

Research Paper


Design of Immunosuppressive Structure Based on Spike Protein (s) virus Corona



Saeed Pirmoradi^{*1} , Hedieh Jafari² 

1. Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran.



Citation: Pirmoradi S, Jafari H. [Design of Immunosuppressive Structure Based on Spike Protein (s) virus Corona (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2022; 25(4):596-615. <https://doi.org/10.32598/JAMS.24.4.6377.1>
 <https://doi.org/10.32598/JAMS.24.4.6377.1>



ABSTRACT

Article Info:

Received: 29 Nov 2020

Accepted: 22 Jun 2021

Available Online: 01 Nov 2022

Keywords:

Corona Virus,
Spike Protein,
Immunogenic
Structure, Insilico

Background and Aim The human coronavirus is a member of the Coronaviridae family and causes upper respiratory tract infections. Despite repeated severe epidemics and the lack of appropriate antiviral drugs, not much progress has been made on the epitope-based vaccine designed for HCoV.

Methods & Materials The method of this study was to select the spike corona virus protein sequence from NCBI, retrieve the protein sequence and determine the T, B epitopes required to produce the chimer vaccine, evaluate the antigenicity and allergenicity and toxicity of the selected epitopes, respectively. Different servers were designed to configure the primary chimer composition of the epitope vaccine. Then, the chimer vaccine was evaluated in terms of structure and connectivity to B cells and MHC I and II compounds, and the two-dimensional structure and position of amino acids and bonds in the immunogenic model were studied, as well as the physicochemical and stability of the model vaccine by some other servers. Finally, it was tested for binding against HLA molecules using silico docking techniques to investigate the interaction with the epitope.

Ethical Considerations All ethical principles are considered in this article. Participants were informed about the research objective and its implementation stages. They also made sure their information was confidential. The principles of the Helsinki Convention were also observed.

Results The results showed that the immunogenic construct created in terms of two-dimensional and three-dimensional structure and the position of amino acids and bonds in the model of immunogenic structure, toxicity and allergenicity and antigenicity were in good condition. And had stability (instability index 33.93) and favorable half-life and suitable physicochemical conditions.

Conclusion In general, the immunogenic structure that was prepared in this research process could have a favorable interaction with some components of the immune system (HLA) in the docking process, which indicates the optimal identification of this structure by the humoral and cellular immune system and stimulation in order to produce immunity in the body of the host, of course, more reliable proof of it requires clinical phase processes.

Extended Abstract

C

1. Introduction

Coronaviruses are among the causes of upper respiratory tract infections first

observed in China [1]. Currently, due to multiple biological problems caused by it [3], effective preventions are required; however, there remains no reliable treatment or vaccine to treat HCoV infection. It is essential to develop a vaccine or medication to spread the disease caused by the virus. Immunogenetic/bioinform-

* Corresponding Author:

Saeed Pirmoradi, PhD

Address: Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Tel: +98 (916) 8881639

E-mail: pirmoradi150@gmail.com

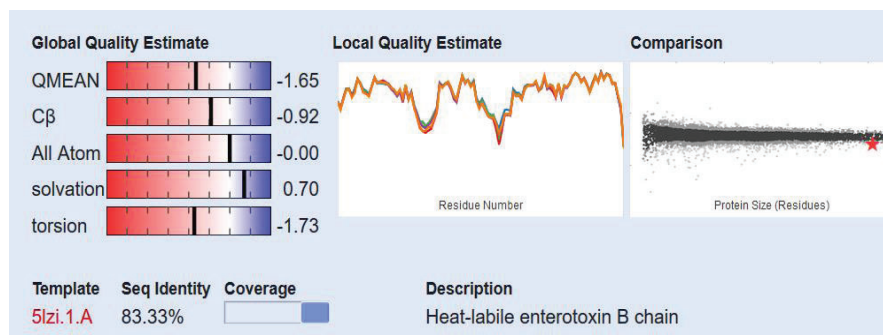


Figure 1. Image from the evaluation of Local Quality Estimate, Z-score, comparison indicators The third structure of the model vaccine produced using SWISSMODEL software

matics-based approaches to vaccine development are determined and used to create new vaccines. Despite repeated severe epidemics and inappropriate medication, little progress has been made on the epitope-based vaccine for HCoV. Therefore, using rapid advances in the sequencing of pathogen genomes and protein sequencing databases and the prompt and flexible approach of insilico methods have become prevalent in the design of vaccines, which led us to design this research.

2. Materials & methods

In this study, the sequence of protein spike coronavirus were selected from NCBI, protein sequence retrieval was determined. Besides, specific T and B cell epitopes required for producing the Chimber vaccine were obtained using servers such as IEDB. The selected epitopes' antigenicity, allergenicity, and toxicity were further investigated by other servers, such as VaxiJenv2.0, AllerTOP, and Toxinpred [8, 9]. The initial chimera composition of the epitope vaccine was then configured with the help of unique linkers. Then, to evaluate the structure of the Bimer vaccine concerning structure and connectivity to B cells and MHC I, II

compounds; to study the two-dimensional structure and position of amino acids and bonds in the model of the immunogenic system; also exploring the physicochemical and stability of the model vaccine by other software bioinformatics servers, like PRABI, protParam was paid. Finally, for binding against HLA molecules, silico docking techniques were examined to evaluate the interaction with the epitope through the Cluspro server.

3. Results

The obtained results indicated that the safety structure created in terms of the insilico evaluations of two-dimensional structures and especially in terms of having a sufficient percentage of the alpha helix was in good condition. Furthermore, its three-dimensional structure has a similarity of 83.33 with the composition of structures structured in the SWISSMODEL server (Figure 1). Moreover, in checking the percentage of the optimal placement of amino acids and bonds by PROCHECK server with (99.6), the rate of optimal placement of amino acids in the chimera structure was created. Besides, the created chimeric structure was non-toxic and allergenic and had a good antigenicity, i.e., confirmed by bioinformatics software.

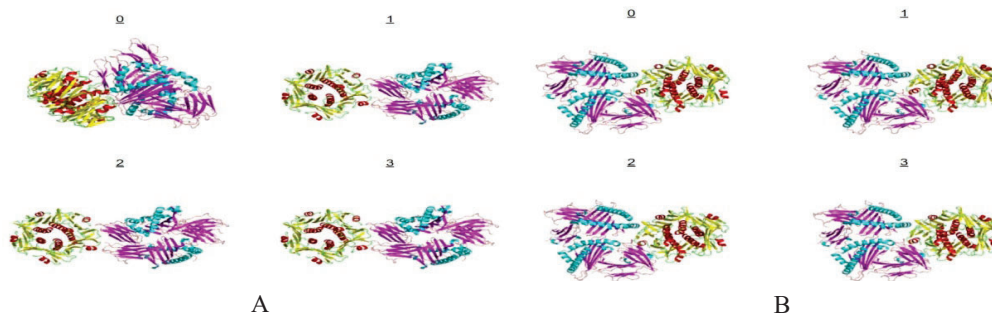


Figure 2. A: Image of docking between HLA-A0201 alleles for MHC I class with structural safety model created by Cluspro software B: Image of HLA-DRB1-0101 allele docking for MHC II class with structural safety model created by Cluspro software

The immunogenic chimeric structure was formed as a stable compound (instability index 33.93) and had a favorable half-life and suitable physicochemical conditions respecting solubility.

4. Discussion and conclusion

Developing new and timely vaccines to protect against the increasing global disease burden is very important [30]. Therefore, integrated computational approaches can predict candidates for immunogenic structures (vaccines) against pathogens, including HCoV, using valid methods previously described. The immunogenic structure prepared in this research process after confirming the physicochemical conditions and two-dimensional and three-dimensional structures and immunogenicity and angiogenesis [22, 23] in the docking process could favorably interact with some components of the selected immune system (HLA) with high frequency (HLA-A0201 and HLA-DRB1-0101) in populations. Accordingly, it indicates the optimal identification of this immunogenic structure by the two main parts of the immune system called humoral immunity and cellular immunity and stimulation to produce immunogenicity in the host body. This promises good immunity in the host body. However, further proof of these results requires clinical phase processes [27, 28, 29].

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All ethical principles are considered in this article. Participants were informed about the research objective and its implementation stages. They also made sure their information was confidential. The principles of the Helsinki Convention were also observed.

Funding

This research did not receive any financial assistance from financial organizations in the public, commercial or non-profit sectors and is a personal project.

Authors' contributions

All authors met the standard writing standards based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Publishers.

Conflicts of interest

The authors stated no conflicts of interest.

Acknowledgements

We would like to thank appreciation and thanks the professors of the Faculty of Veterinary Medicine of Shahid Chamran University of Ahvaz who had the necessary cooperation to prepare this research work.

مقاله پژوهشی

طراحی سازه ایمنی‌زا بر اساس پروتئین اسپایک (S) ویروس کرونا

*سعید پیرمرادی^۱، هدیه جعفری^۲

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: کرونا ویروس انسانی یکی از اعضای خانواده کروناویریده و عامل ایجاد کننده عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی است. با وجود شیوع چندین باره شدید اپیدمی و عدم داروی ضدویروسی مناسب، اما هنوز پیشرفت زیادی در رابطه با واکسن مبتنی بر اپی‌توپ که برای HCoV طراحی شده، حاصل نشده است.

مواد و روش‌ها: روش کار در این مطالعه این گونه بود که به ترتیب با انتخاب توالی پروتئین اسپایک کرونا ویروس از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی، بازایی توالی پروتئین و تعیین اپی‌توپ‌های B، T مورد نیاز برای تولید واکسن کایمر، بررسی آنتی‌ژن‌سیسته و ال‌ژن‌سیسته و توکسیسیته اپی‌توپ‌های انتخابی توسط سرورهای مختلف، پیکربندی ترکیب کایمر اولیه از واکسن اپی‌تویی طراحی شد. سپس به ارزیابی واکسن کایمر از نظر ساختاری و قابلیت اتصال به سلول‌های B و ترکیبات II، MHCI و بررسی ساختار دوپعدی و جایگاه امینواسیدها و پیوندها در مدل سازه ایمنی‌زا و نیز بررسی فیزیک و شیمیایی و پایداری واکسن مدل توسط برخی سرورهای دیگر پرداخته شد. در نهایت، سپس برای اتصال در برابر مولکول‌های آنتی‌ژن‌های لکوسیته انسانی، با استفاده از تکنیک‌های داکینگ ملکولی برای بررسی اثر متقابل با اپی‌توپ آزمایش شد.

ملاحظات اخلاقی: تمامی اصول اخلاقی در این مقاله در نظر گرفته شده است. شرکت‌کنندگان در جریان هدف تحقیق و مراحل اجرای آن قرار گرفتند. آنها همچنین از محرمانه بودن اطلاعات خود اطمینان داشتند. اصول کنوانسیون هلسینکی نیز رعایت شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل بیانگر آن بودند که سازه ایمنی‌زای ایجاد شده از لحاظ ساختار دوپعدی و سه‌بعدی و جایگاه امینواسیدها و پیوندها در مدل سازه ایمنی‌زا، سمیت و ال‌ژن بودن و آنتی‌ژن‌سیسته در شرایط مطلوبی قرار داشت و دارای پایداری (شاخص ناپایداری ۳۳/۹۳) و نیمه عمر مطلوب و شرایط فیزیک و شیمیایی مناسبی بود.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی سازه ایمنی‌زایی که در این فرایند پژوهشی تهیه شد، توانست در فرایند داکینگ برهم‌کنش مطلوبی با برخی از اجزای سیستم ایمنی آنتی‌ژن‌های لکوسیته انسانی داشته باشد که این بیانگر شناسایی مطلوب این سازه توسط سیستم ایمنی هومورال و سلولی بدن و تحریک آن‌ها در جهت تولید ایمنی در بدن شخص میزبان است که البته اثبات مطمئن‌تر آن نیازمند فرایندهای فاز بالینی است.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۰۹ آذر ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۰۱ تیر ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها:

کرونا ویروس، پروتئین اسپایک، سازه ایمنی‌زا

مقدمه

ویروس‌های گروه A از عوامل بیماری‌زای حیوانات، از جمله ویروس اسهال اپیدمی خوک و ویروس پریتونیت عفونی گربه هستند. ویروس‌های گروه II مسئول عفونت‌های بیماری‌زا در حیوانات خانگی هستند و ویروس‌های گروه آخر (III) مسئول عفونت پرندگان هستند [۱].

