرم‌افزار PyMOL v2.5.4 ترسیم گردید [۵۰].

شناسایی اپی‌توپ‌های سلول B ناپیوسته

از سرور ElliPro برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B ناپیوسته در ساختار نهایی مدل سه بعدی واکسن طراحی شده استفاده گردید [۵۱]. در این سرور پارامترهای حداقل امتیاز و حداکثر فاصله (برحسب آنگستروم)، به ترتیب بر روی مقادیر ۰/۵ و ۶ تنظیم شدند.

داکینگ مولکولی سازه واکسن با گیرنده TLR3

برای بررسی برهمکنش‌های بین ساختار واکسن و گیرنده تشخیص آنتی‌ژن با هدف تعیین پایداری و تمایل اتصال کمپلکس تشکیل شده، از آنالیز داکینگ مولکولی استفاده شد. در این مطالعه برای داکینگ مولکولی، فایل pdb گیرنده ایمنی شبه تول ۳ (TLR3) که یک پروتئین انسانی مهم برای شناسایی پاتوژن و پاسخ ایمنی است، با شناسه 2A0Z از بانک داده‌های پروتئینی بازیابی و در ادامه تمام مولکول‌های آب و لیگاندهای متصل به این ساختار حذف شدند. سپس این گیرنده پروتئینی با مدل نهایی واکسن ساخته شده به ClusPro 2.0 ارائه گردید. این سرور مدل‌ها را براساس برهمکنش‌های الکترواستاتیک و انرژی حلال‌زدایی محاسبه می‌کند [۵۲]. در ادامه برای تأیید میل اتصال واکسن طراحی شده با گیرنده مورد نظر، از PatchDock برای داکینگ مجدد استفاده شد. این سرور به کمک سه الگوریتم نمایش شکل مولکولی، تطبیق قطعه سطحی، فیلتر کردن و امتیازدهی کمپلکس‌های ممکن را پیش‌بینی می‌کند [۵۳]. برای انتخاب بهترین ساختار کمپلکس واکسن–TLR، کمترین امتیاز انرژی اتصال با رتبه برتر مدنظر قرار گرفت. پس از به دست آوردن خروجی از سرور PatchDock، کمپلکس‌ها توسط FireDock (تقویت برهمکنش سریع در داکینگ مولکولی) که کمپلکس بهینه را به کمک توابع انرژی پیش‌بینی می‌کند، اصلاح شدند [۵۴]. در مرحله بعد به کمک نرم‌افزار Pymol v2.5.4 [۵۰] هرکدام از مجموعه‌های داکینگ شده تصویرسازی شدند. همچنین برای تجزیه و تحلیل و دستیابی به طرحی متداول از برهمکنش‌های پروتئین–پروتئین بین مولکول‌های داکینگ شده، سرور آنلاین PDBsum به کار گرفته شد [۴۹].

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

برای شروع شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD)، از فایل pdb کمپلکس واکسن–گیرنده ایمنی به دست آمده از فرایند داکینگ، استفاده شد. در این جا از سرور iMODS [۵۵] که ابزار مفیدی برای مطالعه دینامیک مولکولی است، به منظور بررسی پایداری این کمپلکس پروتئینی تشکیل شده استفاده شد. این رویکرد با مطالعه ساختار، عملکرد و اساس فیزیکی نسبت داده شده به مولکول‌های بیولوژیکی، پایداری یک مجموعه را مورد بررسی قرار می‌دهد. برای تعیین حرکت پروتئین کل در جهت‌های داخلی و براساس تجزیه و تحلیل حالت عادی (NMA)، این سرور مقادیر ویژه، تغییر شکل‌پذیری، فاکتورهای B، کوواریانس و مدل شبکه الاستیک را ارائه می‌دهد [۵۶].

بهینه‌سازی کدون و شبیه‌سازی in silico

برای ترجمه معکوس توالی واکسن به cDNA و بهینه‌سازی کدون، از ابزار آنلاین Jcat [۵۷] استفاده شد. کل عملیات با اجتناب از سه معیار مکان‌های برشی آنزیم‌های محدود کننده، محل‌های اتصال ریبوزوم پروکاریوتی و خاتمه رونویسی مستقل از rho برای سویه پرکاربرد K12 باکتری *E. coli* به عنوان میزبان انجام شد [۵۸]. سپس توالی دریافت شده براساس مقدار شاخص سازگاری کدون (CAI) [۵۹] و محتوای گوانین–سیتوزین (GC) [۶۰] ارزیابی گردید. در نهایت، توالی نوکلئوتیدی سازگار شده برای شبیه‌سازی in silico در وکتور pET-30a (+) با نرم‌افزار SnapGene 6.2 در محل مکان‌های برشی آنزیم‌های محدودکننده (AAGCTT) HindIII و (GGATCC) BamHI کلون شد تا از بیان آن در شرایط آزمایشگاهی اطمینان حاصل شود [۶۱].

شبیه‌سازی سیستم ایمنی

به منظور توصیف و اعتبارسنجی پاسخ‌های سیستم ایمنی (هومورال و سلولی) ایجاد شده توسط واکسن چند اپی‌توپی، شبیه‌سازی ایمنی در in silico با استفاده از سرور C-IMMSIM انجام شد. این سرور از ماتریس‌های امتیازدهی

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

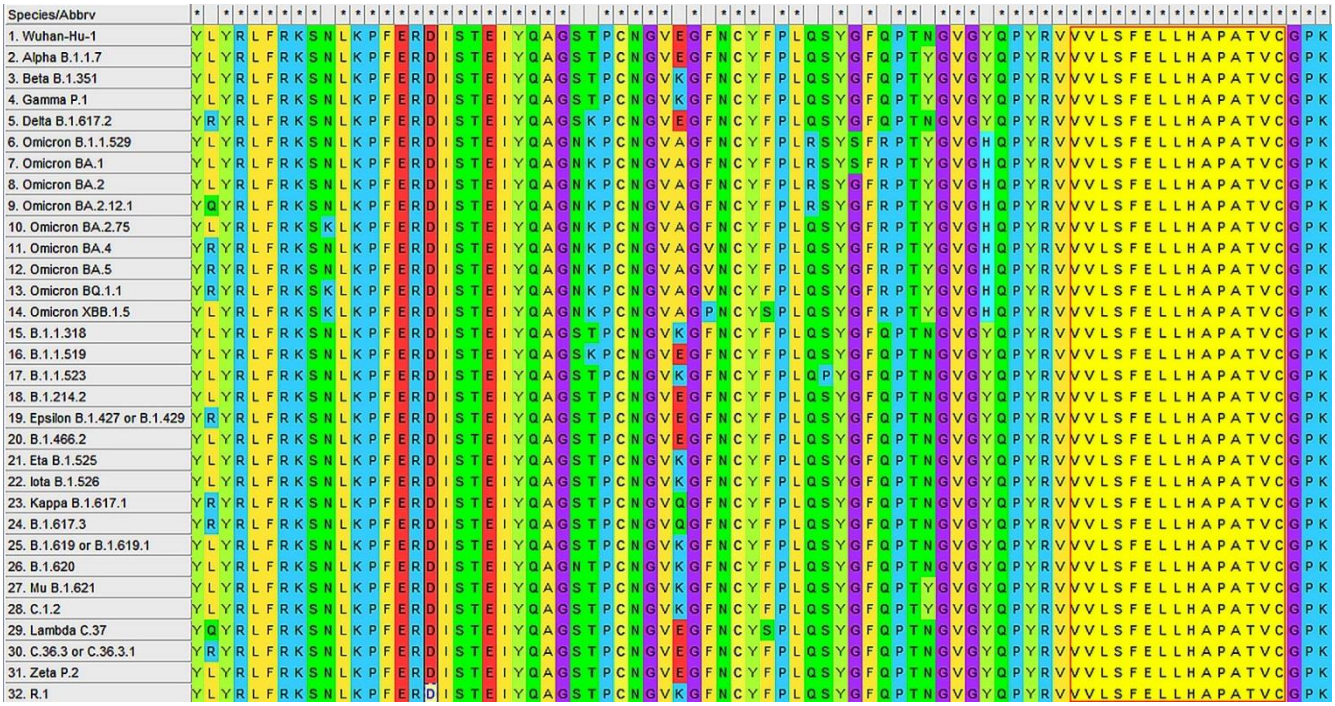
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

اختصاصی موقعیت (PSSM) و یادگیری ماشین برای پیش‌بینی استفاده می‌کند و به طور همزمان سه جزء اصلی سیستم عملکردی پستانداران (تیموس، غدد لنفاوی و مغز استخوان) را شبیه‌سازی می‌نماید [۶۲]. برای انجام شبیه‌سازی ایمنی، پارامترهایی مانند دانه تصادفی، حجم شبیه‌سازی و مرحله شبیه‌سازی به ترتیب بر روی مقادیر ۱۲۳۴۵، ۱۰ میکرولیتر و ۱۰۵۰ تنظیم شدند. هاپلوتیپ‌های میزبان هموزیگوت نیز HLA-A*0101، HLA-A*0201، HLA-B*0702، HLA-B*3901، HLA-DRB1*0101 و HLA-DRB1*0401 تعیین شدند. ۳ تزریق به فاصله چهار هفته با ۱۰۰۰ مولکول واکسن بدون LPS (لیپوپلی‌ساکارید) انجام شد [۶۳]. حداقل زمان توصیه شده بین دوز اول و دوم برای بیشتر واکسن‌هایی که در حال حاضر مصرف می‌شوند، ۴ هفته است. بدین ترتیب، مراحل زمانی دنبال شده برای ۳ تزریق ۱، ۸۴، ۱۶۸ تعیین شد که هر مرحله برابر با حدود ۸ ساعت است (مدت زمان یک چرخه تقسیم سلولی در زندگی واقعی) [۲۶].

نتایج

هم‌ردیفی توالی‌ها و انتخاب اپی‌توپ‌های حفاظت شده

از آن‌جایی که واکسن بایستی براساس مبارزه با ویروس‌های نوع وحشی و اشکال جهش‌یافته SARS-CoV-2 طراحی شود، پس از بررسی نتایج هم‌ردیفی توالی‌های بازیابی شده، نواحی حفاظتی و غیرحفاظتی به واسطه همسانی اسیدهای آمینه در پروتئین‌های اسپایک سویه‌های مختلف این ویروس شناسایی شدند. در نتیجه با این روش تمامی اپی‌توپ‌های پیش‌بینی‌شده با ابزار لنفوسیت‌های B و T که از مناطق کاملاً مشابه هستند و ۱۰۰ درصد حفاظت‌شدگی را نشان می‌دهند برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب و اپی‌توپ‌های غیرحفاظت‌شده که دارای یک یا چندین اسید آمینه متفاوت در توالی خود بودند، حذف شدند (شکل ۱).



شکل ۱: هم‌ردیفی چندگانه برای توالی‌های اسپایک ۳۲ واریانت SARS-CoV-2

توالی یکی از اپی‌توپ‌های مورد نظر در شکل مشخص شده است.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های CTL و HTL (ایمنی سلولی)

به طور کلی NetCTL1.2 با در نظر گرفتن ۱۲ سوپرتایپ MHC-I، ۴۱۹ اپی‌توپ CTL متمایز برای آلل‌های متعدد از پروتئین اسپایک پیش‌بینی کرد. تمامی این اپی‌توپ‌ها به عنوان موارد برگزیده در نتایج IEDB نیز قرار داشتند. از طرفی دیگر، سرور NetMHCIIpan4.1 ۱۴۰ اپی‌توپ HTL با میل

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

اتصال قوی پیش‌بینی کرد. پس از بررسی مشخص شد که همین اپی‌توپ‌ها نیز توسط IEDB برای آلل‌هایی که در این سرور هستند به عنوان اپی‌توپ‌های برتر پیشنهاد شده بودند که این موضوع به نوعی تصدیق کننده اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده از طریق هر دو سرور است. براساس معیارهای آنتی‌ژنی، حساسیت‌زایی، سمیت و از همه مهم‌تر ۱۰۰٪ حفاظت‌شدگی در پروتئین‌های S همه سویه‌های SARS-CoV-2 مورد نظر، از بین این اپی‌توپ‌های CTL و HTL پیش‌بینی شده، ۱۷ اپی‌توپ CTL و ۱۵ اپی‌توپ HTL به عنوان بهترین‌ها غربال شدند. همچنین پس از بررسی القاپذیری IFN-γ، IL-4 و IL-10 با استفاده از سرورهای IFNepitopes، IL4pred و IL10pred، به طور مشترک دو اپی‌توپ وجود داشتند که تمام معیارها را برآورده می‌کردند. در نهایت اپی‌توپ‌های سلول T برگزیده که در ساختار واکسن نهایی به کار برده شده‌اند، در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ لیست شده‌اند.