مولکول‌های پروتئینی که معمولاً در ساختار همه ویروس‌ها نقش دارند، سنبله^۱، پوششی^۲، غشای^۳ و نوکلئوکپسید^۴ هستند.

کرونا ویروس انسانی متعلق به خانواده کروناویریده^۱ (آلفاکروناویروس^۲) است [۱] و گروه بزرگی از ویروس‌های دارای آران‌ای^۳ تک‌ رشته پوشش‌دار مثبت را شامل می‌شود. این ویروس دارای بزرگ‌ترین ژنوم شناخته شده آران‌ای ویروس‌ها است. معمولاً کرونا ویروس‌ها، بر اساس واکنش متقابل سرولوژیکی به سه گروه (گروه I تا III) طبقه‌بندی می‌شوند. این نوع طبقه‌بندی در آن‌ها توسط تجزیه و تحلیل تکاملی پشتیبانی می‌شود.

4. Spike protein
5. Envelope protein (E)
6. Membrane protein
7. Nucleocapsid

1. Coronaviridae
2. Alphacoronavirus
3. RNA virus

* نویسنده مسئول:

دکتر سعید پیرمرادی

نشانی: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه بیوشیمی.

تلفن: ۸۸۸۱۶۳۹ (۹۱۶) ۹۸+

رایانامه: pirmoradi150@gmail.com

کروناویروس انسانی^۸ یا HCoV معمولاً یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی و همچنین عامل ایجادکننده «ذات الریه پنومونی^۹» هستند که برای اولین بار در جمهوری خلق چین مشخص شد.

امروزه به خاطر مشکلات زیستی زیاد ناشی از آن‌ها لازم است [۴] یک پیشگیری مؤثر برای کوروناویروس انسانی ایجاد شود. این در حالی است که در حال حاضر، هیچ درمانی یا واکسنی در دسترس برای درمان عفونت ناشی از کوروناویروس انسانی وجود ندارد. با توجه به گسترش روزافزون عفونت ناشی از این ویروس، ایجاد واکسن یا داروهای ضدویروسی علیه عفونت‌های HCoVs بسیار مهم است.

در سال‌های اخیر یک سری رویکرد جدید با استفاده از فرایندهای مبتنی بر ایمونوژنتیک^{۱۰}، ایمونونومیک^{۱۱} و بیوانفورماتیک^{۱۲} یا برای توسعه واکسن‌ها به‌عنوان واکسنونومیکس شناخته شده‌اند که از این روش برای تولید واکسن‌های جدید استفاده‌های زیادی شده و در حال انجام است. رویکرد مرسوم در حال حاضر برای توسعه واکسن بر بیان آنتی‌ژن در مقدار کافی و از مدل‌های کشت آزمایشگاهی متکی است.

با این حال، بسیاری از آنتی‌ژن‌ها، اگرچه به میزان کافی بیان شده‌اند، اما شاید کاندیداهای خوبی برای واکسن نباشند. با استفاده از رویکردهای متعارف گذشته، کنترل انواع مختلف شیوع پاتوژن‌های ویروسی مانند سویه‌های آنفلوآنزای مرغی و پرنده‌گان اخیر به دلیل روند توسعه زمان بر آن‌ها، ممکن نیست. از این رو، با استفاده از پیشرفت سریع در توالی‌یابی بسیاری از ژنوم‌های پاتوژن و پایگاه داده‌های توالی پروتئین، رویکرد سریع و انعطاف‌پذیر این سیلیکو^{۱۳} محبوبیت زیادی کسب کرد. رویکرد «واکسنونومیک» در حال حاضر ثابت شده که برای مبارزه با بیماری‌هایی از قبیل ام اس یا مولتیپل اسکلروزیس^{۱۴}، مالاریا^{۱۵} و تومورها^{۱۶} ضروری است [۴-۶].

با این حال، روش‌های توسعه واکسن معمولاً از طریق شناسایی لیگاندهای آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی^{۱۷} انجام می‌شود [۷]. ارزیابی آرزوی‌زایی یکی از مراحل اساسی در ساخت واکسن‌های پپتیدی است، زیرا وقتی واکسن را وارد بدن انسان می‌کنیم،

به‌عنوان یک ماده خارجی تشخیص داده می‌شود. در نتیجه، التهاب رخ می‌دهد و یک واکنش آلرژیک ایجاد می‌کند. برای پیش‌بینی اپی‌توپ سلول B، آب‌گریزی یک معیار مهم است که معمولاً در ناحیه پیچ بتا است. این ارزیابی‌ها، احتمال ایجاد کاندیداهای مطلوب واکسن را تقویت می‌کند.

بنابراین در مطالعه حاضر با استفاده از رویکرد واکسنونومیک، یک واکسن پپتیدی مبتنی بر اپی‌توپ علیه پروتئین اسپایک کرونا ویروس انسانی طراحی شد که از محققان در آزمایشگاه‌های مربوطه خود انتظار می‌رود که با آزمایشات مطلوب پیش‌بینی ما در مورد واکسن طراحی شده را بتوانند تأیید کنند.

موادها و روش‌ها

انتخاب توالی پروتئین اسپایک^{۱۸} کرونا ویروس

پایگاه داده ویرال زون^{۱۹}، پایگاه داده‌ای بیوانفورماتیک اکس‌پاسی^{۲۰} و پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی^{۲۱} منابع مهم برای انتخاب توالی پروتئین‌های HCoVs و اطلاعات مرتبط با آن‌ها از جمله جنس، خانواده، میزبان، انتقال، بیماری، ژنوم و پروتئوم هستند.

بازیابی توالی پروتئین

پروتئین غشای بیرونی (پروتئین سنبله) اسپایک، توالی HCoV از پایگاه داده‌های مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی بازیابی شد. سپس تمام توالی در فرمت FASTA برای تحلیل و بررسی بیشتر ذخیره شدند و باید از لحاظ سینگال پپتید^{۲۲} نیز توسط SignalP بررسی شوند و اگر سیگنال پپتید داشت، حذف شود. ما برای انجام فرایند طراحی واکسن بر مبنای اپی‌توپ‌های^{۲۳} پپتیدی از روش پیش‌بینی اپی‌توپ‌ها استفاده کردیم. در این روش از دیتابیس IEDB استفاده کردیم. در این دیتابیس با تعیین عناصر مربوطه و انتخاب پروتئین مورد نظر و سابمیت کردن آن در این سرور، به تعداد زیادی از اپی‌توپ‌های بر مبنای سلول B و MHCI سرور، دسترسی پیدا می‌کنیم. سپس از بین این اپی‌توپ‌های ارائه‌شده تک تک به بررسی اپی‌توپ‌های مورد نظر پرداخته و از بین آن‌ها تعدادی را به‌عنوان نمونه برای ایجاد سازه ایمنی‌زا انتخاب شد.

8. Human coronavirus (HCoV)

9. Pneumonia

10. Immunogenetic

11. Immunogenomic

12. Bioinformatics

13. Insilico

14. Multiple Sclerosis/ Encephalomyelitis Disseminata

15. Malaria

16. Tumeur

17. Human Leukocyte Antigens

18. Spike protein

19. Viral Zone

20. Expasy

21. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

22. Signal peptide

23. Epitope

داشتن آلفا هلیکس و صفحات بتا و پیچ‌های تصادفی در ساختار دوم پروتئینی بررسی کنیم، زیرا وجود آلفا هلیکس بالای سه عدد فرایند بیان را برای کسانی که قصد کلون کردن دارند را دچار مشکل می‌کند. به همین دلیل برای بررسی این حالات باید به بررسی ساختار دوم پروتئین از طریق سرور PRABI و از طریق روش GORIV استفاده شد.

بررسی ساختار سه‌بعدی واکسن مدل

در مرحله بعد باید ساختار سه‌بعدی سازه ایمنی‌زای کایمری را بررسی کنیم، زیرا یک واکسن پتیدی اگر بخواهد کارایی خوبی داشته باشد، باید ساختار سه‌بعدی پایدار داشته باشد. به همین دلیل برای بررسی این ساختار از روش همولوژی مدلینگ و از سرور SWISSMODEL استفاده می‌کنیم و با بررسی se-quence identity و local quality Estimate و QMEAN4 و ZSCORE بهترین مدل را برای محاسبات بعدی انتخاب می‌کنیم، اما اگر مدل انتخابی ما طی بررسی‌ها نیاز به refine کردن داشت از سرور دیگری به نام 3Drefine فرایند refine کردن را روی آن انجام می‌دهیم تا مدل‌های refine شده‌ای به دست آوریم که این مدل‌ها نسبت به قبلی ساختارشان به ساختار طبیعی نزدیک‌تر است.

بررسی جایگاه آمینواسیدها و پیوندها در مدل واکسن

حال پس از آنکه مدل مطلوب از سازه ایمنی‌زای کایمری به دست آمد، آن را باید از نظر باندها و جایگاه مطلوب آمینواسیدها که از لحاظ فضایی در کجای پروتئین مورد بررسی ما قرار گرفته‌اند با استفاده از سرور PROCHECK و توسط تحلیل نمودار رامانچاندرا^{۲۵} مورد بررسی قرار داده شد.

بررسی فیزیک و شیمیایی واکسن مدل

در این مرحله مدل پروتئینی سازه ایمنی‌زای کایمری به دست آمده باید از نظر خصوصیات فیزیک و شیمیایی مانند درصد و بار اسید آمینه‌ها و وزن مولکولی و قطبیت و ضریب خاموشی و نیمه عمر و شاخص ناپایداری و حلالیت در آب و شاخص الیفاتیک نیز بررسی شوند. به همین دلیل برای این نوع از بررسی‌ها از سرورهای مختلفی مانند PEPCALC و protParam استفاده شد.

بررسی پایداری واکسن مدل

در ادامه ارزیابی‌های سازه ایمنی‌زای مدل شده اگر پروتئین مورد بررسی ما ناپایدار بود با کمک سرور دیگری به نام IUPRE-D2A آن را بررسی می‌کنیم که بخش‌های ناپایدار و disorder را در ساختار آن مشخص کنیم تا اگر خواستیم آن را اصلاح کنیم،

بررسی آنتی‌ژن‌سسته اپی‌توپ‌های انتخابی

در ادامه غربالگری از سرور VaxiJen2.0 برای پیش‌بینی آنتی‌ژن‌سسته زیر واحدهای اپی‌تویی واکسن برای تعیین قوی‌ترین پروتئین‌های آنتی‌ژنی استفاده شد. در اینجا، ما از پارامترهای پیش فرض این سرور برای تعیین پروتئین آنتی‌ژن استفاده کردیم [۸].

تعیین ال‌ژن‌سسته اپی‌توپ‌های انتخابی

از سرور مبتنی بر وب AllerTOP برای پیش‌بینی حساسیت اپی‌توپ پیشنهادی ما برای تولید سازه ایمنی‌زا استفاده شد. این سرور حساسیت‌های آلرژیکی را از طریق پیش‌بینی ترکیبی ارزیابی کرده و AllerTOP حساسیت‌ها و nonallergens را با ویژگی بالایی پیش‌بینی می‌کند. این امر باعث می‌شود که AllerTOP برنامه بسیار مفیدی برای پیش‌بینی واکنش متقابل آلرژن است [۹].

بررسی توکسیسیتی اپی‌توپ‌های انتخابی

در مرحله بعدی باید اپی‌توپ‌های مورد مطالعه را از نظر میزان سمیت نیز بررسی کنیم که برای این کار از نرم‌افزار Toxinpred استفاده شد و اپی‌توپ‌های مربوط به B، T را که مشکل سمیت نداشتن را انتخاب می‌کنیم.

پیکربندی ترکیب کایمر اولیه از واکسن اپی‌تویی طراحی شده

پس از چندین مرحله غربالگری اپی‌توپ‌ها، حال باید پروتئین کایمر را که به عنوان سازه ایمنی‌زا (واکسن احتمالی) از اپی‌توپ‌هایی که غربالگری کردیم، ایجاد کنیم. برای انجام این کار اپی‌توپ‌های T، B را کنار هم قرار گرفتند و توسط ترکیبات لینکر مانند KK به هم وصل شدند که در اتصالات اپی‌توپ‌ها از لینکرهای منعطف استفاده می‌شود و پس از تکمیل ایجاد توالی کایمر اولیه به دو سر توالی کایمر ایجاد شده از اپی‌توپ‌های انتخاب شده، یک ترکیب ادجوانت مانند CTxB^{۲۴} با کمک لینکرهای سخت مانند PAPAP اضافه شد تا ساختار سازه ایمنی‌زای اولیه ما تکمیل شود. از دیتابیس PDB برای تهیه توالی ادجوانت مورد نظر استفاده شد.

ارزیابی واکسن کایمر از نظر ساختاری و قابلیت اتصال به سلول‌های B و ترکیبات MHCII و II پس از ایجاد سازه ایمنی‌زای کایمری آن را قبل از ورود به فاز آزمایشگاهی باید از ابعاد مختلف دیگر مورد بررسی قرار داد که در ادامه به آن‌ها می‌پردازیم.

بررسی ساختار دو‌بعدی پروتئین واکسن کایمر

در مرحله اول باید سازه ایمنی‌زای کایمری خود را از لحاظ

25. Ramachandran

24. cholera B-subunit

برای بررسی این برهم‌کنش‌ها از روش داکینگ مولکولی توسط نرم‌افزارهای خاص مثل Cluspro استفاده شد تا از این روش بتوانیم جهت‌گیری صحیح دو مولکول مختلف (واکسن با MHCI و MHCII) را برای تشکیل یک کمپلکس پایدار را به دست آوریم. به همین دلیل برای این کار ساختارهای PDB مدل سازه ایمنی‌زای تولیدشده را مورد بررسی و MHC‌های شاخص برای کلاس II، I را از دیتابیس RCSB تهیه کنیم و از طریق نرم‌افزارهایی مثل CONTEXT هترو اتم‌های MHCI و MHCII را حذف می‌کنیم.

آلل‌های فرکانس ۳۷ شاخص در جمعیت سفید پوست به نام‌های HLA-A*0201 برای کلاس MHCI و HLA-DRB1*0101 برای کلاس MHCII را انتخاب کرده و توالی آن‌ها نیز از RCSB تهیه شد و سپس هر کدام را جداگانه برای فرایند داکینگ وارد نرم‌افزار Cluspro برای بررسی اتصال با واکسن طراحی شده کردیم و آن‌ها را از لحاظ سطح انرژی اتصالی بررسی کردیم و بهترین حالت‌های برهم‌کنش را در آن‌ها به دست آوردیم. واکسن‌های مبتنی بر پپتیدها متنوع ساختاری میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا، امروزه یکی از گزینه‌های امیدوارکننده برای طراحی واکسن‌ها به شمار می‌آید.

یافته‌ها

تعیین اپی‌توپ‌های مورد نیاز برای تولید واکسن کایمر

در این مطالعه تعدادی توالی پپتیدی در اندازه‌های مختلف از پایگاه داده IEDB به‌عنوان کاندیدی‌های تولید پروتئین واکسن کایمری تهیه شد. سپس با کمک یک سری لینکر انعطاف‌پذیر به نام لینکرهای لیزین/لیزین (KK) توالی‌های اپی‌تویی به هم متصل شدند و در انتهای C و انتهای N توالی‌های پپتیدی توسط لینکر سخت PAPAP توالی ادجوانت (CTxB) cholera B-subunit را که از پایگاه داده Uniport دریافت شده بودند، اضافه شد تا ساختار اولیه پروتئینی سازه ایمنی‌زای کایمر ایجاد شود. در این مرحله انتخاب توالی‌های پپتیدی و چیدمان آن‌ها بسیار مهم است که سعی شد پپتیدهای مربوط به سلول‌های T، B را هر کدام کنار هم قرار داده شود و به همدیگر متصل شوند.

نتایج بررسی آنتی‌ژن‌سیته اپی‌توپ‌های انتخابی

در مرحله اول پس از آنکه با استفاده سرور IEDB آنتی‌ژن‌های مورد نظر را از بررسی توالی امینواسیدی پروتئین اسپایک کرونا ویروس به دست آورده شد. تک تک این اپی‌توپ‌های پپتیدی را از طریق نرم‌افزار VAXIJEN برای تعیین خاصیت آنتی‌ژن‌سیته مورد بررسی قرار گرفتند و از بین آن‌ها هشت عدد که دارای ویژگی آنتی‌ژن‌سیته مطلوب‌تری بودند، انتخاب شدند که در بین

بتوانیم راحت‌تر و با انتخاب امینواسیدها در موقعیت‌های نامنظم ساختار مدل سازه ایمنی‌زای اصلاحات لازم را انجام دهیم.

قابلیت اتصال به مجتمع اصلی سازگاری بافتی یا MHC ۲۶

آخرین مرحله بررسی واکسن مورد نظرمان این است که بررسی کنیم که آیا واکسن طراحی شده ما قابلیت اتصال به MHCI و MHCII شناسایی توسط ایمنوگلوبین‌ها و سلول‌های B را دارد یا خیر.

پیش‌بینی اپی‌توپ سلول T

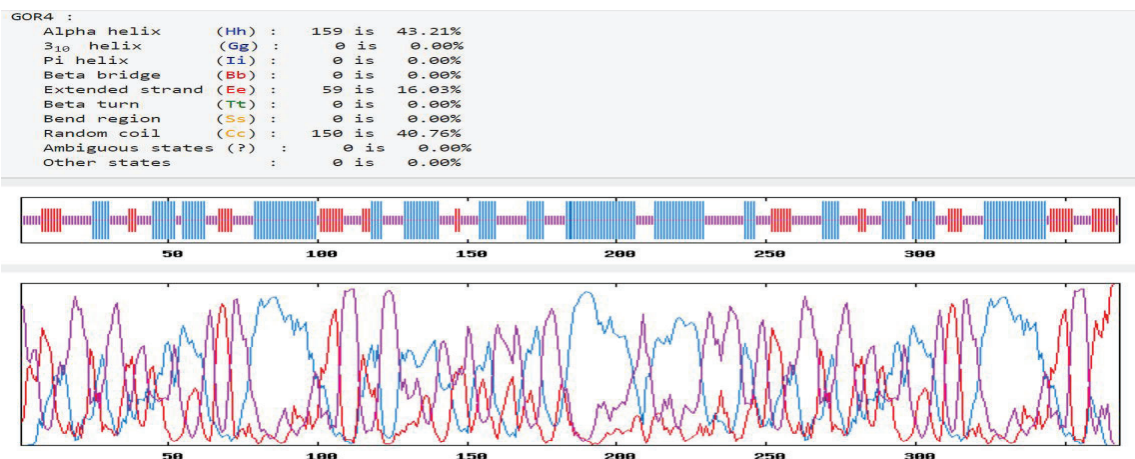
اپی‌توپ‌های پپتیدی نقش مهمی در تعیین واکسن دارند. مهم‌تر از همه این است که تشخیص آن‌ها به شیوه In silico هزینه زمان را در مقایسه با روش‌های آزمایشگاهی مربوطه کاهش می‌دهد. با استفاده از ابزارهای قابل دسترسی برخط مانند IEDB Propred-1، و ابزار MCH2PRED، اپی‌توپ‌های CTL پروتئین هدف MHC کلاس I و MHC کلاس II را به ترتیب پیش‌بینی کرد. نتایج این ابزارها بسیار مهم است؛ زیرا از تعداد زیادی آلل HLA (آنتی‌ژن‌های انسانی-لکوسیتی) در طول محاسبه استفاده می‌کنند. توالی‌ها در قالبی ساده ارائه و همه آلل‌ها برای پیش‌بینی انتخاب شدند.

شناسایی اپی‌توپ سلول B

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های بالقوه ایمنی در یک توالی پروتئین داده شده شاید به طور قابل توجهی تلاش آزمایشگاهی مرطوب مورد نیاز برای کشف اپی‌توپ‌های مورد نیاز برای طراحی واکسن‌ها و برای تشخیص ایمنی را کاهش دهد. هدف از پیش‌بینی اپی‌توپ سلول B یافتن آنتی‌ژن بالقوه‌ای است که می‌تواند با لئفوسیت‌های B تعامل داشته و یک پاسخ ایمنی مطلوب را آغاز کند. سپس اپی‌توپ‌های سلول B توسط IEDB به‌صورت برخط و بر اساس برخی روش‌های مبتنی بر سرور IEDB برای شناسایی آنتی‌ژن سلول B، شامل مقیاس آنتی‌ژن Tongaonkar و Kolaskar و پیش‌بینی دسترسی به سطح Emini، پیش‌بینی انعطاف‌پذیری Karplus و Schulz و تجزیه و تحلیل پیش‌بینی اپی‌توپ خطی Bepipred و ابزار پیش‌بینی Fasman و Chou برای پیش‌بینی پیچ‌بتا استفاده شد [۱۴-۱۰].

در این مطالعه از پروتئین سنبله یا اسپایک کرونا ویروس که از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی به دست آمد، برای طراحی استفاده شد و توالی امینواسیدی قطعات انتخاب‌شده اپی‌توپ‌ها، توسط سرور VAXIJEN و سرورهای AllerTOP و toxinpred بررسی شدند.

داکینگ مولکولی



تصویر ۱. ارزیابی ساختار دو بُعدی سازه ایمنی‌زای کایمر اولیه ایجاد شده توسط نرم‌افزار prabi با روش GORIV که بیانگر شرایط مطلوب این سازه است

نتایج پیکربندی و طراحی ساختار اولیه پروتئین کایمر واکسن

در این مرحله از طراحی سازه ایمنی‌زا باید اپی‌توپ‌های پپتیدی که در مراحل قبلی آنالیز جداسازی شدند به همدیگر متصل شوند تا توالی ساختار اولیه سازه ایمنی‌زای کایمر شکل بگیرد. به همین دلیل در این مرحله ابتدا اپی‌توپ‌ها باید کنار هم قرار داده شوند و بین آن‌ها از لینکرهای لیزین/لیزین برای اتصال استفاده شود. سپس از طریق پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی توالی ادجوانت (cholera toxinB subunit) مورد نیاز را به دست آورده و با کمک لینکر سخت PAPAP به انتهای N و انتهای C توالی سازه ایمنی‌زای کایمر متصل شد (البته در به دست آوردن توالی ادجوانت باید دقت شود که از نمونه‌های partial نباشد) که با این کار ساختار اولیه توالی‌های سازه ایمنی‌زای کایمر جهت بررسی‌های بعدی ایجاد شد.

نتایج ارزیابی ساختار دو بُعدی و سه بُعدی سازه ایمنی‌زا

در ادامه ارزیابی ترکیب سازه ایمنی‌زای تولید شده، از نظر ساختار دو بُعدی و سه بُعدی بررسی شد که اگر در ساختار آن تاخوردگی‌های نامطلوب ایجاد شود در همین ابتدای کار آن بخش‌های اپی‌تویی برهم‌زننده ساختار سازه ایمنی‌زا را از ساختار اولیه آن حذف کرد. به همین دلیل ابتدا با کمک نرم‌افزار prabi و با استفاده از روش GORIV ساختار دوم سازه ایمنی‌زا بررسی شد و نتایج حاصل از این بررسی این گونه بود که ساختار دوم ترکیب سازه ایمنی‌زا از نظر درصد آلفا هلیکس ۴۳/۲۱ درصد بود. درصد بالای آلفا هلیکس بعداً در فرایندهای کلونینگ اگر شخصی محقق بخواهد کارهای کلونینگ کند، مشکل ساز می‌شود (تصویر شماره ۱).