جدول ۱: اپی‌توپ‌های CTL سازه نهایی واکسن، پیش‌بینی شده توسط سرورهای NetCTL و IEDB

اپی‌توپ‌ها (موقعیت در پروتئین S)	سوپرتایپ‌ها و آلل‌های HLA کلاس I	میل اتصال به MHC	میل برش C ترمینال	میل انتقال از ناقل Tap	امتیاز پیش‌بینی	ایمنی‌زایی	آنتی‌ژنی	حساسیت‌زایی
LPFNDGVYF (۸۴-۹۲)	B7, HLA-B*35:01, HLA-A*32:07, HLA-B*15:03, HLA-B*40:13, HLA-C*12:03, HLA-A*32:15, HLA-A*68:23, HLA-B*42:01, HLA-B*27:20, HLA-B*53:01, HLA-C*03:03	۰/۴۰۲۶	۰/۹۷۶۱	۲/۳۹۳۰	۱/۰۴۲۷	۰/۱۱۷۶	۰/۵۵۹۳ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا
ARDLICAQK (۱۶۸-۱۷۶)	B27, HLA-B*27:20, HLA-C*12:03, HLA-A*68:23, HLA-A*32:07, HLA-C*05:01, HLA-C*08:02, HLA-B*40:13, HLA-A*32:15	۰/۲۹۹۱	۰/۹۶۰۱	۰/۷۹۳۰	۰/۹۷۸۷	۰/۰۴۰۲	۰/۸۱۵۷ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا
QLTPTWRVY (۴۹۰-۴۹۸)	A1, B62, HLA-B*27:20, HLA-A*32:07, HLA-C*03:03, HLA-A*68:23, HLA-C*12:03, HLA-C*14:02, HLA-B*15:02, HLA-C*07:02, HLA-B*40:13, HLA-A*32:15	۰/۵۲۵۹	۰/۹۶۶۱	۲/۷۸۲۰	۱/۳۲۸۱	۰/۳۱۵۵	۰/۲۱۲۹ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا
PYRVVVLSF (۵۰۷-۵۱۵)	A24, HLA-C*14:02, HLA-A*32:07, HLA-B*27:20, HLA-A*24:03, HLA-A*23:01, HLA-C*12:03, HLA-C*07:02, HLA-A*68:23, HLA-A*32:15, HLA-B*42:01, HLA-B*15:02, HLA-A*24:02	۰/۷۵۹۳	۰/۹۷۱۸	۲/۳۱۹۰	۱/۸۷۸۶	۰/۰۳۱۳	۱/۰۲۸۱ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا
TLADAGFIK (۸۲۷-۸۳۵)	A3, HLA-A*32:07, HLA-C*03:03, HLA-A*68:23, HLA-B*27:20, HLA-A*11:01, HLA-A*68:01, HLA-C*12:03, HLA-B*40:13, HLA-A*03:01	۰/۵۷۲۰	۰/۹۴۸۲	۰/۵۲۷۰	۱/۲۴۵۱	۰/۲۸۱۵	۰/۵۷۸۱ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا
VVFLHVTYV (۱۰۶۰-۱۰۶۸)	A2, HLA-A*68:23, HLA-C*12:03, HLA-C*06:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:11, HLA-B*27:20, HLA-A*32:07, HLA-A*02:06, HLA-A*02:50, HLA-C*07:01, HLA-A*02:16, HLA-B*40:13, HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*68:02, HLA-A*02:19, HLA-A*32:15, HLA-C*14:02	۰/۵۸۹۵	۰/۸۱۲۲	۰/۵۹۷۰	۱/۰۳۰۴	۰/۱۲۷۸	۱/۵۱۲۲ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا
YIKWPWYIW (۱۲۰۹-۱۲۱۷)	B58, HLA-C*12:03, HLA-A*32:07, HLA-B*27:20, HLA-A*02:50, HLA-A*68:23, HLA-B*40:13, HLA-A*32:15, HLA-C*03:03	۰/۲۹۳۴	۰/۸۰۶۶	۰/۹۴۲۰	۰/۸۲۹۲	۰/۴۲۵۲	۰/۹۶۷۳ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

جدول ۲: اپی‌توپ‌های HTL سازه نهایی واکسن، پیش‌بینی شده توسط سرورهای NetMHC II pan 3.2 و IEDB

اپی‌توپ‌ها (موقعیت در پروتئین S)	آلل‌های HLA کلاس II	آنتی‌ژنی	حساسیت‌زایی	سمیت
YQTSNFRVQPTESIV (۳۱۳-۳۲۷)	HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*04:01	۰/۷۵۶۳ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
CDIPIGAGICASYQT (۶۶۲-۶۷۶)	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	۰/۷۹۳۵ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
NFTISVTTEILPVSM (۷۱۷-۷۳۱)	HLA-DRB1*07:01	۱/۲۱۳۶ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
FNFSQILPDPSKPSK (۸۰۰-۸۱۴)	HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*04:04, HLA-DRB1*04:01	۰/۵۸۳۱ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
MQMAYRFNGIGVTQN (۹۰۰-۹۱۴)	HLA-DRB1*04:04	۱/۳۰۲۵ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی

جدول ۳: اپی‌توپ‌های مشترک IFN-γ، IL-4 و IL-10 سازه‌ی نهایی واکسن، پیش‌بینی شده توسط سرورهای IFNepitopes، IL4pred و IL10pred

اپی‌توپ‌ها (موقعیت در پروتئین S)	اینترفرون_گاما	اینترلوکین_٤	اینترلوکین_۱۰	آنتی‌ژنی	حساسیت‌زایی	سمیت
VVLSFELLHAPATVC (۵۱۴-۵۲۸)	مثبت	القاکننده	القاکننده	۰/۸۶۱۸ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
QYIKWPWYIWLGFIA (۱۲۱۱-۱۲۲۵)	مثبت	القاکننده	القاکننده	۱/۱۵۴۱ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی

پیش‌بینی اپی‌توپ سلول B خطی و فضایی (ایمنی هومورال)

پس از ارزیابی دقیق نتایج سرورهای پیش‌بینی کننده اپی‌توپ‌های سلول B خطی (LBL) و با در نظر گرفتن اشتراکات نتایج آن‌ها، در مجموع ۲۷ اپی‌توپ پیش‌بینی شد. براساس معیارهای نمره اتصال، آنتی‌ژنی، حساسیت‌زایی، سمیت، انعطاف‌پذیری، آب دوستی، دسترسی به سطح و حفاظت شدگی کامل، ۱۰ اپی‌توپ برای پروتئین S به دست آمد (جدول ۴). ۷ اپی‌توپ برای حضور در ساختار نهایی واکسن از بین این ۱۰ مورد انتخاب شدند. همچنین براساس نتایج به دست آمده از سرور ElliPro، ۵ اپی‌توپ فضایی سلول B از مدل سه بعدی تصفیه شده پیش‌بینی شدند (شکل ۲) که شامل ۱۹۸ باقی‌مانده با امتیازهای بین ۰/۸۰۲ و ۰/۶۲ هستند. اطلاعات جزئی شامل باقی‌مانده‌های اسید آمینه، محل توالی، تعداد باقی‌مانده‌ها و امتیازات آن‌ها در جدول ۵ ارائه شده است.

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

جدول ٤: اپی‌توپ‌های سلول B خطی به کار گرفته شده در ساختار واکسن

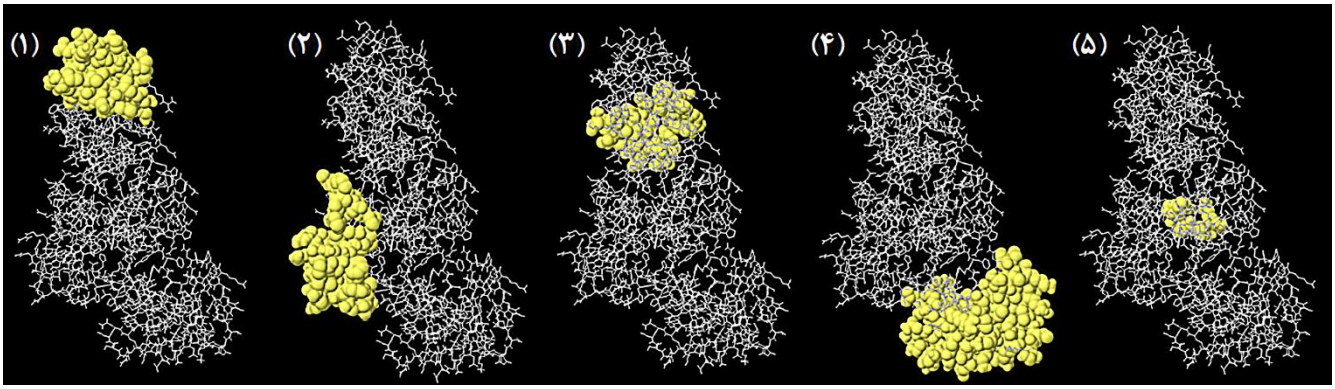
اپی‌توپ‌های خطی (موقعیت در پروتئین S)	آنتی‌ژنی	حساسیت‌زایی	سمیت
GTTLDSKTQSLL (۱۰۷-۱۱۸)	۰/۷۳۵۸ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
FPNITNLCP (۳۲۹-۳۳۷)	۱/۶۲۱۸ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
ITPGTNTSN (۵۹۸-۶۰۶)	۱/۰۱۵۸ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
KRVDFCGKGYHL (۱۰۳۸-۱۰۴۹)	۱/۳۰۴۷ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
TVYDPLQPE (۱۱۳۹-۱۱۴۷)	۰/۴۹۱۳ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
DSFKEELDK (۱۱۴۹-۱۱۵۷)	۰/۷۵۳۴ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی
VDLGDISGI (۱۱۶۴-۱۱۷۲)	۱/۳۱۵۸ (آنتی‌ژن)	غیر حساسیت‌زا	غیر سمی

جدول ٥: فهرست اپی‌توپ‌های سلول B فضایی پیش‌بینی شده در ساختار واکسن

ردیف	باقی‌مانده‌ها	تعداد باقی‌مانده‌ها	امتیاز
۱	_:G7, _:N10, _:T11, _:Q13, _:K14, _:Y15, _:Y16, _:C17, _:R18, _:V19, _:R20, _:G21, _:G22, _:R23, _:C24, _:A25, _:V26, _:L27, _:S28, _:C29, _:L30, _:P31, _:K32, _:E33, _:E34, _:Q35, _:I36, _:G37, _:K38, _:C39, _:S40, _:T41, _:G43, _:R44, _:K45, _:C46, _:C47, _:R48, _:R49, _:K50, _:E52, _:A53, _:K56	۴۳	۰/۸۰۲
۲	_:H156, _:E157, _:A160, _:E161, _:A162, _:L163, _:E164, _:R165, _:A166, _:G167, _:Y168, _:Q169, _:T170, _:S171, _:N172, _:F173, _:R174, _:I181, _:V182, _:G183, _:P184, _:G185, _:P186, _:G187, _:C188, _:D189, _:I190, _:S199, _:Y200, _:Q201, _:T202, _:G203, _:P204, _:G205, _:P206, _:G207, _:N208, _:F209, _:T210, _:I211	۴۰	۰/۷۴۷
۳	_:A67, _:A68, _:A69, _:E70, _:A71, _:A72, _:A73, _:K74, _:L75, _:P76, _:F77, _:N78, _:D79, _:G80, _:V81, _:Y82, _:F83, _:F117, _:I118, _:K119, _:A120, _:A121, _:Y122, _:A123, _:R124, _:D125, _:L126, _:I127, _:C128, _:A129, _:Q130, _:K131	۳۲	۰/۷۲۳
۴	_:L295, _:H296, _:A297, _:P298, _:A299, _:T300, _:V301, _:C302, _:K303, _:G305, _:T306, _:T307, _:L308, _:D309, _:S310, _:K311, _:T312, _:Q313, _:S314, _:L315, _:L316, _:K317, _:K318, _:F319, _:P320, _:T323, _:N324, _:L325, _:C326, _:P327, _:K328, _:K329, _:I330, _:T331, _:P332, _:G333, _:T334, _:N335, _:T336, _:S337, _:N338, _:K339, _:K340, _:K341, _:D344, _:C346, _:G347, _:Y357, _:D358, _:P359, _:L360, _:Q361, _:P362, _:E363, _:K365, _:D366, _:S367, _:K369, _:E370, _:E371, _:L372, _:D373, _:K374, _:K375, _:V377, _:D378, _:L379, _:G380, _:D381, _:I382, _:S383, _:G384, _:I385, _:R386	۷۴	۰/۶۸۵
۵	_:P235, _: D236, _: P237, _: S238, _: K239, _: P240, _: S241, _: K242, _: G243	۹	۰/۶۲

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]



شکل ۲: پیش‌بینی اپی‌توپ‌های ناپیوسته بر روی سطح واکسن طراحی شده توسط ElliPro

نواحی زرد اپی‌توپ‌های فضایی سلول B و مناطق خاکستری باقی‌مانده‌ها هستند.

آنالیز پوشش جمعیت انسانی در سراسر جهان، بررسی حفاظت‌شدگی و شناسایی خودایمنی

۱۴ اپی‌توپ سلول T انتخاب شده به صورت ترکیبی، ۹۹/۹۷ درصد از کل جمعیت انسانی در جهان را شامل می‌شوند که بیانگر پوشش جمعیتی بالا است. درصد پوشش اپی‌توپ‌ها در سایر مناطق نیز به تفکیک در جدول ۶ ارائه شده است. طبق نتایج ابزار IEDB conservancy analysis، همان‌طور که انتظار می‌رفت اپی‌توپ‌های سلول T و B انتخاب شده از نواحی بدون تغییر در توالی پروتئین اسپایک سویه‌های مختلف، حفاظت‌شدگی ۱۰۰٪ را در بین واریانت‌های مورد نظر نشان دادند. علاوه بر این، همسانی بین توالی واکسن و توالی پروتئین‌های انسانی نشان داد که هیچ‌کدام از اپی‌توپ‌های انتخابی، همولوژی با کل پروتئین‌های انسانی ندارند؛ بنابراین این واکسن در بیماری‌های خودایمنی میزبان نقشی ندارد.

جدول ٦: پوشش جمعیتی اپی‌توپ‌های سلول T (CTL و HTL) موجود در ساختار واکسن

جمعیت/منطقه	پوشش جمعیتی	کلاس ترکیبی میانگین تعداد برخوردها	pc90
آفریقای مرکزی	٪۹۹/۹۹	۶/۰۶	۴/۰۳
آمریکای مرکزی	٪۹۹/۳	۲/۵۳	۱/۶۷
آفریقای شرقی	٪۹۹/۹۸	۵/۸۶	۳/۹
آسیای شرقی	٪۹۹/۵۷	۵/۳۵	۲/۷۷
اروپا	٪۱۰۰	۷/۸۹	۴/۸۶
شمال آفریقا	٪۹۹/۷۶	۵/۳	۲/۹۹
آمریکای شمالی	٪۱۰۰	۷/۶۴	۵/۰۱
شمال شرق آسیا	٪۹۹/۸	۵/۵۸	۳/۱۱
اقیانوسیه	٪۹۹/۸۷	۵/۳۵	۳/۱۶
آفریقای جنوبی	٪۹۴/۹۹	۳/۰۳	۱/۲۹
آمریکای جنوبی	٪۹۹/۹۸	۶/۲۴	۳/۸۶
آسیای جنوبی	٪۹۹/۹۹	۶/۴	۳/۸۲
جنوب شرق آسیا	٪۹۸/۷۸	۴/۱۵	۲/۱۱
جنوب غرب آسیا	٪۹۹/۶۶	۴/۷۲	۲/۵۴
غرب آفریقا	٪۱۰۰	۶/۴۳	۴/۴۱
هند غربی	٪۹۶/۹۲	۲/۸۸	۱/۴۶
جهان	٪۹۹/۹۷	۷/۰۱	۴/۱۳
میانگین	۹۹/۳۳	۵/۴۴	۳/۲۴
انحراف معیار	۱/۳۱	۱/۵۲	۱/۱۲

میانگین تعداد برخوردها: ترکیبات HLA شناسایی شده در جمعیت/ میانگین تعداد برخوردهای اپی‌توپ. pc90: ترکیبات HLA شناسایی شده توسط ۹۰٪ از جمعیت/ حداقل تعداد برخوردهای اپی‌توپ.

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

ساخت واکسن نهایی چند اپی‌توپی

ساختار خطی واکسن شامل ۷ اپی‌توپ CTL، ۵ اپی‌توپ HTL، ۲ اپی‌توپ محرک IFN-γ، IL-4 و IL-10، ۷ اپی‌توپ LBL، اپی‌توپ PADRE، ادجوانت بتا دفنسین، لینکرها (AAY، GPGPG، KK، HEYGAEALERAG، EAAAK و RVRR) و در نهایت تگ H5E می‌شود که شمای کلی این سازه در قسمت الف شکل ۳ نشان داده شده است.

پیش‌بینی آنتی‌ژنیسیتی، حساسیت‌زایی، سمیت، حلالیت و خواص فیزیکوشیمیایی ساختار نهایی واکسن

امتیاز سرورهای VaxiJen v2.0 [۶۴] و ANTIGENpro [۶۵] که به ترتیب ۰/۶۲۲۴ و ۰/۸۸۵۴ هستند، آنتی‌ژن بودن واکسن و توانایی آن در القای یک پاسخ ایمنی قوی را تأیید می‌کنند (نمره بیشتر از ۰/۴ در مدل ویروسی VaxiJen و بیشتر از ۰/۸ در ANTIGENpro آنتی‌ژن در نظر گرفته می‌شود). دو سرور AllergenFP 1.0 و AllerTOP 2.0 نیز نشان دادند که واکسن هیچ واکنش آلرژیکی را تحریک نمی‌کند و غیرحساسیت‌زا است (NON-ALLERGEN PROBABLE). در سرور ToxinPred، براساس نتایج حالت پیش‌بینی SVM، در سرتاسر توالی نهایی واکسن که شامل همه اپی‌توپ‌ها، ادجوانت، لینکرها و تگ H5E می‌شود، هیچ بخش سمی وجود ندارد. همچنین مقادیر پیش‌بینی شده با Protein-sol server (۰/۴۶۲) و SolPro (۰/۶۰۷۱) نشان می‌دهند که واکسن از حلالیت خوبی برخوردار است. نتایج کلی برآورد هرکدام از این معیارها برای واکسن طراحی شده در جدول ۷ نشان داده شده است.

ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی نشان داد که سازه نهایی شامل ۳۹۸ اسید آمینه با وزن مولکولی ۴۳/۶۶ کیلودالتون (kDa) است. این واکسن دارای نقطه ایزوالکتریک نظری (pI) ۹/۳۶ است که ماهیت بیسیک آن را نشان می‌دهد. همچنین تعداد کل اسید آمینه‌های با بار مثبت (Arg + Lys) و منفی (Asp + Glu) به ترتیب ۵۳ و ۳۳ محاسبه شد در نتیجه مقدار بار این ساختار ۲۰+ است. از آنجایی که مقدار بار در محیط‌های قلیایی کاهش می‌یابد، معمولاً بهتر است بار به صورت مقادیر مثبت باشد. همچنین ضریب خاموشی $M^{-1}\ cm^{-1}$ ۵۹۵۴۰، با مقادیر جذب (۰/۱٪) (g/l) ۱/۳۶۴ شامل تمام جفت‌های سیستئین در شرایط آبی در ۲۸۰ نانومتر است. نیمه عمر تخمینی واکسن در رتیکولوسیت‌های پستانداران (in vitro) ۳۰ ساعت، در مخمر (in vivo) حدود ۲۰ ساعت و در *E. Coli* (in vivo) ۱۰ ساعت بود که نشان‌دهنده پایداری آن در فازهای مختلف است. این واکسن با شاخص ناپایداری ۲۳/۰۳ (<۴۰) قابلیت بالایی برای شروع یک واکنش ایمنی‌زا دارد. علاوه بر این، مقدار ۷۲/۳۶ برای شاخص آلیفاتیک نشان می‌دهد که این ساختار مقاوم به حرارت است. از طرفی میانگین کل هیدروپاتی (GRAVY) ۰/۳۰۷- بود که نمره پایین‌تر بیانگر حلالیت بهتر است. بنابراین واکسن کاندید ماهیتی آب دوست دارد، به این معنی که می‌تواند تعامل با آب و خون را تقویت کند و به راحتی اهداف را شناسایی نماید [۲۹]. براساس تمامی نتایج آنالیز خواص فیزیکوشیمیایی به دست آمده، محتویات ساختار این واکسن معیارهای لازم برای فرمولاسیون واکسن را برآورده می‌کند (جدول ۷). از آنجایی که واکسن طراحی شده فاقد هرگونه مارپیچ غشایی است، مشکلی از نظر بیانی در تولید واکسن پیش‌بینی نمی‌شود و عدم وجود سیگنال پپتید در ساختار واکسن نشان دهنده جلوگیری از محلی‌سازی پروتئین است [۶۶].

جدول ۷: نتایج پیش‌بینی آنتی‌ژنی، حساسیت‌زایی، حلالیت، سمیت و خواص فیزیکوشیمیایی برای ساختار واکسن.

	امتیاز Vaxijen	آنتی ژنی (Antigen pro)	حساسیت‌زایی Allergen FP (/AllerTOP	حلالیت (SolPro)	حلالیت (protein-sol)	سمیت	وزن مولکولی (دالتون)
واکسن نهایی	۰/۶۲۲۴	۰/۸۸۵۴	غیر حساسیت‌زا	۰/۶۰۷۱ (حل شونده)	۰/۴۶۲ (حل شونده)	غیر سمی	۴۳۶۶۲/۳۷
	نقطه‌ی ایزوالکتریک (pI)	**بار**	**نیمه عمر (in vitro)**	**نیمه عمر (in vivo)**	**شاخص پایداری**	**شاخص آب‌گریزی**	**هیدروپاتی (GRAVY)**
	۹/۳۶	۲۰	۳۰ ساعت	۲۰ ساعت < ۱۰ ساعت <	۲۳/۰۳ (پایدار)	۷۲/۳۶	۰/۳۰۷-

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

ساختار ثانویه سازه واکسن

پیش‌بینی ساختار ثانویه با استفاده PSIPRED نشان داد که ساختار واکسن متشکل از ۲۲/۶۱٪ مارپیچ آلفا، ۲۲/۱۱٪ رشته‌های بتا و ۵۴/۲۷٪ کویل است. همچنین ساختار ثانویه ارائه شده توسط ابزار تحلیل ساختار ثانویه آنلاین (SOPMA) [۴۰] با پارامترهای پیش‌فرض شامل ۲۷/۳۹٪ مارپیچ آلفا، ۲۶/۱۳٪ رشته‌های توسعه‌یافته، ۷/۵۴٪ پیچش بتا و ۳۸/۹۴٪ کویل تصادفی است. به طور کلی نمایش گرافیکی ویژگی‌های ساختار ثانویه، انعطاف‌پذیری، پایداری و ساختار کروی مطلوبی را برای سازه‌ی واکسن نشان می‌دهند (شکل ۳ قسمت ب).

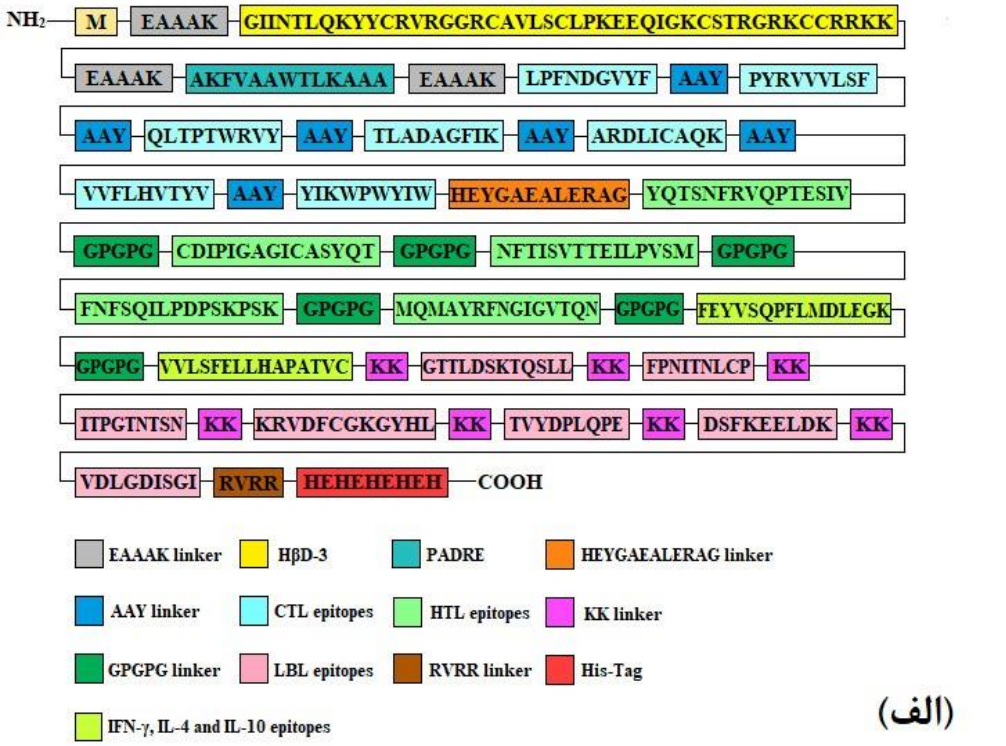
مدل‌سازی، پالایش و اعتبارسنجی ساختار سه بعدی واکسن چند اپی‌توپی