در ادامه ساختار سه بُعدی 3D را باید به دست آورد و چون از ترکیب سازه ایمنی‌زای ما هیچ ساختاری وجود ندارد، پس باید از

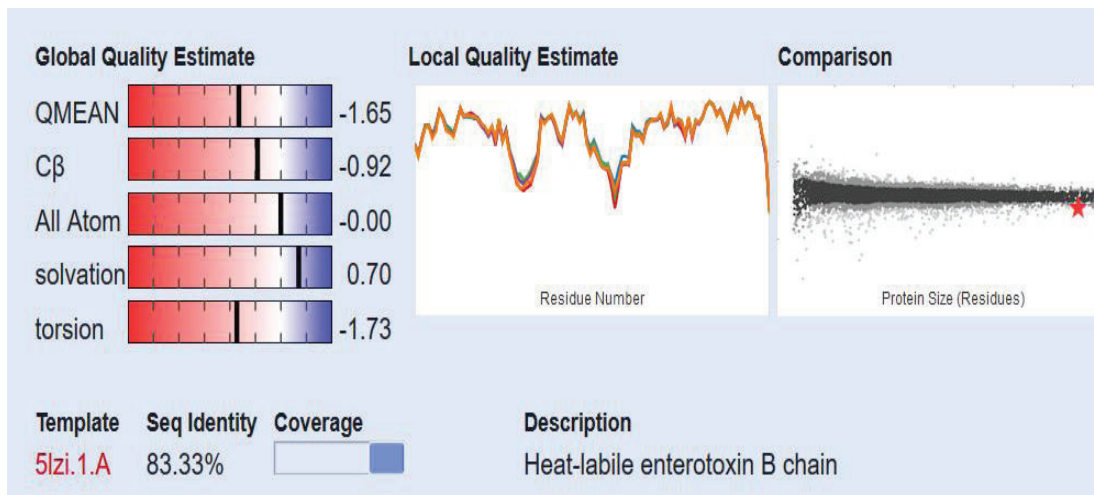
آن‌ها کمترین و بیشترین امتیاز ۰/۴۷۱۰ و ۰/۹۱۱۶ را از سرور VAXIJEN به خود اختصاص دادند. نمرات به دست آمده حاکی از ماهیت آنتی‌ژنتیکی توالی پروتئین سازه ایمنی‌زا ایجاد شده است. به همین دلیل از این توالی‌ها برای طراحی سازه ایمنی‌زای مولتی اپی‌توپ استفاده شده است [۸].

نتایج بررسی آلرژی‌سیسته اپی‌توپ‌های انتخابی

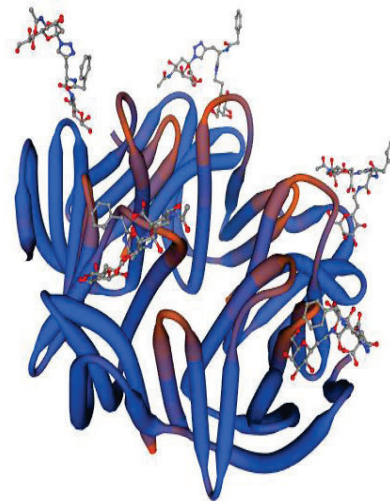
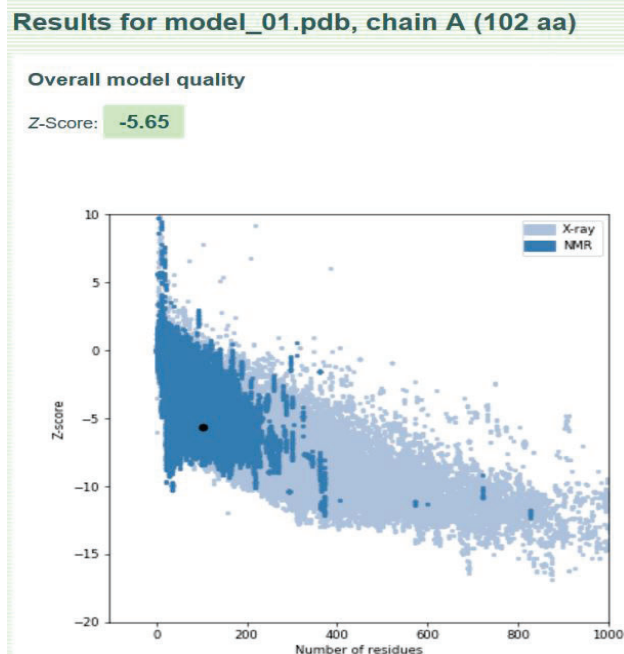
پس از بررسی ویژگی آنتی‌ژن‌سیسته اپی‌توپ‌های منتخب حال نوبت به بررسی خاصیت آلرژی‌سیسته آن‌ها است. به‌طور کلی سازه ایمنی‌زای آلرژیک می‌تواند باعث ایجاد واکنش‌های ایمنی واکنشی متقاطع خاص آلرژن در بدن میزبان مانند بشورات پوستی و تورم غشاهای مخاطی شود. به همین دلیل در این مرحله تمام آن‌ها جداگانه و تک تک با کمک نرم‌افزار ALLerTPV.2.0 ارزیابی شدند و مواردی از اپی‌توپ‌ها که ریسک آلرژی‌یابی داشتند، حذف شدند و آن‌هایی را که فاقد ویژگی آلرژی‌یابی بودند، برای سنتز سازه ایمنی‌زا جدا شدند تا بررسی‌های بعدی در مورد آن‌ها انجام شود [۱۶، ۱۵].

نتایج بررسی توکسیسیته اپی‌توپ‌های انتخابی

در این مرحله و در ادامه ارزیابی‌های سازه ایمنی‌زا باید تک تک اپی‌توپ‌های پیشنهادی که در دو مرحله قبل از لحاظ آنتی‌ژن‌سیسته و آلرژی‌یابی بررسی شدن را از لحاظ سمیت و توکسیسیته و با کمک نرم‌افزار Toxinpred مورد ارزیابی قرار گیرند و پس از آنکه اپی‌توپ‌های مورد نظر از لحاظ توکسیسیته بی‌خطر بودند، به جداسازی هشت عدد از آنها برای تولید سازه ایمنی‌زای کایمر که به‌عنوان ترکیب اولیه واکسن محسوب می‌شود، پرداخته شود [۱۷].



الف



ب



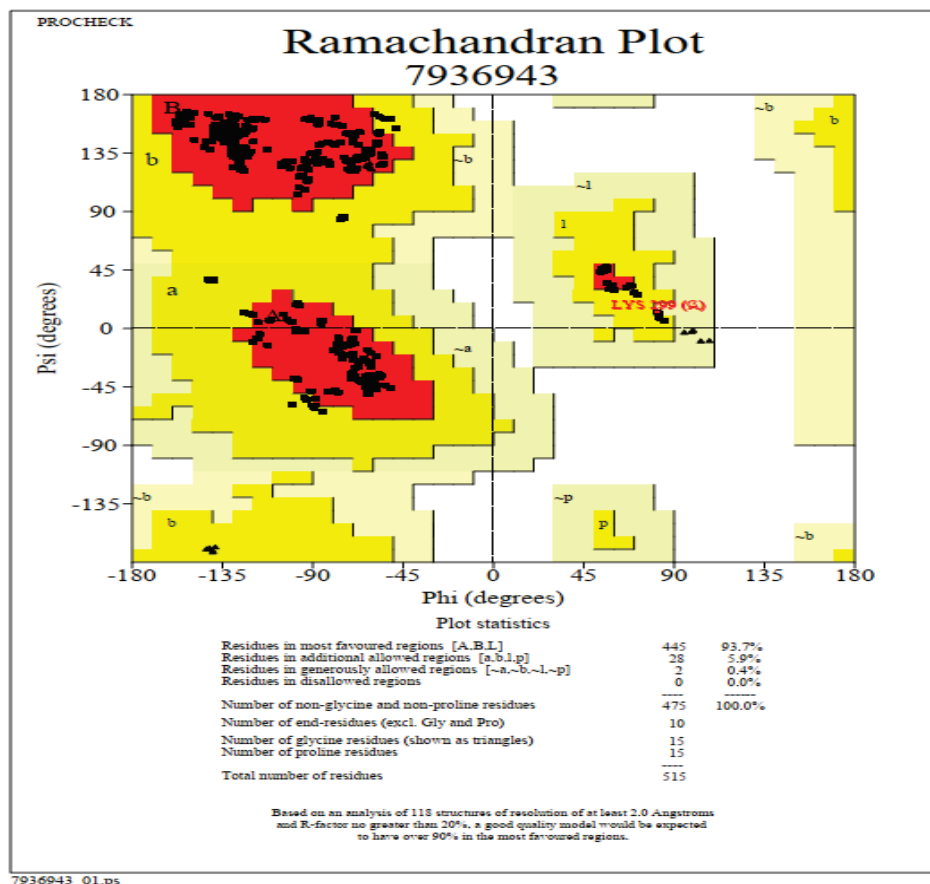
ج

تصویر ۲. الف: تصویر حاصل از ارزیابی شاخص‌های Local Quality Estimate، zscore، comparison و ساختار سوم واکسن مدل‌سازی شده تولیدی با کمک نرم‌افزار SWISSMODEL. ب: شکل سه‌بعدی سازه ایمونی‌زای مدل‌سازی شده تولیدی. ج: تصویر نتیجه ارزیابی ساختار سه‌بعدی سازه ایمونی‌زای مدل‌سازی شده توسط نرم‌افزار ASorP که نشان می‌دهد نمره Z از -۵/۵۶- است.

موجود در این سرور به دست آمد، بدین‌گونه که شاخص seq comparison با عدد ۸۳/۳۳ درصد بود.

همچنین در تصویر شماره ۲ شاخص‌های Local Quality Estimate، zscore و comparison نیز بیانگر شباهت ترکیب مدل سه‌بعدی ارائه‌شده توسط سرور SWISSMODEL بر اساس الگوی توالی پروتئین سازه ایمونی‌زاس طراحی‌شده مورد مطالعه است [۱۹، ۱۸]. اگر هنگام بررسی مدل مورد نظر سه‌بعدی

روش همولوژی مدلینگ و با استفاده از سرور SWISSMODEL استفاده شود. با ورود توالی پروتئین سازه ایمونی‌زا در این سرور به عنوان الگو استفاده شد تا یک سری ترکیب با توالی پپتیدی شبیه به سازه ایمونی‌زای سنتز شده پیدا شود. سپس با بررسی چندین شاخص در این مدل‌های ارائه‌شده مثل seq identity comparison، zscore و Local Quality Estimate میزان شباهت مدل سازه ایمونی‌زا مورد بررسی به ترکیبات طبیعی



تصویر ۳. تصویر حاصل از داده‌های رامچاندرا که میزان باقی‌مانده اسید آمینه سازه ایمنی‌زا در منطقه مطلوب و تقریباً مطلوب را با کمک نرم‌افزار kcehcORP نشان می‌دهد که ۹۹/۶ درصد را شامل می‌شود.

نتایج بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی

در این مرحله از ارزیابی واکسن مورد نظر یک سری از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی در آن توسط نرم‌افزارهایی مانند pepcalc و protparam ارزیابی شد که حاصل آن بدین‌گونه بود که ترکیب واکسن مورد بررسی دارای شاخص ناپایداری ۳۳/۹۳ بود که حاکی از آن است که ترکیبی پایدار در بدن میزبان است و نیمه عمری حدود سی ساعت در بدن پستانداران دارد.

همچنین وزن مولکولی و PH ایزوالکتریک آن به ترتیب ۴۰۸۸۴/۷۰ و ۹/۶۸ بود. این ترکیب ایمنی‌زا دارای ضریب گراویتی و الیفاتیکی به ترتیب ۰/۳۶۶- و ۹۰/۴۸ بود و حلالیت آن مناسب تشخیص داده شد. همچنین ضریب خاموشی آن در آب و در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۳۵۰۹۰ جهت ورود به فاز آزمایشگاهی تشخیص داده شد (تصویر شماره ۴) [۲۲، ۲۱].

مشخص شود مدل مربوطه از لحاظ شاخص‌های ذکر شده کیفیت مطلوبی ندارد، باید آن را اصلاح کرد که برای این کار از نرم‌افزار 3DRefin مدل به‌دست‌آمده سازه ایمنی‌زا را Refin کرده تا مدلی Refin شده و با کیفیت مطلوب‌تر را در اختیار قرار گیرد.