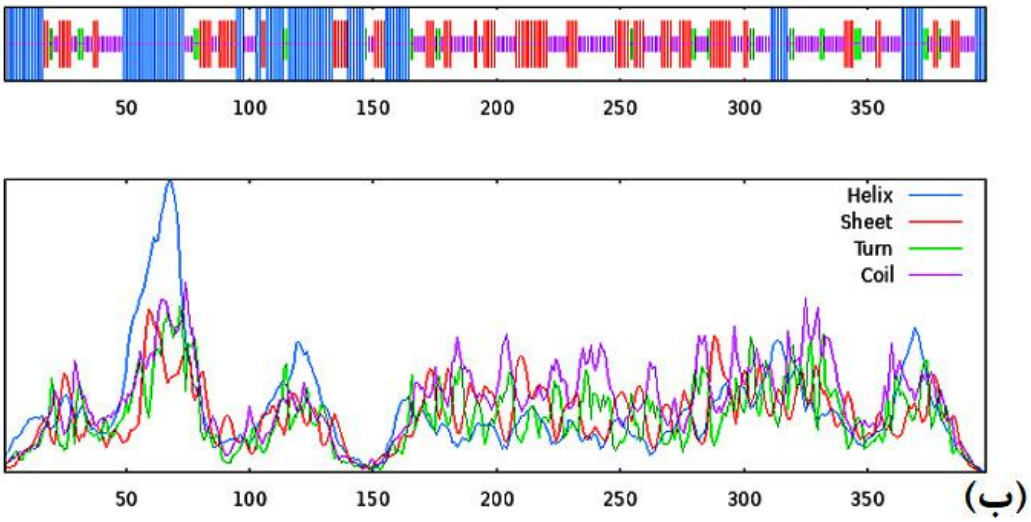
پس از پیش‌بینی مدل‌های سه بعدی توسط سرور Robetta، از بین آن‌ها یک مورد به عنوان مدل برتر انتخاب و در ادامه کار بر مبنای همین مدل، ساختار سه بعدی نهایی برای واکسن ارائه شد. بعد از اصلاح مدل به دست آمده از مرحله قبل توسط GalaxyRefine، مدل ۵ به دلیل امتیازات کیفی مناسب برای پارامترهای مختلف GDT-HA، RMSD، MolProbity، امتیاز برخورد و روتامرهای ضعیف از میان سایر موارد پالایش شده به عنوان مدل نهایی واکسن انتخاب شد (شکل ۳ قسمت ج). اندازه‌گیری شباهت‌های بین دو ساختار پروتئینی (مدل ابتدایی و مدل اصلاح شده) با امتیاز آزمون فاصله جهانی با دقت بالا (GDT-HA) نشان داده می‌شود و مقدار بالای این امتیاز (۰/۹۸۶۲) بیانگر وجود شباهت بالا در بین این دو مدل است. امتیاز انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD) فاصله بین اتم‌ها را محاسبه می‌کند به طوری که مقدار کم RMSD، سطح بهتری از ثبات را نشان می‌دهد. نمره RMSD قابل قبول از ۰ تا ۱/۲ تعریف شده است که در این مطالعه، امتیاز این مدل (۰/۲۸۳) نیز در این بازه قرار دارد و این نشان دهنده سطح مطلوبی از ثبات ساختاری واکسن پیش‌بینی شده است [۶۷] از طرفی مقدار امتیاز MolProbity، ۲/۰۶۹ است که بیانگر کاهش خطاهای بحرانی در مدل سه بعدی است. همچنین امتیاز برخورد، تعداد تمام اتم‌های همپوشان نامطلوب را نشان می‌دهد که در این جا از ۵۵/۹ به ۱۷/۲ کاهش یافته است که به معنای افزایش پایداری در ساختار واکسن است. روتامرهای ضعیف به صورت یک عدد ارائه می‌شود که با وضوح کریستالوگرافی در ارتباط است؛ بنابراین ساختاری که از نظر عددی امتیاز روتامرهای زنجیره جانبی بد پایین‌تری دارد (۰/۶)، از نظر کیفیت بهتر از مدل ابتدایی است [۶۸]. همچنین امتیاز نمودار راماچاندران پس از اصلاح، از ۹۳/۴ به ۹۵/۲ درصد بهبود یافته است. در نهایت براساس نمرات ارائه شده برای شاخص‌های مورد بررسی، مدل اصلاح شده از کیفیت کلی خوبی برخوردار است.

امتیاز Z این ساختار در نمودار PROSA نزدیک به محدوده پروتئین بومی با اندازه مشابه است (۸/۱۵-)، که میزان خطای کم، دقت بالای شبیه‌سازی و به طور کلی کیفیت خوب مدل پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد (شکل ۳ قسمت‌های د و ه). علاوه بر این، ضریب کیفیت ۸۸/۰۹۵۲ به دست آمده با استفاده از سرور ERRAT، بیانگر کیفیت خوب مدل پروتئینی است [۶۹]. امتیاز نمودار راماچاندران تصویری از زوایای دو وجهی آمینواسیدهای مجاز و غیرمجاز (زوایای phi و psi) از نظر انرژی را ارائه می‌دهد که براساس شعاع واندروال زنجیره جانبی محاسبه شده است و معمولاً مقادیر بیش از ۸۵٪ قابل قبول هستند [۷۰، ۷۱]. تجزیه و تحلیل نمودار راماچاندران با استفاده آنالیز PROCHECK در سرور PDBsum برای ساختار پالایش شده، ۹۲/۱٪ از باقی‌مانده‌ها را در منطقه مطلوب‌ترین، ۶/۱٪ مجاز اضافی، ۰٪ مجاز سخاوتمندانه و ۱/۸٪ را غیرمجاز برآورد کرد (شکل ۳ قسمت و). در مطالعه حاضر، مجموع باقی‌مانده‌های موجود در محدوده ایده‌آل قرار دارند (۹۲/۱٪) که این موضوع قابل اطمینان بودن این مدل را تأیید می‌کند.

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

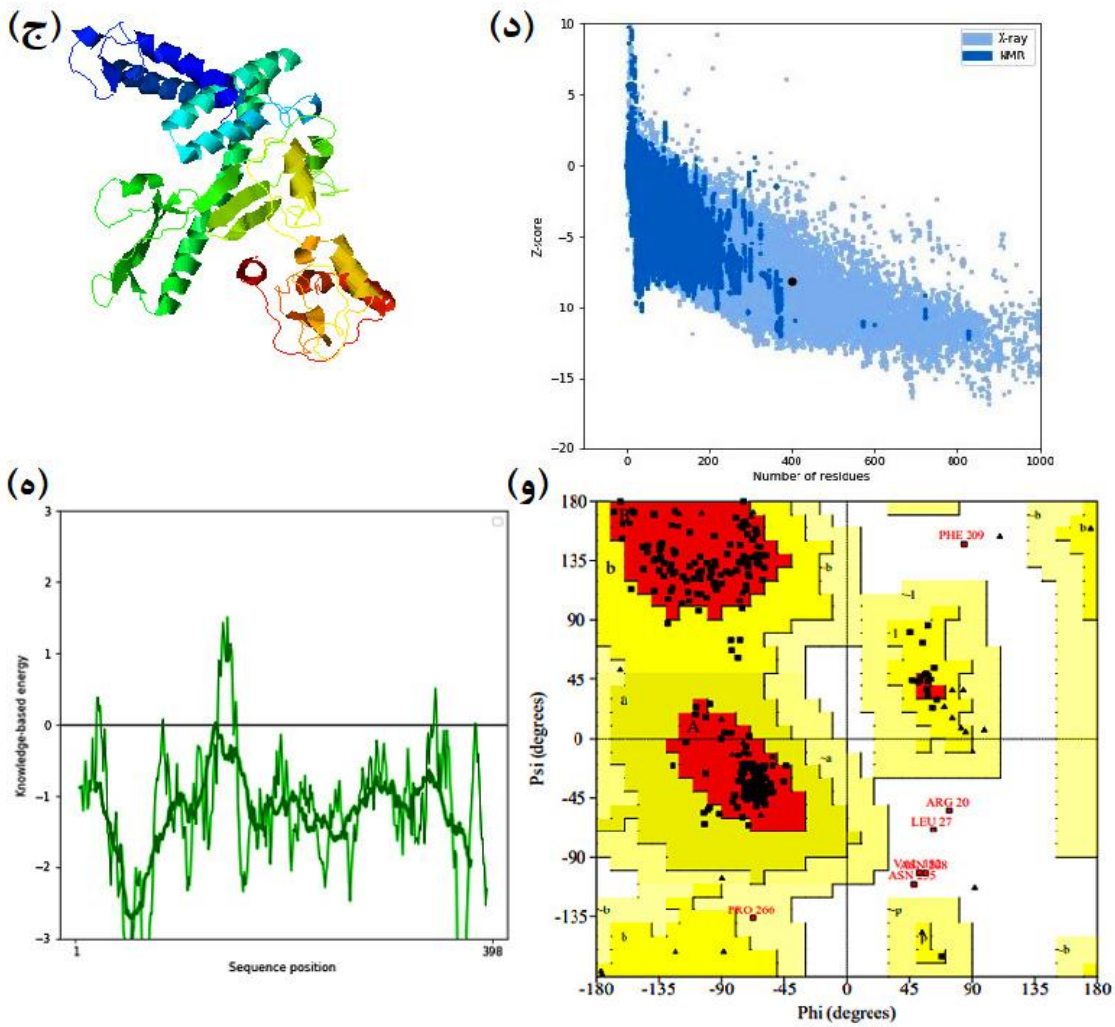
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]





[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]



شکل ۳: (الف) نمایش شماتیک ساختار اولیه واکسن چند اپی‌توپی و اجزای آن. (ب) پیش‌بینی ساختار ثانویه واکسن. (ج) مدل سه بعدی اصلاح شده. (د) اعتبارسنجی ProSA و نمره Z. (ه) کیفیت مدل محلی. (و) نمودار راماچاندران ساختار سه بعدی پس از اصلاح.

داکینگ مولکولی سازه واکسن با گیرنده TLR3

سرور Cluspro برای کمپلکس واکسن-TLR3، ۳۰ مدل کاندید با انرژی‌های داکینگ مختلف به همراه امتیاز خوشه‌ای مربوطه پیش‌بینی کرد. از بین این مدل‌های ارائه شده، مدل ۳ با ۴۸ عضو و کمترین امتیاز انرژی اتصال (۱۰۴۹/۱-) به عنوان بهترین کمپلکس داکینگ شده انتخاب شد که نماینده درستی اشغال گیرنده توسط واکسن و تمایل اتصال خوب است. علاوه بر این، پس از ارزیابی ساختار واکسن با استفاده از سرور PatchDock، مدل‌های مختلفی پیش‌بینی و در ادامه ۱۰ کمپلکس برتر شناسایی و با الگوریتم FireDock اصلاح شدند. پس از پالایش نیز ۱۰ مدل ارائه شد و مدلی که کمترین انرژی اتصال را داشت برای گزارش انتخاب شد که در واقع محلول شماره ۱ با بهترین انرژی جهانی (۱۲۶/۹۶-)، انرژی جذب‌کننده واندروالس (۶۴/۳۳-)، انرژی دافعه واندروالس (۸/۵۶)، انرژی پیوند هیدروژنی (HB) (۱۶/۹۶-) و انرژی تماس اتمی (ACE) (۱۲/۳۶) بود (جدول ۸).

با استفاده از نتایج PDBsum مشخص شد که در کمپلکس واکسن-TLR3، در مجموع ۳۹ باقی‌مانده از واکسن با ۴۴ باقی‌مانده از TLR3 برهمکنش داشتند و ناحیه رابط برای واکسن ۲۲۱۰ ($Å^2$) و برای TLR3 ۲۱۱۶ ($Å^2$) بود. برهمکنش‌های مولکولی ایجاد شده بین واکسن با TLR3 به صورت ۳ پل نمکی، ۳۰ پیوند هیدروژنی و ۲۰۴ برهمکنش غیر پیوندی بود (شکل ۴). وجود پیوندهای هیدروژنی در دستیابی به ترکیبی پایدار اهمیت دارد [۲۶]. در این مطالعه بیشتر فاصله‌های

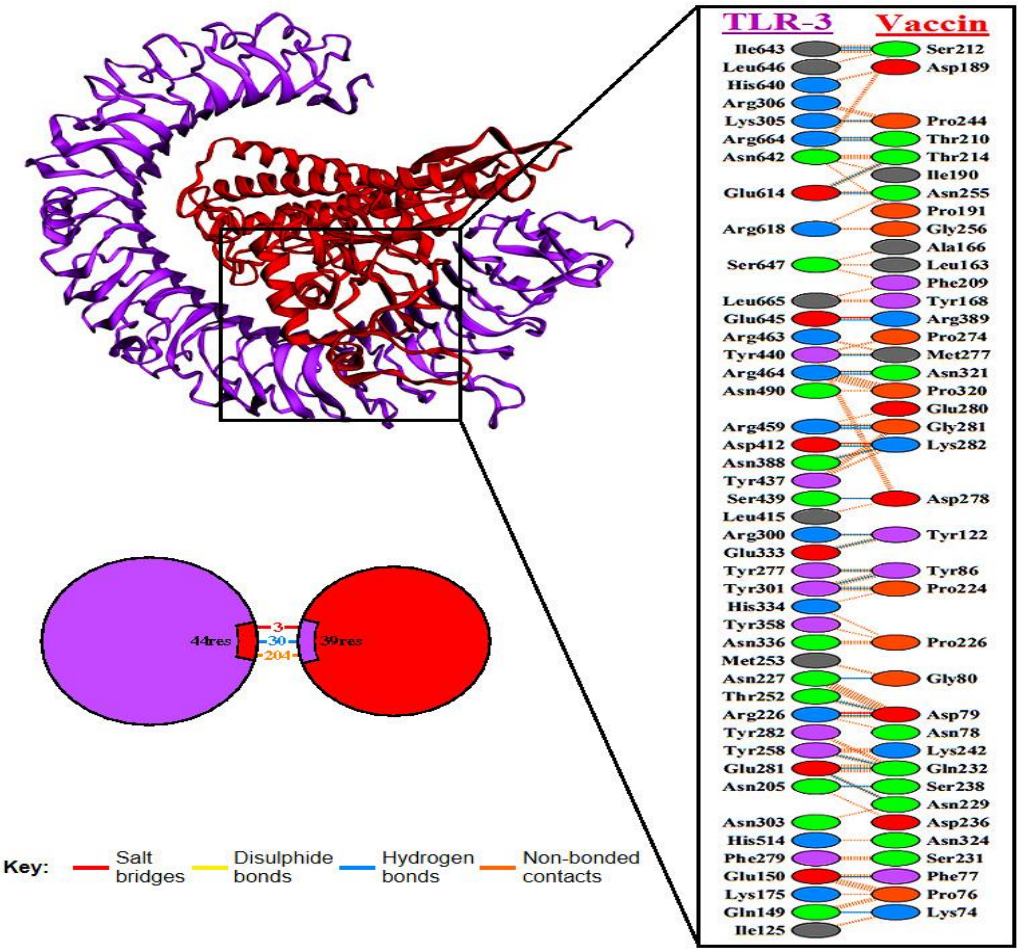
[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

پیوند هیدروژنی بین باقی‌مانده‌های برهمکنش دهنده در بازه ۲ تا ۳ آنگستروم قرار دارند، در نتیجه برهمکنش بالایی در بین آن‌ها برقرار است [۷۲]. پیوندهای الکترواستاتیک نیز نقش مهمی در برهم‌کنش‌های ایجاد شده ایفا می‌کنند [۲۶]. علاوه بر این، نمودار راماچاندران ارائه شده برای نتیجه PDBsum برای اعتبارسنجی ساختاری مجموعه داکینگ شده بررسی شد که تأییدکننده نتایج به دست آمده بود.

جدول ۸: نتایج داکینگ مولکولی ساختار واکسن با TLR3

گیرنده ایمنی	ClusPro		FireDock				
	Lowest energy	Center	HB	ACE	rVdW	aVdW	Glob
TLR-3	-۱۰۴۹/۱	-۹۱۵/۶	-۷/۵۶	-۱۲/۳۶	۸/۵۶	-۶۴/۳۳	-۱۲۶/۹۶

Glob: انرژی جهانی، **aVdW**: انرژی جذب کننده واندروالس، **rVdW**: انرژی دافعه واندروالس، **ACE**: انرژی تماس اتمی، **HB**: انرژی پیوند هیدروژنی



شکل ٤: سمت چپ: نمایش کارتونی مجموعه داکینگ شده واکسن-گیرنده TLR3

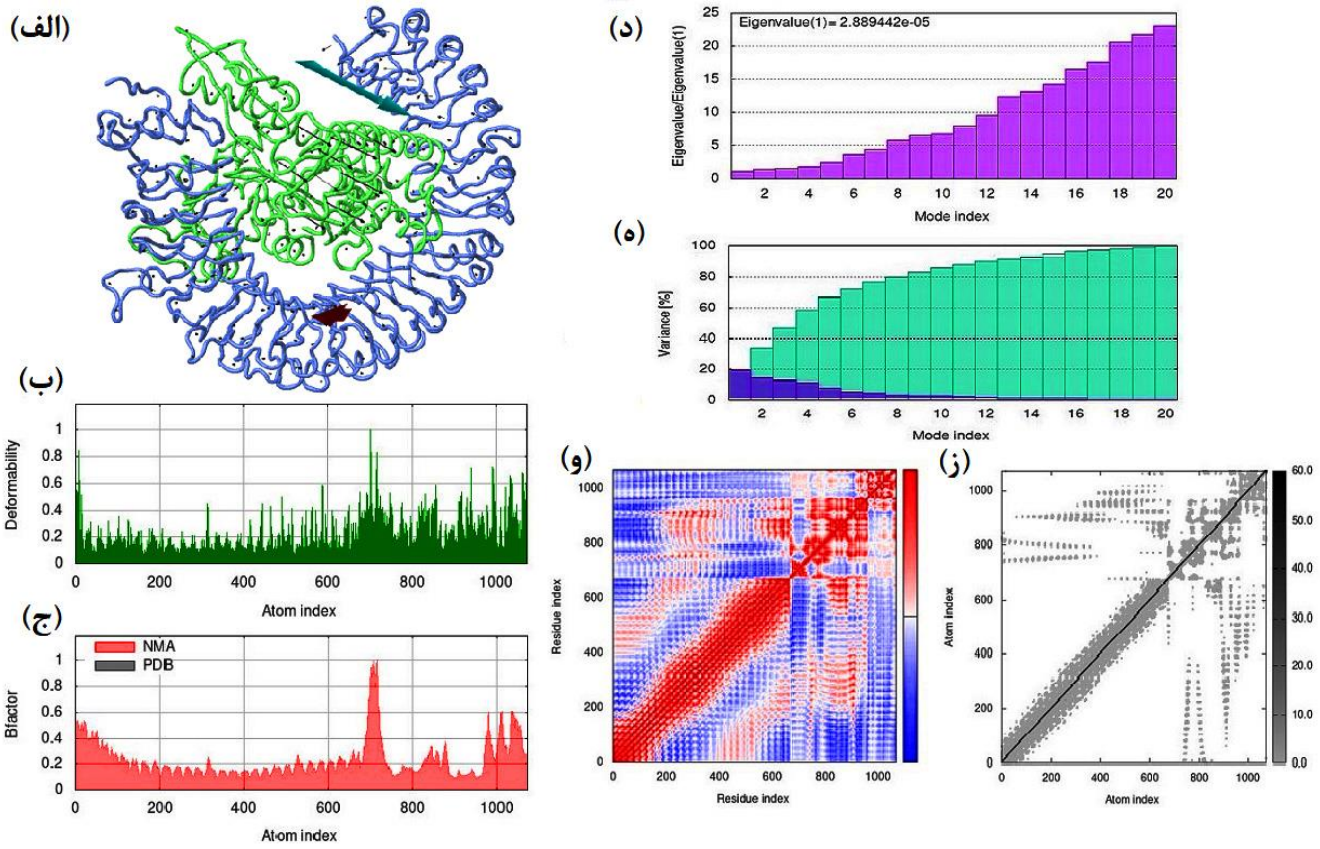
ساختار واکسن با رنگ قرمز و TLR3 با رنگ بنفش نشان داده شده است. سمت راست: لیست باقی‌مانده‌های شرکت‌کننده در برهمکنش. در اینجا رنگ اختصاص داده شده به هر باقی‌مانده، ویژگی آن را تفسیر می‌کند (سبز: خنثی، زرد: سیستئین، بنفش: آروماتیک، خاکستری: آلیفاتیک، آبی: بار مثبت، قرمز: بار منفی و نارنجی: پرولین و گلایسین). پل‌های نمکی، پیوندهای دی سولفیدی، پیوندهای هیدروژنی و سایر پیوندها به ترتیب با خطوط قرمز، زرد، آبی و نارنجی نشان داده شده‌اند.

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ساختار واکسن

نتایج ارزیابی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی توسط سرور iMOD، برهمکنش‌های مولکولی، پایداری و حرکات فیزیکی مجموعه واکسن با گیرنده ایمنی را نشان می‌دهند (شکل ۵). پیش‌بینی چرخش‌ها و برهمکنش‌ها در تصویر سه بعدی الف نمایش داده شده است و همان‌طور که قابل مشاهده است، آن‌ها به سمت یکدیگر می‌چرخند (فلش‌های کوچک سیاه). تغییر شکل زنجیره اصلی در محدوده ۰ تا ۱ آنگستروم در قسمت ب ارائه شده است. لولاها (محل‌های چرخشی که در ساختار مجموعه وجود دارند) مناطقی با تغییر شکل‌پذیری بالا هستند که در شکل پیک‌ها این مناطق را نشان می‌دهند (شکل ۵ قسمت ب). مقادیر فاکتور B به صورت مستقیم با مقدار RMS که از طریق NMA استنباط می‌شود، متناسب است و عدم قطعیت هر اتم را به صورت کمی تعیین می‌کند (شکل ۵ قسمت ج). نمودار بخش د مقدار eigen که با انرژی مورد نیاز برای تغییر شکل ساختار در ارتباط است را نشان می‌دهد که این مقدار برای مجموعه $۲/۸۸۹۴۴۲\times۱۰^{-۵}$ محاسبه شده است. همچنین در تصویر ه نمودار واریانس برهمکنش گزارش شده است که با مقدار eigen رابطه عکس دارد. ماتریس کوواریانس بین جفت باقی‌مانده‌ها نشان دهنده همبستگی آن‌ها است که در این‌جا رنگ‌های قرمز؛ همبستگی، سفید؛ غیر همبستگی و آبی؛ ضد همبستگی را به تصویر می‌کشند (تصویر و). همچنین مدل شبکه الاستیک ارتباط بین اتم‌ها را از طریق تحلیل فنرها و براساس فاصله نشان می‌دهد (جفت اتم‌های متصل شده از طریق فنرها). در واقع هر نقطه نشان دهنده یک فنر بین جفت اتم‌های مربوطه است. فنرهای سفت‌تر با مناطق خاکستری تیره در نمودار الاستیک نشان داده می‌شوند (تصویر ز). یعنی هر فنر براساس سفتی مجموعه در رابطه با جفت اتم مربوطه رنگ می‌شود. در نهایت می‌توان براساس این اطلاعات به دست آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، واکسن طراحی شده را یک سازه پایدار معرفی کرد.