در ادامه فرایند بررسی باید مدلی را که طی فرایند همولوژی مدلینگ از سازه ایمنی‌زا به دست آمده است، از نظر قرارگیری اسید آمینه‌ها در جایگاه مطلوب و پرخطر مدل سازه ایمنی‌زا قرار دارد، بررسی شود که این کار به وسیله نرم‌افزار PROcheck طریق بررسی نمودار رامچاندرا انجام شد و مشاهده شد که حدود ۹۳/۷ درصد از آمینواسیدهای ترکیب مدل واکسن مورد مطالعه در مناطق مطلوب و ۵/۹ درصد در مناطق مجاز و ۰/۴ درصد در مناطق تقریباً مجاز و صفر درصد در مناطق غیرمجاز سازه ایمنی‌زا قرار داشت [۲۰]. همچنین با کمک سرور PROSA تمام اتم‌های کربن آلفا سازه ایمنی‌زا بررسی شدند و نتایج حاصل از آن در قالب Z score که برابر ۵/۶۵- بود، به دست آمد (تصویر شماره ۳).

Number of amino acids: 357

Molecular weight: 40884.70

Theoretical pI: 9.68

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 33

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 56

Atomic composition:

Carbon	C	1857
Hydrogen	H	2971
Nitrogen	N	497
Oxygen	O	517
Sulfur	S	11

Formula: C₁₈₅₇H₂₉₇₁N₄₉₇O₅₁₇S₁₁

Total number of atoms: 5853

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 35090

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.858, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 34840

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.852, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).|

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 33.97

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 90.48

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.366

Physicochemical properties

Number of residues:	368
Molecular weight:	41961.48 g/mol
Extinction coefficient:	31860 $M^{-1}cm^{-1}$
Iso-electric point:	pH 10.14
Net charge at pH 7:	23.6
Estimated solubility:	Good water solubility.

notes on MW

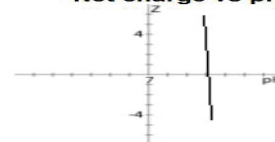
notes on Ext. Coefficient

notes on pI

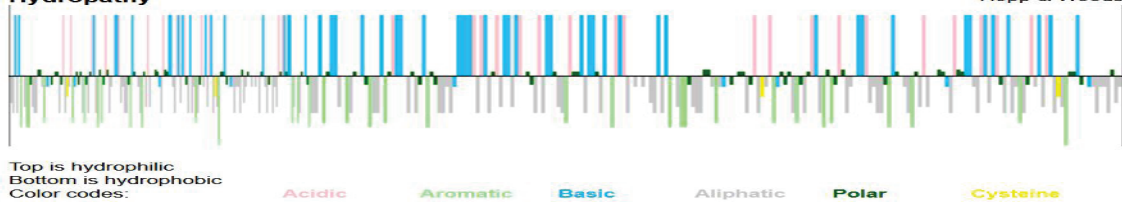
notes on net charge

notes on solubility

Net charge vs pH



Hydropathy



Top is hydrophilic
Bottom is hydrophobic
Color codes:



تصویر ۴: تصاویر حاصل از ارزیابی نتایج فیزیکی و شیمیایی سازه ایمنی‌زای مدل‌سازی شده توسط نرم‌افزارهای الف: protparam ب: pepcalc

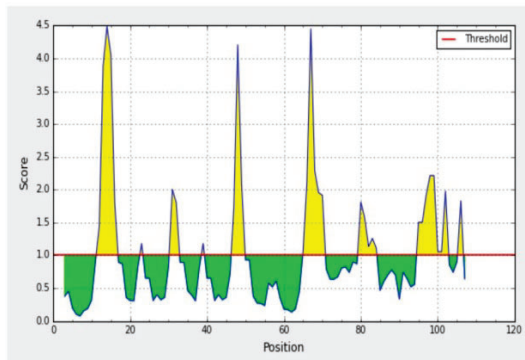
گرایش آنتی‌ژن پروتئین ۱/۰۷ است، حداکثر ۱/۱۳ و حداقل ۱/۰۵ آستانه تعیین آنتی‌ژن برای پروتئین ۱/۰۲ بود. همه مقادیر بیشتر از ۱/۰۰ تعیین‌کننده توان بالقوه آنتی‌ژنی آن‌ها بود. به همین دلیل نتیجه آن شد که از بین آن‌ها چهار اپی‌توپ مقدار آستانه تعیین‌شده قبلی را دارند و آن‌ها توانایی بیان پاسخ سلول B را دارا هستند (تصویر شماره ۵).

به‌طور کلی برای اینکه یک اپی‌توپ محرک قدرتمندی برای سلول B باشد، باید از سطح دسترسی خوبی برخوردار باشد که برای تشخیص این ویژگی از پیش‌بینی دسترسی به سطح Emimi استفاده شد که در نتایج حاصله مشخص شد منطقه ۱۰ تا ۱۵ و ۴۵ تا ۵۰ و ۶۵ تا ۷۰ باقی‌مانده اسیدهای آمینه در دسترس‌تر است (تصویر شماره ۵).

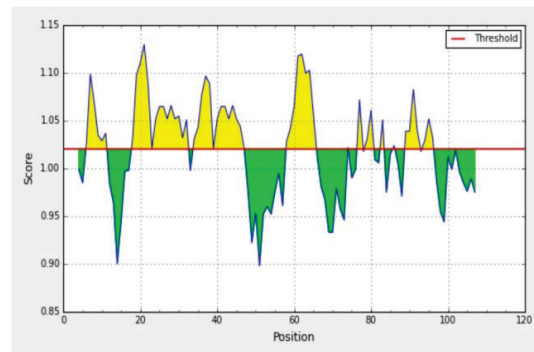
نتایج بررسی پیش‌بینی برهم‌کنش با سلول‌های B

در این مرحله روش‌های مبتنی بر مقیاس اسید آمینه برای شناسایی اپی‌توپ‌های سلول B بالقوه پیش‌بینی استفاده شد. پیش‌بینی برهم‌کنش اپی‌توپ‌ها با سلول‌های B ایمنی با کمک نرم‌افزار IEDB صورت گرفت که یکی از بهترین روش‌های پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B است [۲۵، ۸]. طی این مرحله از روش‌های مختلف تحلیل نرم‌افزار IEDB برای پیش‌بینی اپی‌توپ سلول پیوسته B استفاده شد.

در روش پیش‌بینی آنتی‌ژن و Tongaonkar32 و Kolaskar آنتی‌ژن بر اساس خصوصیات فیزیولوژیکی اسیدهای آمینه و فراوانی در اپی‌توپ‌های شناخته‌شده تجربی بررسی شد. متوسط



ب



الف

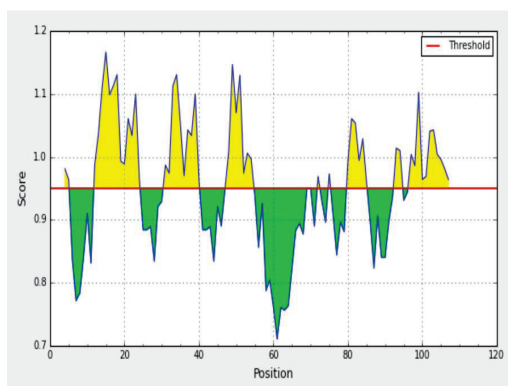
تصویر ۵. الف: پیش‌بینی آنتی‌ژن Kolashkar و Tongaonkar از سازه ایمنی‌زا (نکات: محور X و محور Y به ترتیب موقعیت توالی و گرایش آنتی‌ژن را نشان می‌دهند. مقدار آستانه ۱/۰۲ است. نواحی بالاتر از آستانه آنتی‌ژن هستند و به رنگ زرد نشان داده شده‌اند). ب: پیش‌بینی دسترسی به سطح Emini سازه ایمنی‌زا (نکات: محور X و محور Y به ترتیب موقعیت توالی و احتمال سطح را نشان می‌دهند. مقدار آستانه ۱/۰۰۰ است. نواحی بالاتر از آستانه آنتی‌ژن هستند و به رنگ زرد نشان داده شده‌اند).

سرانجام، ابزار پیش‌بینی اپی‌توپ خطی Bepipred استفاده شد که این برنامه بر اساس یک مدل Hidden Markov عمل می‌کند که این روش واحد برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B خطی به شمار می‌آید که با مراجعه به همه داده‌ها پیش‌بینی شد که توالی‌های پپتید سازه ایمنی‌زا از اسیدهای آمینه ۷ تا ۲۰ و ۲۵ تا ۴۰ و ۶۵ تا ۱۱۰ قادر به القای پاسخ ایمنی مورد نظر به‌عنوان اپی‌توپ سلول‌های B هستند (تصویر شماره ۷).

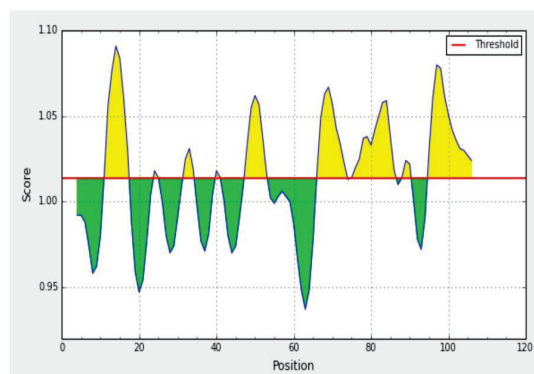
نتایج بررسی پیش‌بینی برهم‌کنش با MHCI و MHCI

در این مرحله از کار از سرورهای Propred-I و MHC2pred برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌ها توسط سلول T استفاده شدند. Pro-I-pred از یک روش پایه ماتریس برای اسکن و پیش‌بینی پپتیدها

مناطق حاوی پیچ بتا معمولاً در دسترس و طبیعتاً آب‌گریز هستند که این دو خاصیت از نواحی آنتی‌ژنی یک پروتئین هستند که بر اساس مدل ارزیابی Chou and Fasman و از طریق بررسی پیچ‌های بتا قابل بررسی است [۲۴]. منطقه ۲۵-۱۰، ۳۰-۴۰، ۸۵-۸۰ و ۹۰-۱۱۰ به‌عنوان یک منطقه بتا چرخش در نظر گرفته شد. همچنین بر اساس شواهد تجربی، مشخص شده که انعطاف‌پذیری یک پپتید با آنتی‌ژنیسیته آن مرتبط است. از این‌رو، روش پیش‌بینی انعطاف‌پذیری Karplus و Schulz نیز بر این مبنا شکل گرفت و از آن برای بررسی انعطاف‌پذیری اپی‌توپ‌های سازه ایمنی‌زا استفاده شد. در این روش پیش‌بینی، مشخص شد مناطق ۱۷-۱۱، ۴۷ تا ۵۳، ۶۷ تا ۸۷ و ۹۵ تا ۱۰۵ انعطاف‌پذیرترین بخش سازه ایمنی‌زای مورد مطالعه هستند (تصویر شماره ۶).

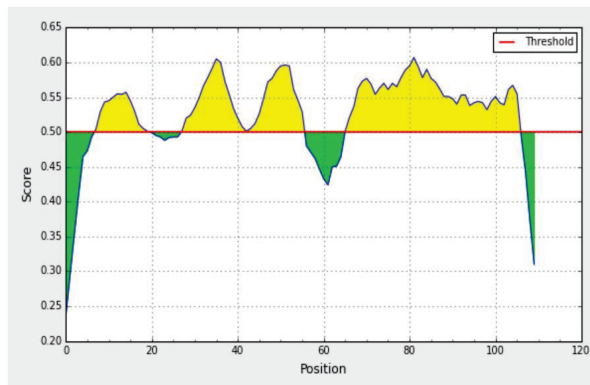


ج



پ

تصویر ۶. پ: پیش‌بینی انعطاف‌پذیری از طریق روش Karplus و Schulz از سازه ایمنی‌زای آنتی‌ژنتیک (مناطق انعطاف‌پذیر دارای رنگ زرد هستند. محور X و محور Y به ترتیب موقعیت و نمره را نشان می‌دهند. آستانه ۱/۰۲ است). ج: روش Fasman و Chou پیش‌بینی پیچ بتا سازه ایمنی‌زا را انجام می‌دهد (محور X و محور Y به ترتیب موقعیت و نمره را نشان می‌دهند. آستانه ۰/۹۵ است. مناطقی که پیچ بتا دارند، به رنگ زرد، بالاتر از مقدار آستانه نشان داده شده‌اند).



تصویر ۷. پیش‌بینی اپی‌توپ خطی Bepipred در سازه ایمنی‌زا (نکات: محور X و محور Y به ترتیب موقعیت و نمره را نشان می‌دهند. آستانه ۰/۵۰ است. مناطقی که بیچ‌تا دارند به رنگ زرد نشان داده شده‌اند. بالاترین ناحیه اوج نشانگر قدرتمندترین اپی‌توپ سلول B است).

ایجاد می‌کند (تصویر شماره ۸).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی طی نتایج حاصله و در بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی توسط نرم‌افزارهایی مانند pepcalc و protparam حاصل آن بدین‌گونه ترکیب سازه ایمنی‌زای مورد بررسی دارای شاخص ناپایداری ۳۳/۹۳ بود که عددی زیر چهل است که حاکی از آن است که ترکیبی پایدار است و نیمه عمری حدود سی ساعت در بدن پستانداران دارد که این فرصت آن را در بدن ایجاد می‌کند که ایمنی مطلوب‌تری شکل بگیرد.

همچنین وزن مولکولی و PH ایزوالکتریک آن به ترتیب ۴۰۸۸۴/۷۰ و ۹/۶۸ بود که بیانگر شرایط مطلوب سازه ایمنی‌زا هستند. این ترکیب ایمنی‌زا دارای ضریب گراویتی و الیفاتیکی به ترتیب ۰/۳۶۶- و ۹۰/۴۸ بود و حلالیت آن در بدن مناسب تشخیص داده شد. همچنین ضریب خاموشی آن در آب و در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۳۵۰۹۰ بود و مناسب برای ورود به فاز آزمایشگاهی تشخیص داده شد [۲۱، ۲۲].

با توجه به ساختار دوم ترکیب سازه ایمنی‌زا از نظر درصد آلفا هلیکس با ۴۳/۲۱ درصد بود. درصد بالای آلفا هلیکس در فرایندهای کلونینگ، بعداً اگر محققى بخواهد کارهای کلونینگ کند، مشکل‌ساز می‌شود و نیز درصد نسبتاً پایین آلفا هلیکس‌ها خاصیت تجمعی‌تر این سازه را توضیح می‌دهد.

در مورد ساختار سوم با کمک سرور SWISSMODEL یک مدل مشخص برای کایمر پیشگویی کرد که به منظور ارزیابی کیفیت مدل مورد نظر از نقشه رامچاندران استفاده شد. زوایای چرخش phi و psi برای همه باقی‌مانده‌های ساختار پروتئین در محورهای X و Y قابل مشاهده است. زاویه phi چرخش را حول باندها N اسیدآمیننه نشان می‌دهد، در حالی که

در برابر کتابخانه از آل‌های کلاس MHC I و MHC2pred برای آل‌های کلاس MHCII استفاده شدند. توالی پپتیدها با فرمت FASTA به این سرورها، در حالی که انتخاب همه آل‌ها با پپتید با امتیاز بالاتر و با آستانه ۴ درصد بر روی آن‌ها انجام شد [۲۶-۲۸].

علاوه بر این، غربالگری ایمونوزنسیته و توکوسوسیته و آنتی‌ژن‌سنیته اپی‌توپ‌ها انجام شد و فقط تعداد اندکی از اپی‌توپ‌های انتخابی برای پردازش بعدی بر اساس نمره آنتی‌ژنی خود انتخاب شدند. سپس از بین آن‌ها چند مورد که برهم‌کنش خوبی با MHC I و MHCII داشتند، جدا و در یک جدول جداگانه دسته‌بندی شدند، زیرا آن‌ها اپی‌توپ‌هایی بودند که نسبت به بقیه، بیشترین نقش را در تحریک و ایجاد ایمنی در بدن شخص میزبان به واسطه سازه ایمنی‌زای تولیدشده از آن‌ها نقش ایفا می‌کردند (جدول شماره ۱).

نتایج داکینگ

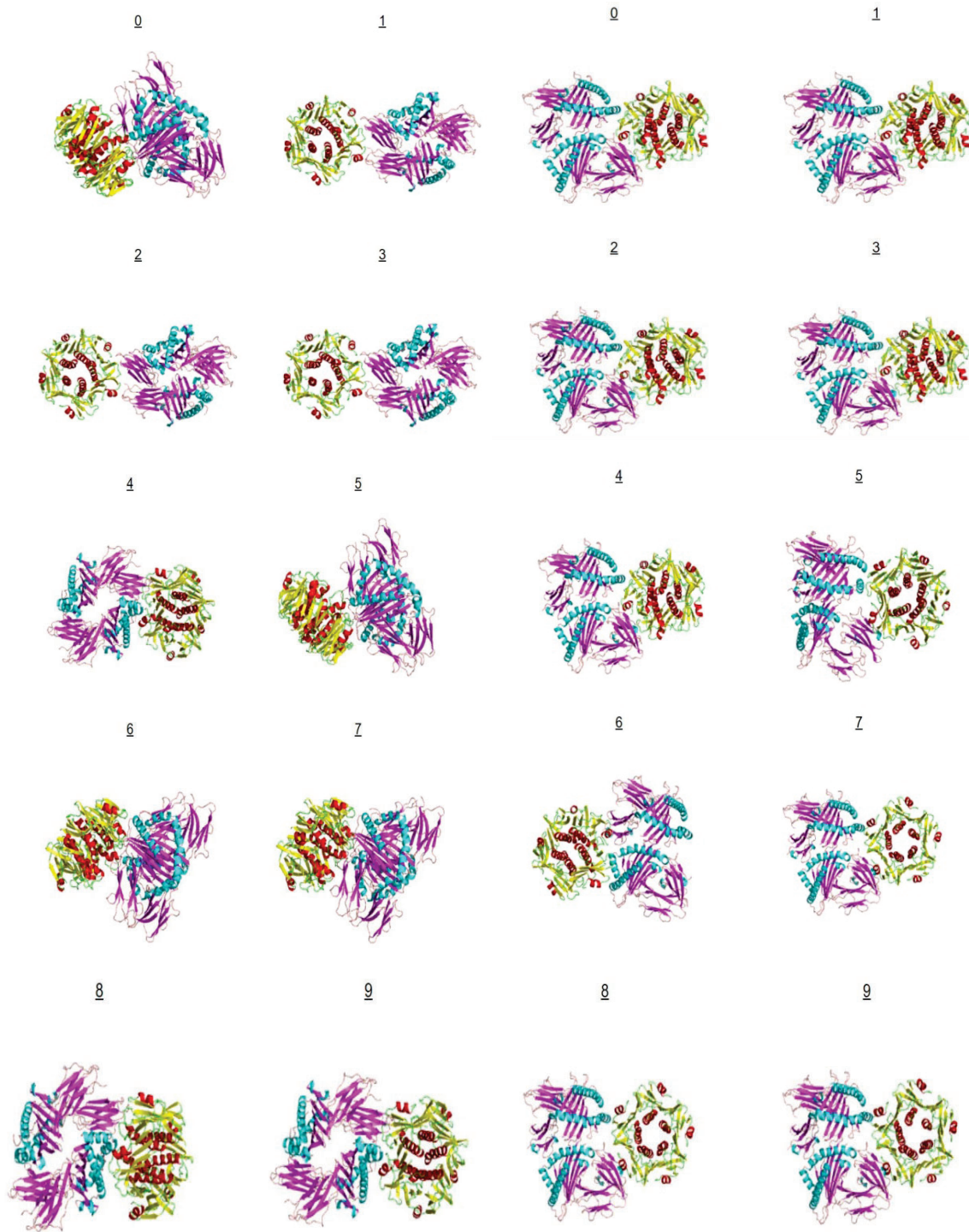
در این مرحله از کار پس از آنکه فایل‌های ورودی وارد نرم‌افزار Cluspro شد، نرم‌افزار لیگاند را با ۷۰ هزار چرخش می‌چرخاند. برای هر چرخش، لیگاند را به نسبت z، y، x نسبت به گیرنده روی یک شبکه تفسیر می‌کنیم و تفسیر را با بهترین امتیاز از هر چرخش انتخاب می‌کند. نرم‌افزار از میان ۷۰ هزار چرخش، ۱۰۰۰ ترکیب چرخش را انتخاب می‌کند که کمترین امتیاز را دارند. سپس یک گروه‌بندی سختگیرانه از این ۱۰۰۰ موقعیت لیگاند را با شعاع نه‌انگستروم C-alpha rmsd انجام می‌دهد.

این بدان معنا است که در نه‌زاویه موقعیت لیگاند با بیشترین «همسایگان» را می‌یابد و آن را به یک مرکز خوشه تبدیل می‌کند و اعضای آن را با لیگاند مورد مطالعه مجاور می‌کند. سپس این‌ها از مجموعه حذف می‌شوند و ما به دنبال یک مرکز خوشه دوم خواهیم بود. همین‌طور این فرایند ادامه می‌یابد و بهترین مدل‌ها را با سطح انرژی مناسب برای برهم‌کنش بین رسپتور و لیگاند

جدول ۱. اپی توپ‌های مورد استفاده در تولید سازه ایمنی‌زا با سلول B, MHC I و MHC II با کمک نرم‌افزارهای I-ProPred, MHC2pred و bcnpred

VAXIEN.SCORE	B	MHCII	MHCI	توالی
0.4710	+	HLA-DQB1*01:01, HLA-DR4, HLA-DR9, HLA-DR8, HLA-DR13, HLA-DR51, HLA-DQ4, HLA-DQ7, HLA-DQ8, HLA-DQB1*03, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, I-Ab, I-Ag7	HLA-B14, HLA-B*2702, HLA-B*2705, HLA-B*5301, HLA-B*51	LNRALTGIA-VEQDKN
0.5078		HLA-DQB1*01:01, HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR9, HLA-DR3, HLA-DR13, HLA-DR15, HLA-DR51, HLA-DR52, HLA-DR53, HLA-DQ2, HLA-DQ4, HLA-DQ5, HLA-DQ6, HLA-DQ7, HLA-DQ8, HLA-DQB1*03, HLA-DRB4*0101, HLA-DRB5*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1501, I-AB, I-Ag7	HLA-A2, HLA-A*0201, HLA-A*0205, HLA-A*1101, HLA-A24, HLA-A3, HLA-A*3101, HLA-A68.1, HLA-A2.1, HLA-B14, HLA-B*2702, HLA-B*2705, HLA-B*3501, HLA-B*3701, HLA-B*3801, HLA-B*3902, HLA-B*4403, HLA-B*5201, HLA-B*5301, HLA-B*5401, HLA-B*51, HLA-B*5801, HLA-B62, HLA-B7, HLA-B*0702, HLA-B8, HLA-Cw*0301, HLA-Cw*0401, HLA-Cw*0602, HLA-Cw*0702, MHC-Db, MHC-Dd, MHC-Kb, MHC-Kd, MHC-Ld	YGYLQPRTFLLKYN
0.5530		HLA-DQB1*01:01, HLADR1, HLA-DR9, HLA-DR2, HLADR3, HLA-DR15, HLA-DR51, HLA-DR52, HLADQ4, HLA-DQ6, HLA-DQ7, HLA-DQ8, HLA-DRB1*03, HLA-DRB4*0101, HLA-DRB5*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1501, I-Ab, I-Ag7	HLA-A2, HLA-A*0201, HLA-A*0205, HLA-A*1101, HLA-A24, HLA-A3, HLA-A*3101, HLA-A2.1, HLA-B14, HLA-B*2702, HLA-B*2705, HLA-B*3501, HLA-B*3701, HLA-B*3801, HLA-B*3902, HLA-B*4403, HLA-B*5201, HLA-B*5301, HLA-B*5401, HLA-B*51, HLA-B*5801, HLA-B62, HLA-B7, HLA-B*0702, HLA-B8, HLA-Cw*0301, HLA-Cw*0401, HLA-Cw*0602, HLA-Cw*0702, MHC-Db, MHC-Dd, MHC-Kb, MHC-Kd, MHC-Ld	YGYLQPRTFLLKYNE
0.5582		HLA-DQB1*01:01, HLA-DR4, HLA-DR9, HLA-DR3, HLA-DR15, HLA-DR52, HLA-DQ4, HLA-DQ7, HLA-DQ8, HLA-DQB1*03, HLA-DQB1*0301, HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, I-Ab, I-Ad, I-Ag7, RT1-B	HLA-A2, HLA-A*0201, HLA-A*0205, HLA-A*1101, HLA-A24, HLA-A*3101, HLA-A*3302, HLA-A68.1, HLA-A20 Cattle, HLA-A2.1, HLA-B14, HLA-B*2702, HLA-B*2705, HLA-B*3701, HLA-B*3901, HLA-B*3902, HLA-B40, HLA-B*5301, HLA-B*5401, HLA-B*51, HLA-B*5801, HLA-B60, HLA-B7, HLA-B8, HLA-Cw*0301, HLA-Cw*0602, MHC-Dd, MHC-Kb, MHC-Kd,	GINITRFQTL-LALHR
0.5300		HLA-DR9, HLA-DR53, HLA-DQ8, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0901	HLA-A2, HLA-A*0201, HLA-A*0205, HLA-B*2705, HLA-B*3701, HLA-B40, HLA-B*4403, HLA-B60, HLA-B61, HLA-B*0702, MHC-Kk	KEIDRLNEV
0.7025	+	HLA-DR4, HLA-DR9, HLA-DQ4, HLADQ8, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0901	HLA-A1, HLA-B14, HLA-B*2702, HLA-B*2705, HLA-B*3901, HLA-B*51,	VRDPQTLEI
0.6017		HLA-DR4, HLA-DR9, HLA-DR15, HLA-DR53, HLA-DQ8, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*04051501, I-Ab, I-Ag7	HLA-A2, HLA-A*0201, HLA-A*0205, HLA-A*1101, HLA-A24, HLA-A3, HLA-A68.1, HLA-B*2705, HLA-B*3902, HLA-B7, HLA-Cw*0301, MHC-Db, MHC-Db revised, MHC-Kd	NVLYENQKL
0.9116	+	HLA-DR3, HLA-DQ4, HLA-DQ8, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1501,	HLA-A2.1, HLA-B62, HLA-B8, MHC-Kk	NLKPFERDI