شکل ۵: نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مجموعه‌ی واکسن-گیرنده TLR3 داکینگ شده

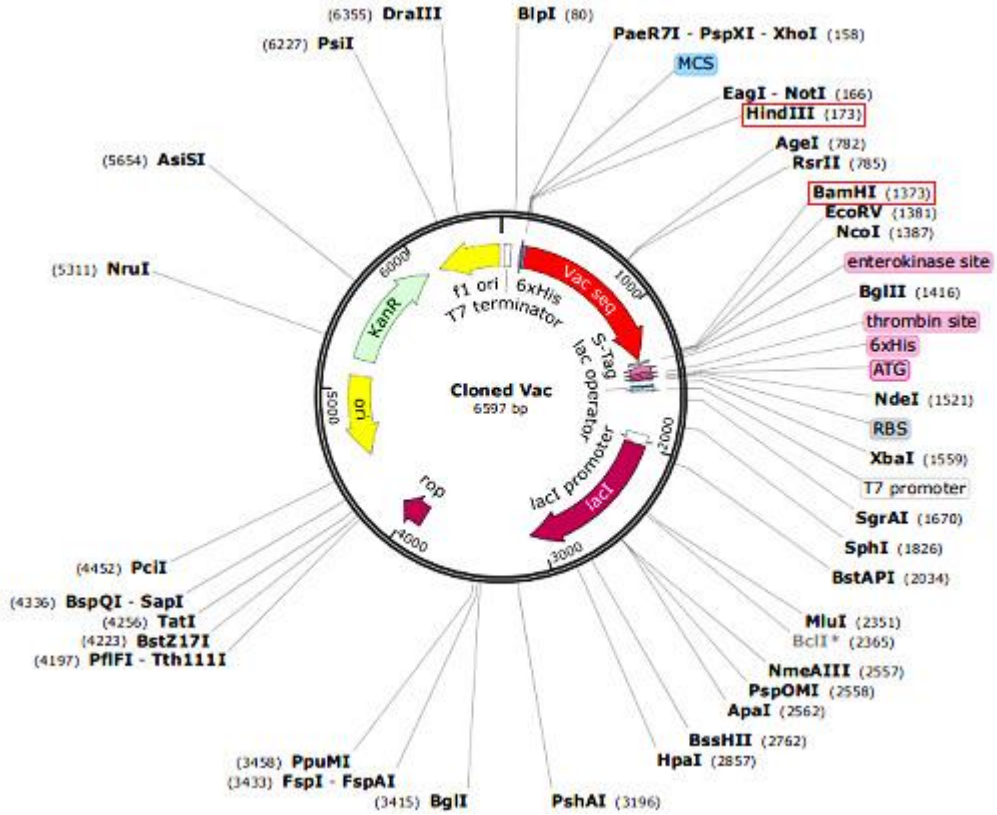
(الف) پیش‌بینی تحرک برهمکنش‌های لیگاند-گیرنده، (ب) تغییر شکل‌پذیری، (ج) ضریب B، (د) مقادیر ویژه تحرک NMA، (ه) واریانس، (و) ماتریس کوواریانس و (ز) تحلیل شبکه الاستیک

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

بهینه‌سازی کدون و کلونینگ in silico واکسن

پس از بهینه‌سازی کدون، توالی نوکلئوتیدی واکسن کاندید (توالی cDNA) برای سویه‌ی K12 باکتری *E. coli* به عنوان میزبان بیانی مشخص شد [۵۷]. در واقع بهینه‌سازی کدون با هدف حداکثر بیان پروتئین در سیستم میزبان انجام می‌شود. توالی بهینه شده به طول ۱۱۹۴ نوکلئوتید با مقدار شاخص سازگاری کدون ۰/۹۲۵۸ و محتوای گوانین–سیتوزین ۵۲/۱۷ به نوعی تأیید کننده پتانسیل بیان خوب این واکسن در میزبان مورد نظر است (برای بیان خوب پروتئین در سیستم میزبان، شاخص تطابق کدون (CAI) بیشتر از ۰/۸ یا نزدیک به ۱ [۷۳] و محتوای GC بین ۳۰ تا ۷۰٪ [۷۴]، لحاظ می‌شود). شکل ۶ خروجی نرم‌افزار SnapGene است که کلونینگ in silico سازه‌ی واکسن کاندید در درون ناقل pET-30a (+) و ایجاد یک پلاسمید نوترکیب را نشان می‌دهد.



شکل ٦: شبیه‌سازی in silico سازه نهایی واکسن در ناقل بیانی pET-30a (+)

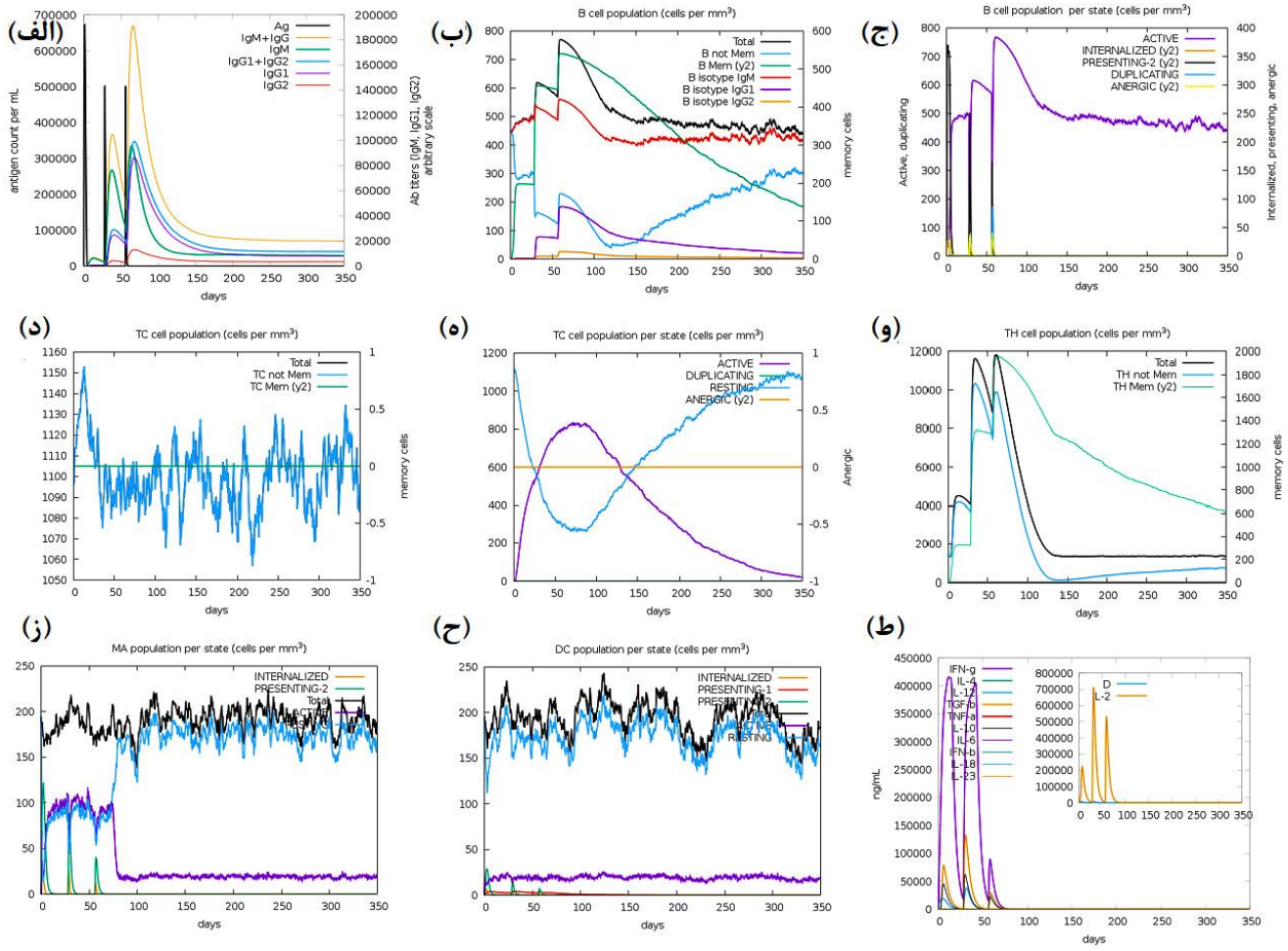
در این تصویر واکسن درج شده (نوار قرمز) و سایر بخش‌های ناقل نشان داده شده است.

شبیه‌سازی ایمنی

مشخصات ایمنی واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده در شکل ۷ نشان داده شده است. براساس نتایج شبیه‌سازی ایمنی، تجویز واکسن با ۳ تزریق ایمونوگلوبولین‌های IgM، IgM+IgG، IgG1+IgG2، IgG1 و IgG2 را القا می‌کند. به طور قابل‌توجهی پاسخ‌های دوم و سوم نسبت به پاسخ اول، ایمنی‌زایی بیشتری دارند. در طول پاسخ‌های دوم و سوم کاهش غلظت آنتی‌ژن با افزایش فعالیت ایمونوگلوبولین‌ها مطابقت دارد (تصویر الف). افزایش تشکیل انواع متعدد سلول B (تصویر ب و ج) و افزایش جمعیت سلول‌های T کشنده و کمک کننده در طول واکسیناسیون (تصویرهای د تا و) با هر تزریق قابل مشاهده است. علاوه بر این، افزایش فعالیت ماکروفاژها به شکل سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و دندریتیک شناسایی شد (تصویر ز و ح). همچنین سطوح بالای IFN-γ، IL-2، IL-23، IL-10 و IL-12 از فعال شدن یک پاسخ ایمنی کافی پشتیبانی می‌کنند (تصویر ط). به طوری کلی از این اطلاعات به دست آمده می‌توان این گونه استنباط کرد که با تزریق این واکسن ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و سلول‌های اپیتلیال فعال می‌شوند که قادر

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

به ارائه آنتی‌ژن در شیار تخصصی مولکول‌های MHC-I و MHC-II هستند. همچنین لنفوسیت‌های T کمک کننده (CD4+) و کشنده (CD8+) و سلول‌های NK در چند روز اول در مواجهه با واکسن طراحی‌شده فعال می‌شوند. از طرفی لنفوسیت‌های B و B پلاسما پس از فعال شدن، ایزوتیپ‌های IgM و IgG را ترشح می‌کنند و ترشح سیتوکین‌ها با هر تزریق افزایش می‌یابد. در نهایت این نمایه نشان می‌دهد که در کوتاه مدت، واکسن پاسخ ایمنی قوی ایجاد می‌کند و سطح حافظه ایمنی در مواجهه مکرر بعدی متعاقباً افزایش می‌یابد.



شکل ۷: پیش‌بینی شبیه‌سازی ایمنی در پاسخ به واکسن طراحی شده پس از سه دوره تزریق

(الف) برای نمایش سطح آنتی‌ژن و زیرگروه‌های ایمونوگلوبولین‌ها و همچنین درک بهتر رابطه‌ی آن‌ها، نمودارها با رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند. افزایش متناوب در جمعیت آنتی‌بادی‌ها پس از دوزهای دوم و سوم. (ب) جمعیت لنفوسیت‌های B بر حسب تعداد کل. (ج) جمعیت لنفوسیت‌های B در هر حالت. (د) جمعیت سلول‌های T کشنده. (ه) جمعیت سلول‌های T کشنده در هر حالت. (و) جمعیت سلول‌های T کمکی. (ز) جمعیت ماکروفاژها در هر حالت. (ح) جمعیت سلول‌های دندریتیک در هر حالت. (ط) غلظت سیتوکین‌ها و اینترلوکین‌ها در سه مرحله‌ی مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر همه‌گیری مرگبار COVID-19 ناشی از سویه‌های مختلف ویروس SARS-CoV-2، به عنوان یک معضل برای بهداشت جهانی مطرح بوده است [۷۵]. پس از تغییرات سریع به واسطه نوترکیبی در اجزای مختلف ژنوم، ویروس جدید به سرعت سلول‌های میزبان را آلوده می‌کند که باعث شکل‌گیری یک بیماری خطرناک با وضعیت نامشخص می‌شود [۷۶]. علیرغم تلاش‌های گسترده‌ای که در سراسر جهان برای مقابله با این ویروس صورت گرفته است، این بیماری هنوز به طور کامل قابل کنترل نیست [۷۷]. در دهه‌های گذشته، واکسیناسیون و ایمنی جمعی مؤثرترین رویکرد برای کاهش شدید اثرات منفی و ریشه‌کنی بیماری‌های عفونی مختلفی مانند آبله، فلج اطفال، سرخک، سرخجه، سیاه سرفه، اوریون، دیفتری و کزاز بوده است [۷۸]. در حال حاضر برای بیماری کرونا نیز واکسیناسیون به ابزاری مؤثر برای پیشگیری و ایجاد مصونیت تبدیل شده است. هر چند ظهور انواع ژنتیکی ناشی از جهش‌ها

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

به طور بالقوه می‌تواند واکسن‌های ساخته شده را تضعیف نماید به طوری که برخی از انواع سویه‌ها می‌توانند از پاسخ‌های ایمنی ناشی از واکسن‌ها و عفونت‌های قبلی فرار کنند [۷۹].