تصویر ۸. الف: تصویر حاصل از داکینگ بین آلل HLA-A0201 برای کلاس MHCI با مدل سازه ایمنی‌زای ایجادشده توسط نرم‌افزار Cluspro؛ تصویر حاصل از داکینگ بین آلل HLA-DRB1-0101 برای کلاس MHCI با مدل سازه ایمنی‌زای ایجادشده توسط نرم‌افزار Cluspro

FLLKYNE و YVGYLQPRTFLLKYN و GINITRFQTLALHR (GINITRFQTL- و MHC-II (YVGYLQPRTFLLKYN و LALHR و LNRLTGVAVEQDKN) با آلل‌های بیشتری از HLA در تعامل بودن و از نظر طبیعت بسیار آنتی‌ژن‌تر هستند [۴۰].

اپی‌توپ‌های محافظت‌شده سلول‌های B توسط سرور IEDB تجزیه و تحلیل و پیش‌بینی شدند. از ابزارهای دیگر در IEDB برای تحلیل آنتی‌ژنی، انعطاف‌پذیری، دسترسی به حلال و پیوندهای دی سولفید استفاده شد که نواحی ۷ تا ۲۰، ۶۵ تا ۷۵ و ۹۰ تا ۱۱۰ سازه ایمنی‌زا مورد بررسی نمره ایمنی بالاتری به نسبت به دیگر بخش‌های آن به دست آورد و این نواحی می‌توانند نماینده بالقوه احتمالی بهتری در سلول‌های B برای نامزد برای تولید واکسن باشند. از سرور دیسکوپ برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های ناپیوسته استفاده شد.

رویکرد اطلاعاتی ایمنی می‌تواند اپی‌توپ‌های بسیار محافظت‌شده‌ای را شناسایی کند که ممکن است محافظت گسترده‌ای در برابر سویه‌های مختلف داشته باشد. بر اساس نمره ایمنی و حفظ توالی مشخص است که پپتیدهای محافظت‌شده احتمالاً ایمن هستند.

علاوه بر این، ساختارهای سه‌بعدی از هر پپتیدهای اتصال‌دهنده کلاس MHC از طریق داکینگ پیش‌بینی برهم‌کنش آلل HLA-A0201 انسانی با کلاس MHCI و آلل HLA-DRB1-0101 انسانی با کلاس MHCI انجام شد. بر اساس نتایج داکینگ، پتانسیل اتصال و نمره ایمنی، پپتیدهای شناسایی شده، شاید در مطالعه حاضر در قیاس با برخی پپتیدهایی که در مطالعات دیگر بررسی شده بودند، ایمنی مطلوب‌تری داشته باشند [۴۱، ۴۲]. [۳۹].

اپی‌توپ‌های پیش‌بینی‌شده باید در مطالعات بعدی برای قدرت درمانی آزمایش شوند. پیش‌بینی می‌کنیم که اپی‌توپ‌های مورد بررسی دارای پتانسیل درمانی با دامنه مطلوبی باشند. تجزیه و تحلیل انفورماتیک ایمنی ما اپی‌توپ‌های T و سلول‌های B راهکاری جدید و با پشتوانه قوی بر اساس الگوریتم‌های محاسباتی است که این ممکن است به توسعه واکسن‌های مبتنی بر پپتیدهای قوی برای پرداختن به چالش قریب‌الوقوع کوید-۱۹ کمک کند.

توسعه واکسن‌های جدید و به موقع برای دفاع از بار جهانی در حال افزایش بیماری‌ها، بسیار مهم است. با پیشرفت فناوری مبتنی بر توالی‌یابی، اکنون اطلاعات کافی در مورد ژنومیک و پروتئومیک و ویروس‌های مختلف وجود دارد. در نتیجه، امروزه با کمک ابزارهای مختلف بیوانفورماتیک می‌توان واکسن‌های پپتیدی را بر اساس اپی‌توپ مختلف طراحی کرد.

در پژوهش‌های مختلف طراحی واکسن مبتنی بر اپی‌توپ علیه

زاویه psi چرخش راحول باند Calpha-C مشخص می‌کند.

از آنجا که پلی‌پپتیدها فرایند تاخوردگی را متحمل می‌شوند، زوایای phi و psi در محدوده چرخش ۱۸۰- تا ۱۸۰+ درجه بسته به نوع زنجیره جانبی اسید آمینه قرار می‌گیرند. ترکیباتی که اتم‌ها در آن در فاصله‌ای نزدیک‌تر از مجموع شعاع واندروالسی آن‌ها قرار می‌گیرند، نواحی غیرمجاز یا پرت نقشه را می‌سازند. قرارگیری در این نواحی برای همه اسید آمینه‌ها به غیر از گلایسین از نظر برخورد فضایی ممکن نیست. گلایسین به علت نداشتن زنجیره جانبی محدودیت سایر اسید آمینه‌ها را نداشته و در تمام نقاط نقشه، به‌خصوص نواحی مخصوص دوره‌ها در ساختار دوم که برای سایرین ممنوع است، می‌تواند قرار بگیرد.

مکان این اسید آمینه در نقشه حاصل از سرور PROCHECK با علامت مثلث قابل تشخیص است و در محاسبات آماری لحاظ نمی‌شود. درصد باقی‌مانده‌ها در ناحیه مطلوب راهنمای خوبی برای ارزیابی کیفیت استریوشیمیایی ساختار است. از طریق بررسی نمودار رامانچاندرا مشاهده شد که حدود ۹۳/۷ درصد از آمینواسیدهای ترکیب مدل واکسن مورد مطالعه در مناطق مطلوب و ۵/۹ درصد در مناطق مجاز و ۰/۴ درصد در مناطق تقریباً مجاز و صفر درصد در مناطق غیرمجاز سازه ایمنی‌زا قرار داشت [۲۰].

همچنین با کمک سرور ProSA تمام اتم‌های کربن آلفا سازه ایمنی‌زا بررسی شدند و نتایج حاصل از آن در قالب Z score که ۵/۶۵- بود، به دست آمد که عددی مطلوب برای سازه ایمنی‌زا محسوب می‌شود. مقدار درصد جایگاه آمینواسیدها در سرور PROCHECK بالای ۹۰ درصد، برای یک ساختار پایدار با بررسی کریستالوگرافی ساختارهای پروتئینی شناخته شده، مورد انتظار است.

توانایی تشخیص اپی‌توپ‌ها در پاسخ ایمنی، کاربرد مهمی در تشخیص بیماری دارد و در نتیجه از گام‌های اساسی در مطالعات ایمونوبیوانفورماتیک شناسایی و نقشه‌برداری آن‌ها محسوب می‌شود. اپی‌توپ‌ها، گروه‌های تعریف‌شده‌ای از اسیدهای آمینه هستند که در ترکیب یک پروتئین قرار دارند و پاسخ ایمنی را به وسیله برهم‌کنش با گیرنده‌های یاخته T و B فعال می‌کنند.

در اینجا، ما توسعه واکسن مبتنی بر اپی‌توپ را بررسی کردیم که پروتئین اسپایک را هدف قرار می‌دهد و از پروتئین اسپایک سلول‌های اپی‌توبی پروتئینی مبتنی بر سلول‌های T که شاید پاسخ ایمنی را در میزبان ترویج دهند، با استفاده از سرورهای Propred-I و MHC2pred بررسی و شناسایی شدند. تجزیه و تحلیل‌ها در سطح ساختاری پروتئین اولیه، ثانویه و سوم روی آن‌ها انجام شد که اپی‌توپ‌های کلاس (VGYLQPR)- MHC-I

از این رو، اپی‌توپ‌های مورد بررسی ما معیارهای ارزیابی سازمان غذا و کشاورزی و سازمان بهداشت جهانی از پیش‌بینی آلرژی را برآورده نمی‌کند و توسط این طرح به‌عنوان یک غیرآلرژن طبقه‌بندی می‌شود [۴۰] و به همین دلیل، پیشنهاد کردیم که اپی‌توپ پیشنهادی بتواند پاسخ ایمنی مؤثر را به‌عنوان واکسن پپتید در داخل بدن ایجاد کند.

مطالعه ما نشان داده است رویکردهای محاسباتی یکپارچه می‌تواند برای پیش‌بینی کاندیداهای سازه‌های ایمنی‌زا (واکسن) علیه پاتوژن‌ها، از جمله HCoV با روش‌های معتبر که قبلاً توصیف شده، مورد استفاده قرار گیرد. به این ترتیب، در مطالعات اینسلیکو هم در زمان و هم هزینه برای محققان صرفه‌جویی می‌شود و می‌تواند کار آزمایشی را با احتمال بیشتری برای پیدا کردن راه‌حل‌های مورد نظر و با آزمایش‌های کمتری و تکرار خطاها از سنجش‌ها هدایت کند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تمامی اصول اخلاقی در این مقاله در نظر گرفته شده است. شرکت کنندگان در جریان هدف تحقیق و مراحل اجرای آن قرار گرفتند. آن‌ها از محرمانه بودن اطلاعات خود اطمینان داشتند. اصول کنوانسیون هلسینکی نیز رعایت شد.

حامی مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی از سازمان‌های مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیر انتفاعی دریافت نکرد و یک طرح شخصی می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان استانداردهای نگارش استاندارد را بر اساس توصیه‌های کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی رعایت کردند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی در نگارش این مقاله وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از اساتید دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که همکاری لازم را برای تهیه این کار تحقیقاتی داشتند، تقدیر و تشکر می‌شود.

ویروس‌هایی مانند ویروس تب دنگو^{۲۸}، ویروس چیکونگونیا^{۲۹}، ویروس آنسفالیت سنت لوئیس^{۳۰} و موارد دیگر صورت گرفته است [۳۱-۳۲]. اگرچه طراحی واکسن مبتنی بر اپی‌توپ تبدیل به یک مفهوم آشنا شده است، اما در مورد HCoV هنوز کار زیادی انجام نشده است. HCoV یک ویروس دارای RNA است که به خاطر فقدان سیستم ترمیم بیشتر از ویروس‌های دارای DNA جهش می‌یابد و این نوع جهش‌ها بیشتر در پروتئین غشای خارجی، یعنی پروتئین سنبله یا اسپایک رخ می‌دهد.