رویکرد اصلی در مطالعه حاضر متمرکز بر طراحی و ساخت یک واکسن چند اپی‌توپی در شرایط in silico با استفاده از مجموعه‌ای از ابزارهای بیوانفورماتیک و ایمونوانفورماتیک برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های القاکننده پاسخ‌های سیستم ایمنی (هومورال و سلولی) در برابر همه واریانت‌های جدید همیشه در حال تکامل و جهش یافته‌ی SARS-CoV-2 بوده است. با این حال، انتقال مکرر در سراسر جهان، بستری را برای جهش‌هایی که منجر به تغییر در ژنوم RNA این ویروس و متعاقباً ترجمه پروتئین‌های مختلف ویروسی می‌شوند، فراهم نموده است. از آنجایی که تغییر در یک اسید آمینه می‌تواند نتایج پیش‌بینی شده از آنالیز اپی‌توپ را تغییر دهد، این نوع جهش‌ها می‌توانند بر واکسن‌های مبتنی بر اپی‌توپ تأثیرگذار باشند [۸۰]. برای مقابله با این تغییرات با پیروی از مطالعاتی که توسط Almofti و همکاران و Oluwagbemi و همکاران انجام شده است [۲۴، ۸۱]، یک هم‌ترازی توالی چندگانه برای ۳۲ گلیکوپروتئین اسپایک SARS-CoV-2 اجرا شد تا هیچ جهشی در ناحیه اپی‌توپ‌های انتخاب شده وجود نداشته باشد (شکل ۱) که نشان‌دهنده اثربخشی این واکسن پیشنهادی است. پس از پیش‌بینی و شناسایی اپی‌توپ‌های سلول T و B کاملاً حفاظت شده، با بررسی یکسری از پارامترهای مختلف، بهترین اپی‌توپ‌های CTL، HTL و LBL انتخاب و با استفاده از لینکرهای متنوع به هم متصل شدند (جدول ۱ تا ۴). لینکرهای به کار گرفته شده در انعطاف‌پذیری، تا خوردگی، افزایش عرضه اپی‌توپ‌ها و جداسازی دمین‌های عملکردی نقش دارند، از این رو ساختار پروتئین را پایدارتر می‌کنند [۸۲]. همچنین وجود ادجوانت در ساختار واکسن طراحی شده در اثربخشی، دوام آنتی‌ژن‌ها و القای پاسخ‌های ایمنی قوی‌تر اهمیت دارد [۸۳].

در طراحی واکسن مبتنی بر اپی‌توپ برای جمعیت‌های انسانی که از نظر ژنتیکی ناهمگن هستند (پلی مورفیسم HLA)، بررسی دقیق پوشش جمعیتی اپی‌توپ‌های لنفوسیت‌های T (اپی‌توپ‌ها CTL و HTL) مورد نیاز است چرا که ممکن است افراد به مجموعه‌های مختلفی از پپتیدهای یک پاتوژن معین واکنش نشان دهند [۸۴]. اپی‌توپ‌های انتخاب شده در مطالعه حاضر درجه بالایی از پوشش جمعیتی را برای مناطق مورد نظر نشان دادند (جدول ۶)، از این‌رو واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده می‌تواند کاندیدی برای مقابله با SARS-CoV-2 در سطح جهانی باشد. نتایج آنالیز ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برای این ساختار همان‌طور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، توانایی آن به عنوان یک واکسن کاندیدای بالقوه‌ی مناسب را اثبات می‌کند. وزن مولکولی این سازه برای یک واکسن قابل قبول است که کارایی ساختار آن را نشان می‌دهد [۸۵]. مقدار pI نظری تخمین زده شده، برهمکنش pH فیزیولوژیکی پایدار را تضمین می‌کند. امتیازهای شاخص ناپایداری و شاخص آلیفاتیک نشان دادند که واکسن در برابر حرارت پایدار و مقاوم است. نمره مثبت میانگین کل هیدروپاتی به‌دست‌آمده بیانگر ماهیت آبدوستی و توانایی آن برای انحلال‌پذیری است. همچنین مشخص شد که واکسن چندپی‌توپی طراحی شده ایمنی‌زا، آنتی‌ژن، غیر حساسیت‌زا و غیر سمی است. پیش‌بینی ساختارهای دوم و سوم به درک بهتر ساختار واکسن طراحی شده کمک می‌کنند. با بررسی انواع الگوهای ساختاری خاص در یک زنجیره پلی پپتیدی اطلاعاتی در رابطه با پایداری و انعطاف‌پذیری آن به دست می‌آید. از طرفی دیگر ساختار سه‌بعدی آرایش فضایی خاص همه اسیدهای آمینه تشکیل دهنده اجزای واکسن را ارائه می‌کند که امکان مطالعه برهم‌کنش‌ها، دینامیک و عملکرد پروتئین را فراهم می‌نماید [۸۶]. همچنین پس از اصلاح مدل سه بعدی، ویژگی‌های مطلوب سازه به طور قابل توجهی بهبود یافت. کیفیت مدل پیش‌بینی شده با مقادیر شاخص‌های RMSD، روتامرهای ضعیف، امتیاز برخورد، MolProbity و نمودار راماچاندران مشخص می‌شود [۸۷]. روش‌های اعتبارسنجی نیز برای تشخیص خطاها در ساختار مدل‌سازی شده استفاده شده‌اند. نمرات ضریب کیفیت ERRAT و امتیاز Z ثابت کردند که مدل اصلاحی انتخاب شده از کیفیت مناسبی برخوردار است.

آنتی‌بادی‌ها (ایمونوگلوبولین‌ها) با شناسایی و اتصال به اپی‌توپ‌های سلول B موجود بر روی سطح آنتی‌ژن‌ها، پاسخ ایمنی را تحریک می‌کنند. توانایی تشخیص این جایگاه‌های اتصال در توالی یا ساختار فضایی آنتی‌ژن در ساخت واکسن‌های نوترکیب اهمیت دارد [۸۸]. در ساختار این واکسن نیز اپی‌توپ‌های B خطی و فضایی قرار دارند که ظرفیت آن برای ایجاد پاسخ‌های ایمنی هومورال تقویت‌شده را نشان می‌دهند (جدول ۵ و شکل ۲). وجود برهمکنش‌های کافی و مؤثر بین مولکول آنتی‌ژن و مولکول‌های گیرنده ایمنی برای تحریک پاسخ ایمنی ضروری است. داکینگ پروتئین–پروتئین برای ارزیابی

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

اتصال واکسن به گیرنده ایمنی TLR (TLR3) و تعیین ساختار کمپلکس پایدار تشکیل شده، اهمیت دارد [۸۹]. مدل‌هایی که کمترین انرژی‌های بین مولکولی و بالاترین پیوندها را نشان می‌دهند، انتخاب و تجسم شدند. براساس نتایج، پایداری و میل اتصال بالایی بین واکسن و TLR3 وجود دارد که این برهمکنش‌ها پتانسیل تحریک پاسخ ایمنی ذاتی و تطبیقی توسط واکسن طراحی شده را نشان می‌دهند (شکل ۴). بازده ترجمه برای ژن‌های خارجی در داخل سیستم میزبان بیانی به دلیل ناسازگاری کدون‌های mRNA متفاوت است [۹۰]. در نتیجه به منظور بهبود کارایی رونویسی، ترجمه و بیان کارآمد پروتئین نوترکیب در میزبان جدید، بهینه‌سازی کدون انجام می‌شود. مقدار CAI و محتوای درصد GC محاسبه شده برای توالی بهینه‌سازی شده بیانگر بیان کارآمد پروتئین نوترکیب است [۶۶]. نتایج پاسخ ایمنی شبیه‌سازی‌شده مشابه پدیده‌های ایمونولوژیک بدن انسان که با هدف درک پاسخ واقعی در شرایط in silico انجام می‌شوند، نشان دادند که پاسخ‌های ایمنی پس از تزریق واکسن دوم و سوم تقویت شده‌اند. همچنین بسیاری از ایمونوگلوبولین‌های متعلق به ایزوتیپ‌های مختلف نیز تولید شدند که به پیدایش سلول‌های حافظه کمک می‌کنند [۹۱]. از نتایج می‌توان دریافت که واکسن به طور مؤثر جمعیت سلول‌های T کمکی و کشنده را افزایش می‌دهد (شکل ۷). به طور کلی یافته‌های به دست آمده از ابزارهای مختلف محاسباتی و ایمونوانفورماتیک در این مطالعه نشان دادند که سازه طراحی شده به عنوان یک واکسن کاندید برای مقابله با سویه‌های مختلف SARS-CoV-2 کارآمد، پایدار و ایمن است.

در این مطالعه، مجموعه‌ای از رویکردهای محاسباتی به منظور شناسایی اپی‌توپ‌های بالقوه برای سلول‌های T (HTL و CTL) و B از پروتئین اسپایک سویه‌های مختلف SARS-CoV-2 به کار گرفته شده است. از آنجایی که اپی‌توپ‌های شناسایی شده در بین سویه‌های مختلف کاملاً حفاظت شده و مشترک هستند، می‌توانند در مطالعات آینده نیز مورد استفاده قرار گیرند. ارزیابی‌ها نشان دادند که این واکسن طراحی شده دارای خواص ایمنی مطلوب با پوشش جمعیتی بالا است. علاوه بر این می‌تواند به گیرنده‌های ایمنی متصل شود و همچنین پاسخ ایمنی قوی را در هنگام عفونت ایجاد کند. این قبیل تحقیقات می‌توانند هزینه‌ها و زمان لازم برای آنالیز واکسن‌ها را کاهش دهند و ارزش قابل توجهی در مدیریت COVID-19 و سایر بیماری‌های ناشناخته‌ای که ممکن است در آینده ظهور کنند، داشته باشند. با این حال، برای اطمینان از پتانسیل واقعی واکسن‌های طراحی شده و بررسی پیامدهای عملی، انجام مطالعات تکمیلی در شرایط in vitro و in vivo نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله مصوب دانشگاه تبریز و تحت حمایت آزمایشگاه مهندسی ژنتیک گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی و مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی اجرا شده است.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص این پژوهش وجود ندارد.

References

1. Bell D, Hansen KS, Kiragga AN, Kambugu A, Kissa J, Mbonye AK. Predicting the Impact of COVID-19 and the Potential Impact of the Public Health Response on Disease Burden in Uganda. Am J Trop Med Hyg 2020;103(3):1191-7. doi: 10.4269/ajtmh.20-0546.

2. World Health Organization (WHO). Weekly epidemiological update on COVID-19 [2023 Apr 1]. Available from: https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---6-april-2023

3. Yang R, Wu S, Wang S, Rubino G, Nickels JD, Cheng X. Refinement of SARS-CoV-2 envelope protein structure in a native-like environment by molecular dynamics simulations. Front Mol Biosci 2022:9:1027223. doi: 10.3389/fmolb.2022.1027223.

4. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. Cell 2020;181(2):281-92.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.

5. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature 2020;579(7798):265-9. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.

6. Magazine N, Zhang T, Wu Y, McGee MC, Veggiani G, Huang W. Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. Viruses 2022;14(3):640. doi: 10.3390/v14030640.

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

7. Sette A, Fikes J. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. Curr Opin Immunol 2003;15(4):461-70. doi: 10.1016/s0952-7915(03)00083-9.
8. Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-Tov DD, Tarnovitski Freund N, Weiss Y. Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. BioDrugs 2007;21(3):145-56. doi: 10.2165/00063030-200721030-00002.
9. Hastie KM, Li H, Bedinger D, Schendel SL, Dennison SM, Li K, et al. Defining variant-resistant epitopes targeted by SARS-CoV-2 antibodies: A global consortium study. Science 2021;374(6566):472-8. doi: 10.1126/science.abh2315.
10. Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, Buus S, Lund O, Nielsen M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. BMC Bioinformatics 2007:8:424. doi: 10.1186/1471-2105-8-424.
11. Moutaftsi M, Peters B, Pasquetto V, Tscharke DC, Sidney J, Bui HH, et al. A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus. Nat Biotechnol 2006;24(7):817-9. doi: 10.1038/nbt1215.
12. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics 2007:8:4. doi: 10.1186/1471-2105-8-4.
13. Calis JJ, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. PLoS Comput Biol 2013;9(10):e1003266. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003266.
14. Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP v.2--a server for in silico prediction of allergens. J Mol Model 2014;20(6):2278. doi: 10.1007/s00894-014-2278-5.
15. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. PLoS One 2013;8(9):e73957. doi: 10.1371/journal.pone.0073957.
16. Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. Immunology 2018;154(3):394-406. doi: 10.1111/imm.12889.
17. Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. BMC Bioinformatics 2010;11:568. doi: 10.1186/1471-2105-11-568.
18. Nagpal G, Usmani SS, Dhanda SK, Kaur H, Singh S, Sharma M, et al. Computer-aided designing of immunosuppressive peptides based on IL-10 inducing potential. Sci Rep 2017:7:42851. doi: 10.1038/srep42851.
19. Oladipo EK, Adeniyi MO, Ogunlowo MT, Irewolede BA, Adekanola VO, Oluseyi GS, et al. Bioinformatics Designing and Molecular Modelling of a Universal mRNA Vaccine for SARS-CoV-2 Infection. Vaccines (Basel) 2022;10(12):2107. doi: 10.3390/vaccines10122107.
20. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. J Mol Recognit 2008;21(4):243-55. doi: 10.1002/jmr.893.
21. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. Nucleic Acids Res 2017;45(W1):W24-W9. doi: 10.1093/nar/gkx346.
22. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 2007;23(21):2947-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
23. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol 2018;35(6):1547-9. doi: 10.1093/molbev/msy096.
24. Almofti YA, Abd-Elrahman KA, Eltilib EEM. Vaccinomic approach for novel multi epitopes vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). BMC Immunol 2021;22(1):22. doi: 10.1186/s12865-021-00412-0.
25. Bui HH, Sidney J, Dinh K, Southwood S, Newman MJ, Sette A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. BMC Bioinformatics 2006;7:153. doi: 10.1186/1471-2105-7-153.
26. Mahmud S, Rafi MO, Paul GK, Promi MM, Shimu MSS, Biswas S, et al. Designing a multi-epitope vaccine candidate to combat MERS-CoV by employing an immunoinformatics approach. Sci Rep 2021;11(1):15431. doi: 10.1038/s41598-021-92176-1.
27. Singh A, Thakur M, Sharma LK, Chandra K. Designing a multi-epitope peptide-based vaccine against SARS-CoV-2. Sci Rep 2020;10(1):16219. doi: 10.1038/s41598-020-73371-y.
28. Chauhan V, Rungta T, Goyal K, Singh MP. Designing a multi-epitope-based vaccine to combat Kaposi Sarcoma utilizing immunoinformatics approach. Sci Rep 2019;9(1):2517. doi: 10.1038/s41598-019-39299-8.
29. Pandey RK, Ojha R, Aathmanathan VS, Krishnan M, Prajapati VK. Immunoinformatics approaches to design a novel multi-epitope subunit vaccine against HIV infection. Vaccine 2018;36(17):2262-72. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.03.042.
30. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Matsumoto K, et al. Antimicrobial peptides human β-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. Eur J Immunol 2007; 37(2): 434-44. https://doi.org/10.1002/eji.200636379
31. Ahmad TA, Eweida AE, Sheweita SA. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics. Trials in Vaccinology 2016; 5: 71-83. https://doi.org/10.1016/j.trivac.2016.04.003
32. Magnan CN, Zeller M, Kayala MA, Vigil A, Randall A, Felgner PL, et al. High-throughput prediction of

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

protein antigenicity using protein microarray data. Bioinformatics 2010;26(23):2936-43. doi: 10.1093/bioinformatics/btq551.
33. Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. Bioinformatics 2014;30(6):846-51. doi: 10.1093/bioinformatics/btt619.
34. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, editors. The Proteomics Protocols Handbook, New York: Humana Press; 2005. p. 571-607. https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571
35. Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. Bioinformatics 2017; 33(19): 3098-100. doi: 10.1093/bioinformatics/btx345
36. Magnan CN, Randall A, Baldi P. SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. Bioinformatics 2009; 25(17): 2200-7. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp386
37. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol 2001;305(3):567-80. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.
38. Nielsen H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. Methods Mol Biol 2017:1611:59-73. doi: 10.1007/978-1-4939-7015-5_6.
39. Buchan DWA, Jones DT. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. Nucleic Acids Res 2019;47(W1):W402-W7. doi: 10.1093/nar/gkz297.
40. Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. Comput Appl Biosci 1995; 11(6):681-4. doi: 10.1093/bioinformatics/11.6.681
41. Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. Nucleic Acids Res 2004;32(Web Server issue):W526-31. doi: 10.1093/nar/gkh468.
42. Ko J, Park H, Heo L, Seok C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. Nucleic Acids Res 2012;40(Web Server issue):W294-7. doi: 10.1093/nar/gks493.
43. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Res 2007;35(Web Server issue):W407-10. doi: 10.1093/nar/gkm290.
44. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. Protein Sci 1993;2(9):1511-9. doi: 10.1002/pro.5560020916
45. Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. Science 1991;253(5016):164-70. doi: 10.1126/science.1853201.
46. Pontius J, Richelle J, Wodak SJ. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. J Mol Biol 1996;264(1):121-36. doi: 10.1006/jmbi.1996.0628.
47. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS. Tornton JM. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. J Appl Cryst 1993; 26: 283–91. https://doi.org/10.1107/S0021889892009944
48. Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE. Errors in protein structures. Nature1996;381(6580):272. doi: 10.1038/381272a0.
49. Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. Protein Sci 2018;27(1):129-34. doi: 10.1002/pro.3289.
50. DeLano WL. Pymol: An open-source molecular graphics tool. CCP4 Newsletter on Protein Crystallography 2002; 40(1): 82–92.
51. Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. BMC Bioinformatics 2008:9:514. doi: 10.1186/1471-2105-9-514.
52. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, et al. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. Proteins 2017; 85(3): 435-44. doi: 10.1002/prot.25219
53. 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. doi: 10.1093/nar/gki481.
54. Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. Proteins 2007;69(1):139-59. doi: 10.1002/prot.21495.
55. López-Blanco JR, Aliaga JI, Quintana-Ortí ES, Chacón P. iMODS: internal coordinates normal mode analysis server. Nucleic Acids Res 2014;42(Web Server issue):W271-6. doi: 10.1093/nar/gku339.
56. Bansal S, Dalrymple O, Gaffar A. Design, development, and implementation of the instructional module development system (IMODs). 122nd ASEE Annual conference and Exposition; 2015 Jun 14-17. Seattle, WA: American Society for Engineering Education; 2015.
57. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. Nucleic Acids Res 2005;33(Web Server issue):W526-31. doi: 10.1093/nar/gki376.
58. Smith CL, Econome JG, Schutt A, Klco S, Cantor CR. A physical map of the Escherichia coli K12 genome. Science 1987;236(4807):1448-53. doi: 10.1126/science.3296194.
59. Sharp PM, Li WH. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. Nucleic Acids Res 1987; 15(3): 1281-95. doi: 10.1093/nar/15.3.1281

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

60. Samad A, Ahammad F, Nain Z, Alam R, Imon RR, Hasan M, et al. Designing a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach. J Biomol Struct Dyn 2022; 40(1): 14-30. doi: 10.1080/07391102.2020.1792347
61. Tahir Ul Qamar M, Shahid F, Aslam S, Ashfaq UA, Aslam S, Fatima I, et al. Reverse vaccinology assisted designing of multiepitope-based subunit vaccine against SARS-CoV-2. Infect Dis Poverty 2020;9(1):132. doi: 10.1186/s40249-020-00752-w.
62. Rapin N, Lund O, Bernaschi M, Castiglione F. Computational immunology meets bioinformatics: the use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. PLoS One 2010; 5(4): e9862. doi: 10.1371/journal.pone.0009862
63. Jalal K, Abu-Izneid T, Khan K, Abbas M, Hayat A, Bawazeer S, et al. Identification of vaccine and drug targets in Shigella dysenteriae sd197 using reverse vaccinology approach. Sci Rep 2022;12(1):251. doi: 10.1038/s41598-021-03988-0.
64. Ong E, Wang H, Wong MU, Seetharaman M, Valdez N, He Y. Vaxign-ML: supervised machine learning reverse vaccinology model for improved prediction of bacterial protective antigens. Bioinformatics 2020;36(10):3185-91. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa119.
65. Kathwate GH. In silico Design and Characterization of Multi-epitopes Vaccine for SARS-CoV2 from Its Spike Protein. Int J Pept Res Ther 2022;28(1):37. doi: 10.1007/s10989-021-10348-z.
66. Kar T, Narsaria U, Basak S, Deb D, Castiglione F, Mueller DM, et al. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. Sci Rep 2020;10(1):10895. doi: 10.1038/s41598-020-67749-1.
67. Heo L, Park H, Seok C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. Nucleic Acids Res. 2013; 41(Web Server issue): W384-8. https://doi.org/10.1093/nar/gkt458
68. Dong R, Chu Z, Yu F, Zha Y. Contriving Multi-Epitope Subunit of Vaccine for COVID-19: Immunoinformatics Approaches. Front Immunol 2020:11:1784. doi: 10.3389/fimmu.2020.01784.
69. Messaoudi A, Belguith H, Ben Hamida J. Homology modeling and virtual screening approaches to identify potent inhibitors of VEB-1 β-lactamase. Theor Biol Med Model 2013:10:22. doi: 10.1186/1742-4682-10-22.
70. Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. J Mol Biol 1963:7:95-9. doi: 10.1016/s0022-2836(63)80023-6.
71. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. Proteins 2003;50(3):437-50. doi: 10.1002/prot.10286.
72. Minch MJ. An introduction to hydrogen bonding New York: Oxford University Press; 1997.
73. Morla S, Makhija A, Kumar S. Synonymous codon usage pattern in glycoprotein gene of rabies virus. Gene 2016;584(1):1-6. doi: 10.1016/j.gene.2016.02.047.
74. Ali M, Pandey RK, Khatoon N, Narula A, Mishra A, Prajapati VK. Exploring dengue genome to construct a multi-epitope-based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. Sci Rep 2017;7(1):9232. doi: 10.1038/s41598-017-09199-w.
75. Yang Z, Bogdan P, Nazarian S. An in silico deep learning approach to multi-epitope vaccine design: a SARS-CoV-2 case study. Sci Rep 2021;11(1):3238. doi: 10.1038/s41598-021-81749-9.
76. de Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, van Hemert MJ. Host Factors in Coronavirus Replication. Curr Top Microbiol Immunol. 2018:419:1-42. doi: 10.1007/82_2017_25.
77. Guo S, Liu K, Zheng J. The Genetic Variant of SARS-CoV-2: would It Matter for Controlling the Devastating Pandemic? Int J Biol Sci 2021; 17(6): 1476-85. doi: 10.7150/ijbs.59137
78. Roush SW, Murphy TV; Vaccine-Preventable Disease Table Working Group. Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. JAMA 2007;298(18):2155-63. doi: 10.1001/jama.298.18.2155.
79. Callaway E. Fast-spreading COVID variant can elude immune responses. Nature 2021;589(7843):500-1. doi: 10.1038/d41586-021-00121-z.
80. Islam MR, Hoque MN, Rahman MS, Alam ASMRU, Akther M, Puspo JA, et al. Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity. Sci Rep 2020;10(1):14004. doi: 10.1038/s41598-020-70812-6.
81. Oluwagbemi OO, Oladipo EK, Kolawole OM, Oloke JK, Adelusi TI, Irewolede BA, et al. Bioinformatics, Computational Informatics, and Modeling Approaches to the Design of mRNA COVID-19 Vaccine Candidates. Computation 2022; 10(7): 117. https://doi.org/10.3390/computation10120211
82. Nezafat N, Ghasemi Y, Javadi G, Khoshnoud MJ, Omidinia E. A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: an in-silico approach. J Theor Biol 2014:349:121-34. doi: 10.1016/j.jtbi.2014.01.018.
83. Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. Immune Netw 2015; 15(2): 51-7. doi: 10.4110/in.2015.15.2.51
84. Oyarzun P, Kobe B. Computer-aided design of T-cell epitope-based vaccines: addressing population coverage. Int J Immunogenet 2015; 42(5): 313-21. https://doi.org/10.1111/iji.12214
85. Chukwudozie OS, Gray CM, Fagbayi TA, Chukwuanukwu RC, Oyebanji VO, Bankole TT, et al. Immuno-informatics design of a multimeric epitope peptide-based vaccine targeting SARS-CoV-2 spike glycoprotein. PLoS One 2021;16(3):e0248061. doi: 10.1371/journal.pone.0248061.
86. Durdagi S, Tahir Ul Qamar M, Salmas RE, Tariq Q, Anwar F, et al. Investigating the molecular mechanism of staphylococcal DNA gyrase inhibitors: A combined ligand-based and structure-based resources pipeline. J Mol Graph Model 2018:85:122-9. doi: 10.1016/j.jmgm.2018.07.010.

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]
[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]

87. Gopalakrishnan K, Sowmiya G, Sheik SS, Sekar K. Ramachandran plot on the web (2.0). Protein Pept Lett 2007;14(7):669-71. doi: 10.2174/092986607781483912.
88. Galanis KA, Nastou KC, Papandreou NC, Petichakis GN, Pigis DG, Iconomidou VA. Linear B-Cell Epitope Prediction for In Silico Vaccine Design: A Performance Review of Methods Available via Command-Line Interface. Int J Mol Sci 2021;22(6):3210. doi: 10.3390/ijms22063210.
89. Abraham Peele K, Srihansa T, Krupanidhi S, Ayyagari VS, Venkateswarulu TC. Design of multi-epitope vaccine candidate against SARS-CoV-2: a in-silico study. J Biomol Struct Dyn 2021;39(10):3793-801. doi: 10.1080/07391102.2020.1770127.
90. Pandey RK, Bhatt TK, Prajapati VK. Novel Immunoinformatics Approaches to Design Multi-epitope Subunit Vaccine for Malaria by Investigating Anopheles Salivary Protein. Sci Rep 2018; 8(1): 1125. doi:10.1038/s41598-018-19456-1
91. Khalid K, Irum S, Ullah SR, Andleeb S. In-Silico Vaccine Design Based on a Novel Vaccine Candidate Against Infections Caused by Acinetobacter baumannii. Int J Pept Res Ther 2022;28(1):16. doi: 10.1007/s10989-021-10316-7.

[Downloaded from jhbmi.ir on 2026-11-09]

[DOI: 10.34172/jhbmi.2023.31]