این نوع جهش‌ها منجر به فرار آن‌ها از پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال و باعث افزایش پایداری HCoV‌ها در بدن میزبان می‌شوند [۳۳-۳۴]. به همین دلیل پروتئین سنبله یا اسپایک به دلیل توانایی در ایجاد پاسخ ایمنی مخاطی سریع‌تر و طولانی‌مدت‌تر نسبت به سایر پروتئین‌ها، بیشترین پتانسیل را به‌عنوان هدف برای طراحی واکسن‌ها دارد. به همین دلیل، محبوبیت زیادی در بین محققان به دست آورده است [۳۵، ۳۶]. از این نظر، باید یک واکسن مناسب HCoV طراحی شود تا بر عوارض جانبی این عفونت ویروسی غلبه کند [۳۷].

در حال حاضر، واکسن‌ها بیشتر مبتنی بر مصونیت سلول B است، اما اخیراً واکسن‌های مبتنی بر اپی‌توپ سلول T ایجاد شده است، زیرا میزبان می‌تواند پاسخ ایمنی قوی سلول CD8+T را علیه سلول آلوده تولید کند. با گذشت زمان، به دلیل رانش آنتی‌ژن، هر ذره خارجی می‌تواند از سلول‌های خاطره ایمنی آنتی‌بادی فرار کند.

با این حال، پاسخ ایمنی سلول T اغلب ایمنی طولانی‌مدتی فراهم می‌کند. در اینجا، اپی‌توپ‌های سلول B و سلول‌های T را برای بررسی پیش‌بینی مصونیت به روش‌های مختلف استفاده کردیم، اما سایر مطالعات اخیر در مورد HCoV فقط نشان‌دهنده اپی‌توپ سلول T است و ما می‌خواهیم یافته‌های بیشتر خود را در اینجا بیان کنیم.

معیارهایی مختلفی وجود دارد که باید توسط یک اپی‌توپ داوطلب واکسن برآورده شود. با این حال، آلرژی‌زایی یکی از موانع برجسته در تولید واکسن است. امروزه، بیشتر واکسن‌ها سیستم ایمنی بدن را به یک واکنش «آلرژیک»، از طریق القای سلول‌های T کمک‌کننده (Th2) و ایمونوگلوبولین E (IgE) تحریک می‌کنند. طبق ارزیابی برنامه سازمان غذا و کشاورزی^{۳۱} و سازمان بهداشت جهانی^{۳۲} از پیش‌بینی آلرژی‌زایی، یک توالی به طور بالقوه اگر هویت حداقل شش اسید آمینه متعارف یا ۰/۳۵ آلرژی‌زا داشته باشد، حساسیت‌زا است.

28. Dengue fever
29. Chikungunya
30. Encephalitis Saint Louis
31. Food and Agriculture Organization
32. World Health Organization

References

- [1] González JM, Gomez-Puertas P, Cavanagh D, Gorbalenya AE, Enjuanes L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch Virol*. 2003; 148(11):2207-35. [DOI:10.1007/s00705-003-0162-1] [PMID] [PMCID]
- [2] Cavanagh D, Mawditt K, Welchman Dde B, Britton P, Gough RE. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol*. 2002; 31(1):81-93. [DOI:10.1080/03079450120106651] [PMID]
- [3] Yoo D, Deret D. A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine Coronavirus confers resistance to virus neutralization. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001; 8(2):297-302. [DOI:10.1128/CDLI.8.2.297-302.2001] [PMID] [PMCID]
- [4] Bourdette DN, Edmonds E, Smith C, Bowen JD, Guttmann CR, Nagy ZP, et al. A highly immunogenic trivalent T cell receptor peptide vaccine for multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2005; 11(5):552-61. [DOI:10.1191/1352458505ms1225oa] [PMID]
- [5] López JA, Weilenman C, Audran R, Roggero MA, Bonelo A, Tiercy JM, et al. A synthetic malaria vaccine elicits a potent CD8(+) and CD4(+) T lymphocyte immune response in humans. Implications for vaccination strategies. *Eur J Immunol*. 2001; 31(7):1989-98. [DOI:10.1002/1521-4141(200107)31:7<1989::AID-EJIM11752>3.0.CO;2-M] [PMID] [PMCID]
- [6] Knutson KL, Schiffman K, Disis ML. Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J Clin Invest*. 2001; 107(4):477-84. [DOI:10.1172/JCI11752] [PMID] [PMCID]
- [7] Petrovsky N, Brusic V. Computational immunology: The coming of age. *Immunol Cell Biol*. 2002; 80(3):248-54. [DOI:10.1046/j.1440-1711.2002.01093.x] [PMID]
- [8] 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] [PMID] [PMCID]
- [9] Liao L, Noble WS. Combining pairwise sequence similarity and support vector machines for detecting remote protein evolutionary and structural relationships. *J Comput Biol*. 2003; 10(6):857-68. [DOI:10.1089/106652703322756113] [PMID]
- [10] Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*. 1990; 276(1-2):172-4. [DOI:10.1016/0014-5793(90)80535-Q] [PMID] [PMCID]
- [11] Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*. 1985; 55(3):836-9. [DOI:10.1128/jvi.55.3.836-839.1985] [PMID] [PMCID]
- [12] Karplus PA, Schulz GE. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*. 1985; 72(4):212-3. [DOI:10.1007/BF01195768] [PMID] [PMCID]
- [13] Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. 2006; 2:2. [DOI:10.1186/1745-7580-2-2] [PMID] [PMCID]
- [14] Chou PY, Fasman GD. Empirical predictions of protein conformation. *Annu Rev Biochem*. 1978; 47:251-76. [DOI:10.1146/annurev.bi.47.070178.001343] [PMID]
- [15] Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP v. 2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of Molecular Modeling*. 2014; 20(6):1-6. [DOI:10.1007/s00894-014-2278-5] [PMID] [PMCID]
- [16] 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] [PMID] [PMCID]
- [17] Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Open Source Drug Discovery Consortium, Raghava GP. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS One*. 2013; 8(9):e73957. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0073957> [PMID] [PMCID]
- [18] Thévenet P, Shen Y, Maupetit J, Guyon F, Derreumaux P, Tuffery P. PEP-FOLD: An updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(W1):W288-93. [DOI:10.1093/nar/gks419] [PMID] [PMCID]
- [19] Shen Y, Maupetit J, Derreumaux P, Tuffery P. Improved PEP-FOLD approach for peptide and mini-protein structure prediction. *J Chem Theory Comput*. 2014; 10(10):4745-58. [DOI:10.1021/ct500592m] [PMID]
- [20] Zhang Y, Skolnick J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins*. 2004; 57(4):702-10. [DOI:10.1002/prot.20264] [PMID] [PMCID]
- [21] 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] [PMID] [PMCID]
- [22] Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem*. 1980; 88(6):1895-8. [PMID]
- [23] Rose GD, Gierasch L, Smith JA. Turns in peptides and proteins. *Adv Protein Chem*. 1985; 37:1-109. [DOI:10.1016/S0065-3233(08)60063-7] [PMID] [PMCID]
- [24] 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] [PMID] [PMCID]
- [25] Zhang M, Ishii K, Hisaeda H, Murata S, Chiba T, Tanaka K, et al. Ubiquitin-fusion degradation pathway plays an indispensable role in naked DNA vaccination with a chimeric gene encoding a syngeneic cytotoxic T lymphocyte epitope of melanocyte and green fluorescent protein. *Immunology*. 2004; 112(4):567-74. [DOI:10.1111/j.1365-2567.2004.01916.x] [PMID] [PMCID]
- [26] Yang X, Yu X. An introduction to epitope prediction methods and software. *Rev Med Virol*. 2009; 19(2):77-96. [DOI:10.1002/rmv.602] [PMID]
- [27] Singh H, Raghava G. ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*. 2001; 17(12):1236-7. [DOI:10.1093/bioinformatics/17.12.1236] [PMID] [PMCID]
- [28] Lapelosa M, Gallicchio E, Arnold GF, Arnold E, Levy RM. In silico vaccine design based on molecular simulations of rhinovirus chimeras presenting HIV-1 gp41 epitopes. *J Mol Biol*. 2009; 385(2):675-91. [DOI:10.1016/j.jmb.2008.10.089] [PMID] [PMCID]
- [29] Chakraborty S, Chakravorty R, Ahmed M, Rahman A, Waise TM, Hassan F, et al. A computational approach for identification of epitopes in dengue virus envelope protein: A step towards designing a universal dengue vaccine targeting endemic regions. *In Silico Biol*. 2010; 10(5-6):235-46. [DOI:10.3233/ISB-2010-0435] [PMID]
- [30] Islam R, Sakib MS, Zaman A. A computational assay to design an epitope-based peptide vaccine against chikungunya virus. *Future Virol*. 2012; 7(10):1029-42. [DOI:10.2217/fv.12.95] [PMID] [PMCID]
- [31] Hasan MA, Hossain M, Alam MJ. A computational assay to design an epitope-based Peptide vaccine against Saint Louis encephalitis virus. [PMID] [PMCID]

- Bioinform Biol Insights. 2013; 7:347-55. [DOI:10.4137/BBI.S13402] [PMID] [PMCID]
- [32] Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol.* 2003; 20(1):122-9. [DOI:10.1093/molbev/msg010] [PMID]
- [33] Manzin A, Solfrosi L, Petrelli E, Macarri G, Tosone G, Piazza M, et al. Evolution of hypervariable region 1 of hepatitis C virus in primary infection. *J Virol.* 1998; 72(7):6271-6. [DOI:10.1128/JVI.72.7.6271-6276.1998] [PMID] [PMCID]
- [34] Christie JM, Chapel H, Chapman RW, Rosenberg WM. Immune selection and genetic sequence variation in core and envelope regions of hepatitis C virus. *Hepatology.* 1999; 30(4):1037-44. [DOI:10.1002/hep.510300403] [PMID]
- [35] Ma C, Li Y, Wang L, Zhao G, Tao X, Tseng CT, et al. Intranasal vaccination with recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein induces much stronger local mucosal immune responses than subcutaneous immunization: Implication for designing novel mucosal MERS vaccines. *Vaccine.* 2014; 32(18):2100-8. [DOI:10.1016/j.vaccine.2014.02.004] [PMID] [PMCID]
- [36] Yang ZY, Kong WP, Huang Y, Roberts A, Murphy BR, Subbarao K, et al. A DNA vaccine induces SARS Coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature.* 2004; 428(6982):561-4. [DOI:10.1038/nature02463] [PMID] [PMCID]
- [37] Sudhakar A, Robin G, Boyd L, Agnihothram S, Gopal R, Yount BL, et al. Platform strategies for rapid response against emerging coronaviruses: MERS-CoV serologic and antigenic relationships in vaccine design. *The Journal of Infectious Diseases.* 2013; 10:1093.
- [38] McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Hubbard R. Vaccination and allergic disease: A birth cohort study. *Am J Public Health.* 2004; 94(6):985-9. [DOI:10.2105/AJPH.94.6.985] [PMID] [PMCID]
- [39] Zhou Y, Yang Y, Huang J, Jiang S, Du L. Advances in MERS-CoV vaccines and therapeutics based on the receptor-binding domain. *Viruses.* 2019; 11(1):60. [DOI:10.3390/v11010060] [PMID] [PMCID]
- [40] Li Y-H, Gao H, Xiao Y, Weng T, Yu D, Hu C, et al. Bioinformatics analysis on potential anti-viral targets against spike protein of MERS-CoV. 9th international conference on information technology in medicine and education (ITME), 2018 Oct 19-21, Hangzhou, China. [DOI:10.1109/ITME.2018.00026]
- [41] Mubarak A, Alturaiki W, Hemida MG. Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Infection, immunological response, and vaccine development. *J Immunol Res.* 2019; 2019:6491738. [DOI:10.1155/2019/6491738]. <https://www.hindawi.com/journals/jir/2019/6491738/> [PMID] [PMCID]
- [42] Shi J, Zhang J, Li S, Sun J, Teng Y, Wu M, et al. Epitope-based vaccine target screening against highly pathogenic MERS-CoV: An in silico approach applied to emerging infectious diseases. *PLoS ONE.* 2015; 10:e0144475. [DOI:10.1371/journal.pone.0144475] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank