مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۳، فروردین ۱۴۰۴، ۴۶-۱۹

طراحی ایمونوانفورماتیکی کاندید واکسن چند اپی‌توپی علیه ویروس آبله میمون از پروتئین پوکسین-شلافن

مریم احساسات‌وطن[۱]، بهرام باغبان کهنه‌روز[۲]، فدرا نژاد ایران‌نژاد[۳]

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۲۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۳/۰۱/۳۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۳/۱۲/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: ویروس آبله میمون، از خانواده Poxviridae، ویروسی با DNA دو رشته‌ای و عامل ایجاد آبله میمون در انسان است. ویروس‌های آبله یک نوکلئاز غیرمعمول به‌نام پوکسین دارند که دی‌نوکلئوتید حلقوی cGAMP-۲'-۳' به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه مهم در مسیر سیگنال‌دهی cGAS-STING (Cyclic GMP-AMP Synthase-Stimulator of Interferon Genes) را می شکافد. با وجود داروها و واکسن‌های مختلف برای عفونت‌های ویروس‌های ارتوپاکس، شیوع آبله میمون نگرانی‌های جهانی را برانگیخته است. در مطالعه حاضر، پروتئین پوکسین-شلافن ویروس آبله میمون به‌عنوان هدف بالقوه برای ایجاد کاندید واکسن چند اپی‌توپی استفاده شد.

مواد و روش‌ها: این تحقیق به‌صورت تحلیل داده‌های بیوانفورماتیکی انجام شد. اپی‌توپ‌های انتخاب شده از نظر حساسیت‌زایی، غیرسمی بودن و ظرفیت تحریک پاسخ سلول‌های T و B ارزیابی شدند. پس از ارزیابی برهم‌کنش بین واکسن و گیرنده شبه‌تول-۴ (Toll-like receptor-4; TLR-4) توسط Cluspro، مجموعه داکینگ با استفاده از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی و ایمنی تأیید شد.

یافته‌ها: کاندید واکسن طراحی‌شده بسیار آنتی‌ژنیک، غیرحساسیت‌زا، دارای خواص فیزیکوشیمیایی قابل قبول با قابلیت بیان به صورت محلول بود. ساختار سه‌بعدی واکسن و برهم‌کنش بالقوه آن با گیرنده TLR-4 تأیید شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پایداری مجموعه واکسن-TLR4 را تأیید کرد. طبق نتایج شبیه‌سازی ایمنی کاندید واکسن قادر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی محافظتی در بدن انسان بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، مؤثرترین اپی‌توپ‌ها از پروتئین پوکسین-شلافن ویروس آبله میمون انتخاب شدند. نتایج این مطالعه تأثیر بالقوه کاندید واکسن در تحریک پاسخ‌های ایمنی را نشان داد. مطالعه حاضر می‌تواند نقطه عطفی در توسعه واکسن برعلیه ویروس آبله میمون باشد. با این‌حال، مطالعات in vitro و in vivo بیشتری نیاز است.

واژه‌های کلیدی: آبله میمون، ایمونوانفورماتیک، پوکسین-شلافن، کاندید واکسن

ارجاع: احساسات‌وطن م، باغبان کهنه‌روز ب، ایران‌نژاد فن. طراحی ایمونوانفورماتیکی کاندید واکسن چند اپی‌توپی بر علیه ویروس آبله میمون از پروتئین پوکسین-شلافن. *مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان*، سال ۱۴۰۴، دوره ۲۴ شماره ۱، صفحات: ۴۶-۱۹.

۱- دکتری تخصصی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۵۶۰۰۳، پست الکترونیکی: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir
۳- کارشناسی ارشد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

مقدمه

ویروس آبله میمون (Monkeypox virus; MPXV) عامل ایجاد یک بیماری مشترک بین انسان و دام به نام آبله میمون (Mpox) است. این ویروس دارای DNA دو رشته‌ای (dsDNA) متعلق به جنس *Orthopoxvirus* (OPXV)، خانواده *Poxviridae* و زیرخانواده *Chordopoxvirinae* است (۱). سایر اعضای این جنس عبارتند از ویروس *Variola* (VARV)، ویروس آبله گاوی (CPXV)، ویروس *Vaccinia* (VACV)، ویروس آبله شتر (CMLV)، ویروس *Taterapox* (TATV) و ویروس *Ectromelia* (ECTV). MPXV به کلاد I و II تقسیم می‌شود که کلاد II نیز به دو زیر دسته IIa و IIb طبقه‌بندی می‌شود (۲). در پنج دهه اخیر، MPXV بومی غرب و مرکز آفریقا بوده (۳) و انتقال ویروس به مناطق غیر بومی بسیار نادر بود (۱). با این حال، از سال ۲۰۱۷ بروز Mpox در خارج از مناطق آندمیک افزایش یافته و مشخصات اپیدمیولوژیک این بیماری در مناطق آندمیک تغییر کرده است (۴).

از اوایل سال ۲۰۲۲، چندین عفونت مرتبط با ویروس آبله میمون در انسان و در سراسر جهان گزارش شده و این ویروس را تبدیل به یک تهدید نوپدید برای جمعیت انسانی کرده است (۵). ویروس آبله میمون می‌تواند از طریق ارتباط نزدیک با ضایعات پوستی، قطرات تنفسی بزرگ و احتمالاً از طریق فومیت‌های آلوده از فردی به فرد دیگر سرایت کند (۶). در اکثر موارد، تب علامت اولیه بیماری است و اغلب با ظهور ضایعات پاپولوپوستولار، وزیکولوپوستولار و زخمی روی صورت و بدن، علاوه بر لنفادنوپاتی شدید همراه است (۷). عوارض ناشی از این بیماری می‌تواند شامل عفونت‌های ثانویه، التهاب حاد نایژه، سپسیس، التهاب مغز و عفونت قرنیه همراه با کاهش بینایی باشد (۸). سازمان بهداشت جهانی نرخ مرگ و میر ناشی از ویروس آبله میمون را در سال‌های اخیر حدود ۳ تا ۶ درصد گزارش کرده است که این میزان گاهی به ۱۱ درصد نیز رسیده است (۵). در حال حاضر هیچ روش درمانی برای آبله میمون در انسان وجود ندارد. با این حال، دو دارو، برینسیدوفوویر و تکوویریمات، که هر دو به صورت خوراکی در دسترس هستند، توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (U.S. Food and Drug Administration; USFDA) برای مدیریت آبله تأیید شده‌اند (۱۰، ۹). هیچ یک از داروها برای اثربخشی آن در آزمایشات بالینی انسانی آزمایش نشده‌اند. با این حال، مطالعات حیوانی برای هر دو دارو نشان داده است که آن‌ها در برابر سایر ویروس‌های ارتوپاکس نیز مؤثر هستند. با توجه به میزان نسبی مرگ میر و عوارض ناشی از این ویروس، طراحی و تولید یک واکسن مؤثر بر علیه ویروس آبله میمون ضروری به نظر می‌رسد (۴).

تولید واکسن با استفاده از روش‌های سنتی زمان‌بر و نسبتاً پر هزینه است (۱۱). طراحی واکسن با بهره‌گیری از مطالعات محاسباتی می‌تواند برای تولید یک واکسن جدید بر علیه ویروس آبله میمون استفاده شود (۱۲). استراتژی طراحی واکسن مبتنی بر اپی‌توپ به‌طور غیرقابل انکاری وسوسه انگیز است، چرا که یک توالی کوچک اما مهم از نظر ایمنی، اغلب قادر به تحریک سیستم دفاعی در برابر یک بیماری مهم و پیچیده است. در طراحی واکسن‌های چند اپی‌توپی از اطلاعات ژنتیکی بر اساس داده‌های تجربی برای انتخاب مؤثرترین اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن استفاده می‌شود (۱۳). واکسن‌های چند اپی‌توپی می‌توانند منجر به محافظت در برابر انواع اهداف آنتی‌ژن، سویه‌ها و یا پاتوژن‌ها شوند (۱۵، ۱۴).

ویروس‌های آبله دارای یک آنزیم نوکلئاز نسبتاً غیرمعمول به نام پوکسین هستند که در ویروس‌های آبله پستانداران از جمله

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

پاتوژن‌های انسانی ویروس آبله میمون و ویروس آبله گاوی حفظ شده است (۱۷، ۱۶). سوبسترای این آنزیم، ´۲، ´۳- گوانوزین مونوفسفات-آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cGAMP) است. cGAMP یک دی‌نوکلئوتید حلقوی است که از واحدهای AMP و GMP تشکیل شده و از طریق پیوندهای ´۵- ´۳ و ´۵- ´۲ حلقوی می‌شود. پوکسین‌ها پیوند ´۵- ´۳ در cGAMP را می‌شکافند و به‌طور مؤثر آن را از سیتوپلاسم حذف می‌کنند (۱۸، ۱۶). این عمل برای بقاء ویروس مهم است، زیرا cGAMP به عنوان پیام‌رسان ثانویه توسط cGAMP سنتاز تولید می‌شود، آنزیمی که در سیتوپلاسم قرار دارد و با حضور DNA فعال شده و بخشی از دفاع در برابر ویروس‌های DNA است که در سیتوپلاسم تکثیر می‌شوند (۱۹). با فعال شدن cGAMP سنتاز، cGAMP تولید شده و به STING (محرک ژن‌های اینترفرون) متصل می‌شود و باعث ایجاد تغییر ساختاری و فعال کردن سیگنال‌های وابسته به STING می‌شود. این فرآیند اغلب به‌عنوان مسیر سیگنالینگ cGAS-STING شناخته می‌شود و پوکسین‌ها قادر هستند به طور مؤثر این مسیر را قطع کنند (۲۰). پوکسین گاهی اوقات به یک دمین شلافن در انتهای کربوکسیلی متصل می‌شود که همولوژی بالایی با شلافن انسانی داشته و توسط اینترفرون‌ها (Interferons; IFNs) تنظیم می‌شود (۲۱). با این حال، عملکرد شلافن در اتصال با پوکسین هنوز معلوم نیست. بنابراین، هدف این تحقیق طراحی ایمونوانفورماتیکی یک کاندید واکسن جدید چند اپی‌توپی با استفاده از اپی‌توپ‌های بسیار ایمنی‌زا از پروتئین پوکسین-شلافن (B4R) است که قادر به ایجاد پاسخ ایمنی هومورال و سلولی علیه آبله میمون در انسان باشد. پروتئین پوکسین-شلافن با توجه به ویژگی‌های برتر ایمنی‌زایی برای پیش‌بینی مؤثرترین اپی‌توپ‌ها در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت تحلیل داده‌های بیوانفورماتیکی در سال ۱۴۰۳ در آزمایشگاه مهندسی ژنتیک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز اجرا شد.

بازیابی توالی پروتئین B4R سویه‌های شایع و بررسی حفاظت شدگی توالی

توالی آمینواسیدی پروتئین B4R با شماره دسترسی Q8V4S4 از داده پایگاه UniProt در قالب FASTA بازیابی شد. برای طراحی یک واکسن مؤثر در برابر ویروس آبله میمون، حفاظت‌شدگی توالی آمینواسیدی پروتئین B4R در سویه‌های شایع ویروس آبله میمون با استفاده از ابزار Clustal Omega (۲۲) بررسی شد.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B

از سرورهای BepiPred 3.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/) (۲۳)، ABCpred (http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/) (۲۴) و ابزار پیش‌بینی دسترسی سطحی Emini از سرور IEDB برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B استفاده شد. در BepiPred 3.0 مقدار آستانه روی ۰/۱۵، اختصاصیت روی ۰/۵۷ و حساسیت روی ۰/۵۸ تنظیم شد. ABCpred اپی‌توپ‌ها را با استفاده از شبکه طبیعی و با دقت ۶۵/۹۳ درصد پیش‌بینی می‌کند. در این سرور، مقادیر نزدیک به یک با احتمال بالاتری اپی‌توپ خواهند بود. در روش Emini نیز مقدار آستانه بر روی ۱ تنظیم شد. در نهایت، نواحی که توسط هر سه سرور به عنوان اپی‌توپ شناسایی شده بودند برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول T کشنده (Cytotoxic T lymphocyte; CTL)

از ابزار MHC I از سرور IEDB (http://tools.iedb.org/mhci/) و روش پیشنهاد شده توسط سرور (NetMHCpan 4.1 EL) (۲۵) برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های T کشنده استفاده شد.

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

پارامترهای پیش‌بینی شامل گونه منبع MHC، آلل‌های MHC (Major histocompatibility complex) و طول اپی‌توپ به‌ترتیب گونه انسان، مجموعه مرجع آلل HLA (Human leukocyte antigen) و ۹ تا ۱۰ اسیدآمینه انتخاب شد. پپتیدهای با صدک کمتر از ۰/۵ برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند (۲۶).

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول T کمک کننده (Helper T lymphocyte; HTL)

از ابزار پیش‌بینی MHC-II سرور IEDB (http://tools.immuneepitope.org/mhcii/) (۲۷) و سرور NetMHCIIPan نسخه ۴ (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/) (۲۸) برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول T کمک‌کننده استفاده شد. در سرور IEDB از روش پیشنهاد شده NetMHCIIPan 4.1 EL و پارامترهای پیش‌بینی گونه منبع MHC انسان، مجموعه مرجع ۷ آلل HLA و طول اپی‌توپ ۱۲ تا ۱۸ اسیدآمینه استفاده شد. اپی‌توپ‌های با صدک پایین‌تر تمایل اتصال بالاتری دارند، بنابراین اپی‌توپ‌هایی با صدک کمتر از ۱ برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند.

بررسی آنتی‌ژنیسیته، ایمونوژنیسیته حساسیت‌زایی، سمیت و حفاظت شدگی اپی‌توپ‌های انتخاب شده

از سرور VaxiJen نسخه ۲/۰ (http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html) (۲۹) برای پیش‌بینی آنتی‌ژنیسیته اپی‌توپ‌های انتخاب شده استفاده شد. مقدار آستانه در این سرور روی ۰/۴ تنظیم و اپی‌توپ‌هایی با امتیاز بالاتر از ۰/۴ برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. از سرور Class I Immunogenicity (http://tools.iedb.org/immunogenicity/) (۳۰) برای بررسی ایمونوژنیسیته اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن سلول T کشنده استفاده شد. از سرور IFN-γ Epitope (webs.iiitd.edu.in/raghava/ifnepitope/index.php) و با روش ترکیبی Motif و SVM و مدل IFN-γ در برابر غیر IFN-γ برای پیش‌بینی توان القاء اینترفرون گاما توسط اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن سلول‌های T کمک کننده استفاده شد. از سرورهای Allergen FP نسخه ۱,۰ (http://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/) (۳۱) و AllerTOP نسخه ۲,۰ (http://ddg-pharmfac.net/AllerTOP/) (۳۲) برای بررسی عدم حساسیت‌زایی و از ToxinPred2 (webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred2/index.html) (۳۳) برای بررسی عدم سمیت اپی‌توپ‌های انتخاب شده استفاده شد. حفاظت‌شدگی اپی‌توپ‌های انتخاب شده با استفاده از ابزار حفاظت اپی‌توپ از سرور IEDB (http://tools.immuneepitope.org/tools/conservancy/) بررسی شد. اپی‌توپ‌های با حفاظت‌شدگی ۱۰۰ درصد انتخاب شدند.

واکنش متقابل با آنتی‌ژن‌های میزبان

پاسخ‌های ایمنی نامطلوب ممکن است به دلیل واکنش متقابل با آنتی‌ژن‌های میزبان ایجاد شود. در نتیجه، بررسی پپتیدهای انتخاب شده در مرحله اولیه برای شباهت با پروتئوم موش و انسان بسیار مهم است. برای انجام این کار، از ابزار BLASTp از سرور NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (۳۴) استفاده شد.

بررسی پوشش جمعیتی اپی‌توپ‌های انتخاب شده

ابزار پوشش جمعیت از سرور IEDB (http://tools.iedb.org/population/) (۳۵) برای ارزیابی نرخ پوشش جمعیت برای اپی‌توپ‌های انتخاب شده CTL و HTL، همراه با آلل‌های HLA (Human leukocyte antigen) متناظر آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز بر روی کل جمعیت جهانی با حفظ پارامترهای پیش‌فرض انجام شد. ارزیابی برای هر دو کلاس I و II از آلل‌های HLA انجام شد.

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

طراحی سازه کاندید واکسن چند اپی‌توپی

یک واکسن کاندید چند اپی‌توپی با اتصال اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B، سلول‌های T کشنده و سلول‌های T کمک کننده پیش‌بینی شده از پروتئین B4R ویروس آبله میمون با استفاده از لینکرهای مختلف طراحی شد. از لینکر KK برای اتصال اپی‌توپ‌های سلول B استفاده شد، چرا که این لینکر منجر به تثبیت ساختار پروتئین شده و فعالیت ایمنی اپی‌توپ‌های واکسن را حفظ می‌کند (۳۶, ۳۷). از لینکرهای AAY و GPGPG با توجه به مزایای آن‌ها در رابطه با طول توصیه شده، انعطاف‌پذیری و توانایی تسریع پردازش و ارائه ایمنی به ترتیب برای اتصال اپی‌توپ‌های CTL و HTL استفاده شد (۳۸-۴۰). علاوه بر این، توالی زیرواحد B سم وبا (CTB) با توالی آمینواسیدی TPQNITDLCAEYHNTQIYTLNDKIFSYTESLAGKREMAIIT FKNGAIFQVEVPGSQHIDSQK KAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISM AN به دلیل توانایی آن برای بهبود ارائه آنتی‌ژن و پاسخ ایمنی به عنوان ادجوانت با استفاده از لینکر EAAAK به انتهای کربوکسیلی کاندید واکسن چند اپی‌توپی متصل شد. برای تسهیل تشخیص و خالص‌سازی پروتئین یک برچسب هیستیدینی شامل ۶ اسیدآمینه در انتهای آمینی کاندید واکسن چند اپی‌توپی تعبیه شد (۲۶).

پیش‌بینی آنتی‌ژنیسیته، حساسیت‌زایی، سمیت و حلالیت کاندید واکسن چند اپی‌توپی

آنتی‌ژنیسیته کاندید واکسن چند اپی‌توپی با استفاده از VaxiJen نسخه ۲/۰ (با مقدار آستانه ۰/۵) و ANTIGENpro (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/) ارزیابی شد. ANTIGENpro آنتی‌ژنیسیته کل پروتئین را مستقل از پاتوژن، مبتنی بر توالی و بدون هم‌ردیفی پیش‌بینی می‌کند. از سرورهای Allergen FP نسخه ۱,۰ و AllerTOP نسخه ۲/۰ برای آنالیز حساسیت‌زایی کاندید واکسن استفاده شد. Allergen FP آلرژن‌ها را با دقت ۸۸ درصد و AllerTOP با دقت ۸۵/۳ درصد از غیرآلرژن‌ها تشخیص می‌دهد. سمیت کاندید واکسن چند اپی‌توپی با استفاده از سرور ToxinPred2 با مدل یادگیری ماشین Random Fores و بر اساس ترکیب اسیدهای آمینه و با مقدار آستانه ۰/۵ پیش‌بینی شد. در نهایت، حلالیت کاندید واکسن با استفاده از سرور Protein-Sol (https://protein-sol.manchester.ac.uk/) (۴۱) پیش‌بینی شد. مقدار پیش‌بینی شده بیشتر از ۰/۴۵ نشان می‌دهد که بر اساس مجموعه داده‌های حلالیت تجربی، پروتئین کاندید حلالیت بهتری نسبت به میانگین پروتئین‌های محلول *E.coli* دارد.

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پیش‌بینی ساختار ثانویه کاندید واکسن

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی واکسن چند اپی‌توپی شامل ترکیب اسیدهای آمینه، وزن مولکولی، ترکیب اتمی، نقطه ایزوالکتریک نظری (pI)، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک، نیمه عمر تخمینی و میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) با استفاده از ابزار Protparam از سرور Expasy (https://web.expasy.org/protparam/) (Gasteiger et al., 2005) پیش‌بینی شد. سرورهای Prabi (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html) (۴۲) و PSIPRED (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) (۴۳) برای پیش‌بینی ساختار ثانویه کاندید واکسن چند اپی‌توپی مورد استفاده قرار گرفتند.

پیش‌بینی، بهینه‌سازی و تعیین کیفیت ساختار سوم کاندید واکسن

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

AlphaFold2 (۴۴) که یک روش یادگیری ماشین پیشرفته برای پیش‌بینی ساختار پروتئین است و تقریباً کل پروتئوم انسانی (۹۸/۵ درصد از پروتئین‌های انسانی) را در بر می‌گیرد برای پیش‌بینی مدل سه‌بعدی کاندید واکسن چند اپی‌توپی استفاده شد.

پس از آن، مدل پیش‌بینی‌شده با بالاترین رتبه انتخاب و با استفاده از سرور GalaxyRefine (https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE) (۴۵) بهینه‌سازی شد. برای ارزیابی ساختاری مدل پیش‌بینی شده و آنالیزهای استریوشیمیایی نمودار راماچانداران از سرور Procheck (۴۶) رسم و از ابزار ERRAT از سرور SAVES (۴۷) نسخه ۶/۰ و سرور ProSA-Web (۴۸) استفاده شد. نمودار راماچاندران یک نمایش بصری از توزیع باقی‌مانده‌های اسیدهای آمینه در مناطق مطلوب، مجاز و دورتر ارائه می‌دهد و به عنوان یک ابزار ضروری برای اعتبارسنجی و ارزیابی کیفیت مدل‌های پیش‌بینی شده از پروتئین عمل می‌کند. در ساختار پیش‌بینی شده، سرور ERRAT برهم‌کنش‌های غیر پیوندی بین انواع مختلف اتم را با مقایسه آن‌ها با ساختارهای بهینه شده ارزیابی می‌کند. امتیاز بالاتر در این سرور نشان دهنده یک مدل با کیفیت بالاتر است. علاوه بر این، ProSA Z-score با تخمین انرژی کل سازه از توزیع انرژی تولید شده از رونوشت‌های تصادفی ارزیابی کاملی از کیفیت کلی مدل ارائه می‌کند.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های ساختاری سلول B

اغلب اپی‌توپ‌های سلول B ماهیت ساختاری دارند و شامل ۱ تا ۵ بخش خطی از باقی‌مانده‌های اسید آمینه هستند. اپی‌توپ‌های ساختاری سلول B ناپیوسته بوده و در موقعیت‌های دور از هم و به صورت پراکنده در توالی پروتئین قرار دارند، که در صورت تاخوردگی صحیح پروتئین نزدیک هم قرار می‌گیرند. با این حال، این اپی‌توپ‌ها از نظر فضایی نزدیک به هم هستند و به عنوان مکان‌هایی برای واکنش با آنتی‌بادی عمل می‌کنند (۴۹). اپی‌توپ‌های ساختاری سلول‌های B با استفاده از سرور ElliPro (http://tools.iedb.org/ellipro/) که یک ابزار پیش‌بینی اپی‌توپ‌های غیرخطی سلول B است و به طور گسترده برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های ناپیوسته مورد استفاده قرار می‌گیرد پیش‌بینی شد. این سرور دارای بالاترین سطح دقت برای محاسبه اپی‌توپ‌های سلول B برای هر پروتئین شناخته شده‌ای است. مدل‌هایی با امتیاز بیشتر از ۰/۵ به عنوان اپی‌توپ‌های ساختاری سلول B در نظر گرفته می‌شوند.

داکینگ مولکولی

پاسخ ایمنی مؤثر زمانی رخ می‌دهد که کاندید واکسن با میل ترکیبی بالا به سلول‌های ایمنی هدف متصل شود. بر این اساس، بهترین ساختار از کاندید واکسن طراحی شده به عنوان مولکول هدف‌گیر و TLR-4 (شماره دسترسی در داده پایگاه پروتئینی: 4G8A) به عنوان مولکول هدف برای انجام آنالیز داکینگ مولکولی استفاده شدند. فرآیند داکینگ بین این پروتئین‌ها با استفاده از سرور ClusPro 2.0 (۵۰) انجام گرفت. این سرور قادر به پیش‌بینی میان‌کنش‌های پروتئین-پروتئین می‌باشد. بهترین مدل از این سرور انتخاب و با استفاده از سرور GalaxyRefine بهینه‌سازی شد. از سرور PRODIGY (۵۱) برای محاسبه انرژی آزاد اتصال (ΔG) در آنالیزهای داکینگ مولکولی استفاده شد. بهترین ساختار با منفی‌ترین انرژی اتصال و در نتیجه بیشترین تمایل برای اتصال به گیرنده توسط نرم‌افزار PyMOL تصویرسازی و اسیدهای آمینه درگیر در برهم‌کنش بین پروتئینی از جمله پیوندهای هیدروژنی، پل‌های نمکی و اتصالات غیرپیوندی با استفاده از نرم‌افزار LigPlot نسخه ۲/۲/۵ (۵۲) مورد بررسی قرار گرفت و نمودار دو بعدی برهم‌کنش‌ها ترسیم گردید.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای داشتن درک جامعی از پویایی و پایداری مجموعه کاندید واکسن-گیرنده با استفاده از نرم‌افزار GROMACS (نسخه ۲۰۱۹/۲) (۵۳) و میدان نیروی CHARMM27 انجام شد. هر سیستم در یک جعبه تری‌کلینیک با فاصله ۱ نانومتر از لبه جعبه در تمام جهات در محلول آبی با فرمت شارژ نقطه‌ای ساده (Simple Point Charge; SPC) قرار گرفت. بار کلی هر سیستم با استفاده از مقادیر مناسبی از یون‌های سدیم و کلر خنثی گردید. از الگوریتم Steepest Descent برای به حداقل رساندن انرژی در مراحل اولیه آماده‌سازی سیستم‌ها استفاده شد. شبیه‌سازی تحت شرایط مرزی و با حجم و فشار ثابت (NVT/NPT) برای هر سیستم به مدت ۵۰ نانوثانیه در دمای ۳۰۰ کلوین و فشار ثابت ۱ بار انجام شد. پیکربندی سیستم‌ها در هر ۰/۲ ثانیه ذخیره‌سازی شد. برای اطمینان از صحت نتایج، سه شبیه‌سازی مستقل برای هر سیستم و هر کدام به مدت ۵۰ نانوثانیه انجام شد. مسیرهای ذخیره شده در شبیه‌سازی برای آنالیزهای انحراف جذر میانگین مربعات (Root Mean Square Deviation; RMSD) برای کربن آلفا، جذر میانگین مربعات نوسانات (Root Mean Square Fluctuation; RMSF)، شعاع چرخش (Radius of Gyration; Rg)، سطح قابل دسترسی با حلال (Solvent Accessible Surface Area; SASA) و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی استفاده شد. نتایج حاصل از شبیه‌سازی توسط نرم‌افزار MS Excel مورد ارزیابی قرار گرفت (۵۴).

شبیه‌سازی پاسخ ایمنی

ویژگی‌های ایمونوژنیک کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده با استفاده از سرور C-ImmSim (http://150.146.2.1/CIMMSIM/index.php) شبیه‌سازی شد. این سرور یک مدل کامپیوتری مبتنی بر عامل است که از یک ماتریس امتیازدهی خاص موقعیت (Position-Specific Scoring Matrix; PSSM) برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های ایمنی و واکنش‌های ایمنی استفاده می‌کند و به طور هم‌زمان سه جزء اصلی سیستم عملکردی پستانداران (تیموس، غدد لنفاوی و مغز استخوان) را شبیه‌سازی می‌نماید. برای انجام شبیه‌سازی ایمنی، پارامترهای حجم شبیه‌سازی و مراحل شبیه‌سازی به ترتیب بر روی ۱۰ میکرولیتر و ۱۰۵۰ تنظیم شدند. ۳ تزریق به فاصله چهار هفته با ۱۰۰۰ مولکول واکسن بدون لیپوپلی‌ساکارید (LPS) انجام شد. بدین ترتیب، مراحل زمانی دنبال شده برای ۳ تزریق ۱، ۸۴، ۱۶۸ تعیین شد که هر مرحله برابر با ۸ ساعت است.

نتایج

بازیابی و همردیفی توالی آمینواسیدی پروتئین B4R

توالی آمینواسیدی پروتئین B4R از سویه‌های شایع ویروس آبله میمون با شماره دسترسی Q8V4S4 از داده پایگاه UniProt بازیابی شد. هم‌ردیفی توالی آن پروتئین B4R از سویه‌های شایع ویروس آبله میمون برای تعیین نواحی حفاظت شده با استفاده از ابزار Clustal Omega انجام شد. بر اساس نتایج همردیفی و با توجه به تشابه بیش از ۹۷ درصدی توالی‌های هم‌ردیف شده، نواحی حفاظت شده پروتئین B4R در سویه‌های شایع ویروس آبله میمون برای پیش‌بینی و انتخاب اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک برای طراحی واکسن چند اپی‌توپی بر علیه ویروس آبله میمون انتخاب شدند.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B

اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B با استفاده از سرورهای BepiPred، ABCpred و ابزار پیش‌بینی دسترسی سطحی Emini از سرور IEDB پیش‌بینی شدند. آنتی‌ژنیسیته اپی‌توپ‌ها با استفاده از سرور VaxiJen نسخه ۲/۰ بررسی شده و اپی‌توپ‌هایی

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

با امتیاز بیشتر از ۰/۴ به عنوان اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک انتخاب شدند. پس از بررسی حفاظت شدگی، عدم حساسیت‌زایی و عدم سمیت، تعداد ۶ اپی‌توپ خطی سلول B از پروتئین B4R ویروس آبله میمون انتخاب شدند (جدول ۱). اپی‌توپ‌های انتخاب شده واکنش متقابل با آنتی‌ژن‌های انسان و موش نداشتند.

جدول ۱- اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B

توالی	آنتی‌ژنیسیته	سمیت	حساسیت‌زایی	حفاظت‌شدگی	GRAVY	نیمه‌عمر
QMDSMEALEYLSELKE	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	-۰/۶۷۵	بیش از ۱۰ ساعت
YSTIKEKAKEMNALKP	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	-۱/۰۴۴	۲ دقیقه
EYLQIGDPIHDLEGNQ	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	-۰/۹۲۵	بیش از ۱۰ ساعت
HVLETGNAVYGKVQHE	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	-۰/۵۵۶	بیش از ۱۰ ساعت
GESVKFGNSINVKHTS	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	-۰/۶۰۶	بیش از ۱۰ ساعت
KVQHEYSTIKEKAKEMN	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	-۱/۵۷۱	۳ دقیقه

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های T کشنده

با استفاده از ابزار MHC-I از سرور IEDB اپی‌توپ‌های متصل شونده به آلل‌های کلاس یک MHC پیش‌بینی شدند. آنتی‌ژنیسیته و ایمونوژنیسیته اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده به ترتیب با VaxiJen نسخه ۲/۰ و Class I Immunogenicity بررسی شده و اپی‌توپ‌هایی با امتیاز بیشتر از ۰/۴ در VaxiJen و بالاتر از صفر برای Class I Immunogenicity برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. در نهایت تعداد ۱۴ اپی‌توپ آنتی‌ژنیک، ایمونوژن، غیر سمی، غیر حساسیت‌زا و با حفاظت شدگی ۱۰۰ درصد به عنوان اپی‌توپ‌های سلول‌های T کشنده انتخاب شدند (جدول ۲).

جدول ۲- اپی‌توپ‌های انتخاب شده سلول‌های T کشنده

توالی	آنتی‌ژنیسیته	سمیت	حساسیت‌زایی	حفاظت‌شدگی	ایمنی‌زایی	GRAVY	نیمه‌عمر
ETGNAVYGK	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۹۸۱۹	-۰/۸۵۶	بیش از ۱۰ ساعت
NQISIVTYR	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۷۵۷۹	-۰/۱۲۲	بیش از ۱۰ ساعت
KPGDETTSTY	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۸۸۲۲	-۱/۷۱	۳ دقیقه
NQISIVTYR	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۷۵۷	-۰/۱۲۲	بیش از ۱۰ ساعت
KPGDETTSTY	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۸۸۲۲	-۱/۷۱	۳ دقیقه
KPGDETTSTY	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۸۸۲۲	-۱/۷۱	۳ دقیقه
NQISIVTYR	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۷۵۷۹	-۰/۱۲۲	بیش از ۱۰ ساعت
ISIVTYRHK	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۸۱۶۴	-۰/۱۳۳	بیش از ۱۰ ساعت
KPGDETTSTY	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۸۸۲۲	-۱/۷۱	۳ دقیقه
DSMEALEYL	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۵۳۷۵	-۰/۱۴۴	بیش از ۱۰ ساعت
GNQISIVTYR	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۳۴۲۸	-۰/۱۵	۳۰ دقیقه
KPGDETTSTY	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۸۸۲۲	-۱/۷۱	۳ دقیقه
QVTTVDVHGK	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۹۹۴۲	-۰/۳۳	بیش از ۱۰ ساعت
NSGGGTIEV	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۲۸۵۴۶	-۰/۱۱۱	بیش از ۱۰ ساعت

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های T کمک کننده

اپی‌توپ‌های متصل شونده به آلل‌های کلاس دو MHC با استفاده از از ابزار MHC-II از سرور IEDB و سرور NetMHCIIPan نسخه ۴/۰ پیش‌بینی شدند. اپی‌توپ‌های با امتیاز بیشتر از ۰/۴ در VaxiJen نسخه ۲/۰ به عنوان اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن انتخاب شده و برای توان القاء اینترفرون گاما بررسی شدند. اپی‌توپ‌های با امتیاز مثبت در IFN-γ برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. در نهایت تعداد ۱۳ اپی‌توپ آنتی‌ژن، غیر سمی، غیر حساسیت‌زا و با حفاظت‌شدگی ۱۰۰ درصد به عنوان اپی‌توپ‌های سلول‌های T کمک‌کننده انتخاب شدند (جدول ۳).

جدول ۳- اپی‌توپ‌های انتخاب شده سلول‌های T کمک کننده

توالی	آنتی‌ژنیسیته	سمیت	حساسیت‌زایی	حفاظت‌شدگی	ایمنی‌زایی	GRAVY	نیمه‌عمر
AFPGISSTVANDVRK	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۲۷۶۱۵	-۰/۰۲۷	بیش از ۱۰ ساعت
HAFPGISSTVANDVR	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۶۸۹۳	-۰/۰۲۰	بیش از ۱۰ ساعت
RKYSVVSVYNKKYNI	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۴۲۲۸۱	-۰/۷۷۳	۲ دقیقه
SVYNKKYNIVKNKYM	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحسایت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۹۵۳۸	-۱/۰۶۷	بیش از ۱۰ ساعت
VSVYNKKYNIVKNKY	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحسایت‌زا	٪۱۰۰	۰/۲۵۱۹۳	-۰/۹۱۳	بیش از ۱۰ ساعت
VVSVYNKKYNIVKNK	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۹۹۶۹	-۰/۵۴۷	بیش از ۱۰ ساعت
SVYNKKYNIVKNKYM	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۹۵۳۵	-۱/۰۶۷	بیش از ۱۰ ساعت
KYSVVSVYNKKYNIV	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۱۱۶۸	-۰/۱۹۳	۳ دقیقه
KYSVVSVYNKKYNIV	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۱۱۶۸	-۰/۱۹۳	۳ دقیقه
SVVSVYNKKYNIVKN	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۰۷۶۹۳	-۰/۳۴	بیش از ۱۰ ساعت
RKYSVVSVYNKKYNI	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۴۲۲۸	-۰/۷۷۳	۲ دقیقه
GNQISIVTYRHKNYY	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۹۷۹۴	-۰/۹۸	بیش از ۱۰ ساعت
AFPGISSTVANDVRK	آنتی‌ژن	غیرسمی	غیرحساسیت‌زا	٪۱۰۰	۰/۱۲۷۶۱	-۰/۰۲۷	بیش از ۱۰ ساعت

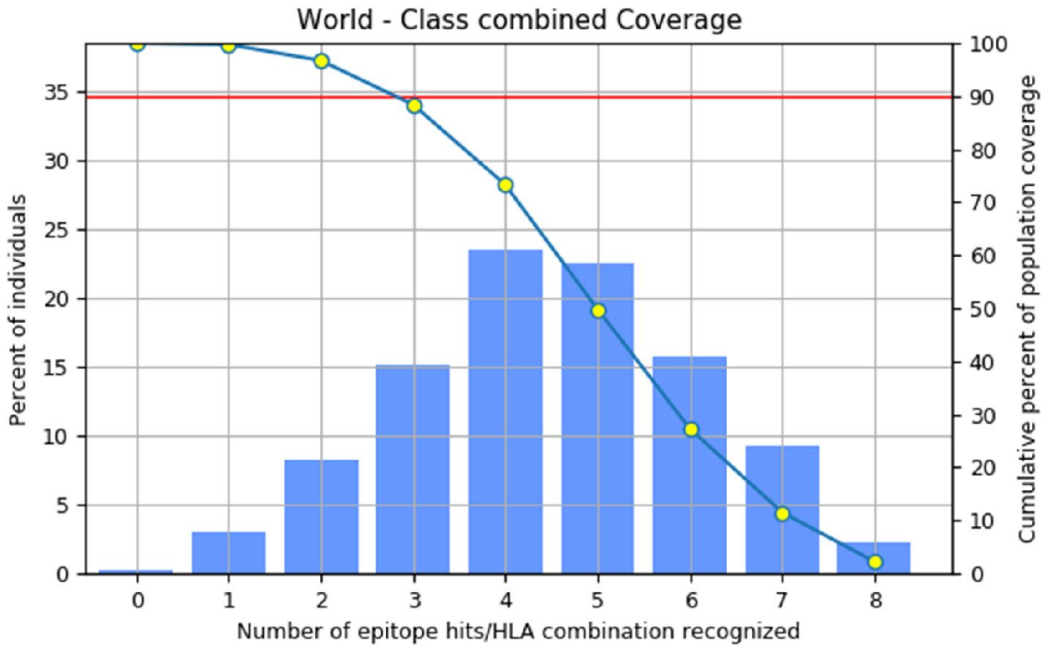
پیش‌بینی پوشش جمعیتی کاندید واکسن طراحی شده

ارزیابی پوشش جمعیت جهانی اپی‌توپ‌های انتخابی CTL و HTLو ارزیابی هم‌زمان آلل‌های HLA متناظر آن‌ها در میان قومیت‌ها و مناطق جغرافیایی مختلف، پوشش ۹۹/۷۴٪ درصدی را برای مجموع دو کلاس و با میانگین ۴/۴۹ نشان داد (شکل ۱). این یافته‌ها نشان می‌دهد که کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده در این تحقیق پتانسیل تشخیص و کاربرد گسترده را داشته و تعداد قابل توجهی از افراد را در سراسر جهان شامل می‌شود.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

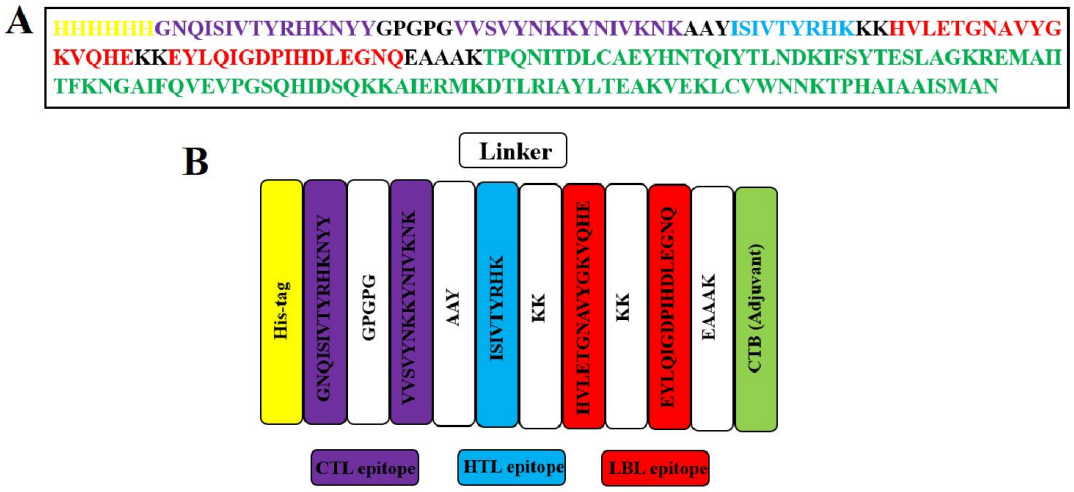
CCBY-NC.4.0 DEED



شکل ۱- پوشش جمعیت جهانی برای مجموع آلل‌های MHC-I و MHC-II. ستون‌ها نشان دهنده پوشش جمعیت برای هر اپی‌توپ بوده و درصد تجمعی پوشش جمعیت با نمودار خطی (-o-) نشان داده شده است.

طراحی سازه واکسن چند اپی‌توپی

اپی‌توپ‌های انتخاب شده از اپی‌توپ‌های خطی سلول B، CTL و HTL از پروتئین B4R ویروس آبله میمون به ترتیب با استفاده از لینکرهای KK، AAY و GPGPG برای ساخت یک واکسن کاندید چند اپی‌توپی به هم متصل شدند. هم‌چنین، از لینکر EAAKK برای اتصال ادجوانت به انتهای کربوکسیلی استفاده شد. برچسب هیستیدینی به منظور تسهیل تشخیص و خالص‌سازی پروتئین در انتهای آمینی توالی واکسن تعبیه شد. توالی آمینواسیدی و استراتژی ساخت واکسن کاندید چند اپی‌توپی بر علیه آبله میمون در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- A) توالی آمینواسیدی و B) آرایش کلاس‌های اپی‌توپی در کاندید واکسن بر علیه ویروس آبله میمون با استفاده از پروتئین B4R

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

آنتی‌ژنیسیته، حساسیت‌زایی و سمیت کاندید واکسن چند اپی‌توپی

ابزارهای مختلفی برای ارزیابی آنتی‌ژنیسیته و حساسیت‌زایی واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده به کار گرفته شد. با توجه به نتایج VaxiJen و ANTIGENpro، امتیاز آنتی‌ژنیسیته واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده به ترتیب ۰/۵۹۸۶ و ۰/۶۹۸۱ بود. علاوه بر این، Allergen FP و AllerTop نشان دادند که کاندید واکسن غیر حساسیت‌زا بود. هم‌چنین، نتایج ToxinPred2 عدم سمیت کاندید واکسن را نشان داد (جدول ۴). این یافته‌ها نشان می‌دهند که واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده در این تحقیق می‌تواند گزینه امیدوارکننده‌ای برای واکسیناسیون علیه عفونت‌های ویروس آبله میمون باشد.

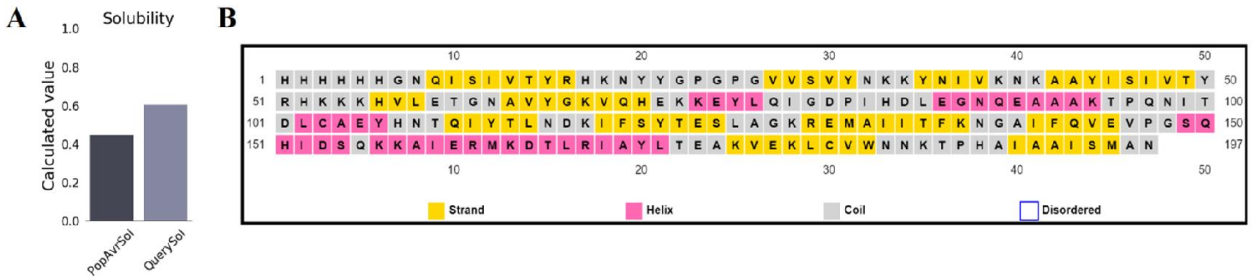
خواص فیزیکوشیمیایی و پیش‌بینی ساختار ثانویه کاندید واکسن چند اپی‌توپی

کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده شامل ۱۹۷ اسید آمینه با وزن مولکولی ۲۲/۴۲ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۹/۳۰ بود. امتیاز GRAVY برای کاندید واکسن طراحی شده ۰/۶۰۸-، شاخص ناپایداری ۲۸/۶۷ و شاخص آلیفاتیک ۸۱/۲۲ بود. نیمه عمر کاندید واکسن ۳/۵ ساعت در رتیکولوسیت‌های انسانی (در شرایط آزمایشگاهی)، ۱۰ دقیقه در مخمر، و بیش از ۱۰ ساعت در *E.coli* (در شرایط آزمایشگاهی) پیش‌بینی شد (جدول ۴). حلالیت کاندید واکسن چند اپی‌توپی ۰/۶۰۶ بود که نشان می‌دهد واکسن می‌تواند به صورت محلول بیان شود (شکل ۳، A) ساختار ثانویه پیش‌بینی شده با استفاده از سرورهای Prabi و PSIPRED نشان داد که کاندید واکسن طراحی شده شامل ۳۳/۵۰٪ مارپیچ آلفا، ۲۵/۸۹٪ رشته‌های توسعه یافته، و ۴۰/۶۱٪ کویل‌های تصادفی است (شکل ۳، B).

جدول ٤- ویژگی‌های پیش‌بینی شده برای واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده

آنتی‌ژنیسیته	حساسیت‌زایی	سمیت	حلالیت	GRAVY	تعداد اسیدهای آمینه	وزن مولکولی (Da)	نقطه ایزوالکتریک	شاخص آلیفاتیک	نیمه عمر
۰/۵۹۸۶[a] ۰/۶۹۸۱[b]	غیر حساسیت‌زا	غیر-سمی	۰/۶۰۶	۰/۶۰۸-	۱۹۷	۲۲۴۲۲/۵۴	۹/۳	۸۱/۲۲	۳/۵ ساعت[c] ۱۰ دقیقه [d] ۱۰< ساعت[e]

[a]آنتی ژنیسیته پیش‌بینی شده با VaxiJen
[b]آنتی ژنیسیته پیش‌بینی شده با ANTIGENpro
[c]رتیکولوسیت پستانداران (در شرایط آزمایشگاهی)
[d]مخمر (در شرایط آزمایشگاهی)
[e]اشرشیا کولی (در شرایط آزمایشگاهی)



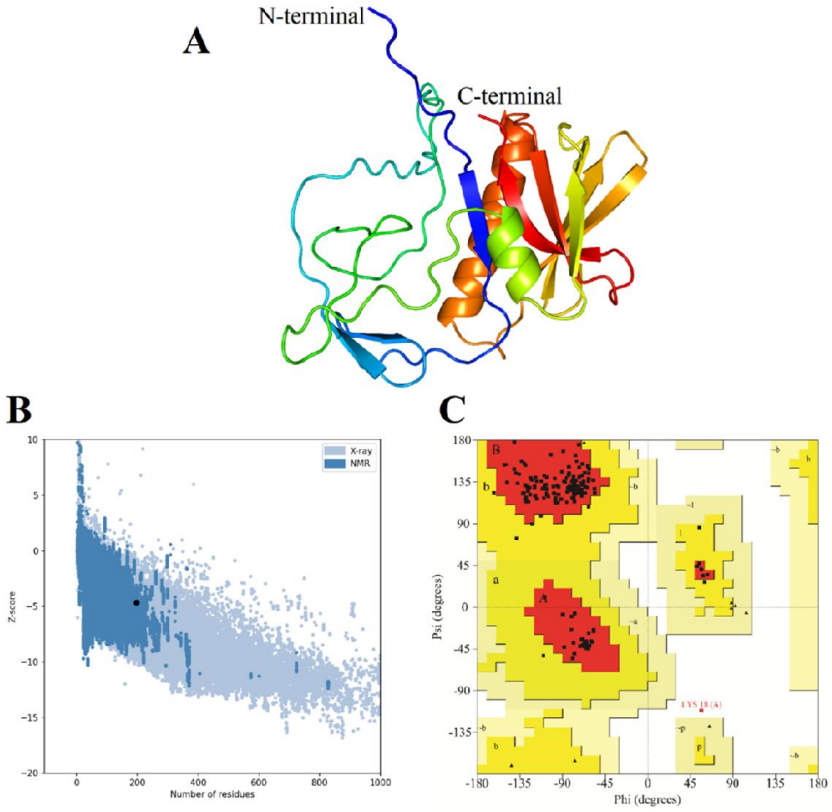
شکل ۳- A) حلالیت پیش‌بینی شده توسط سرور Protein-Sol برای کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده، B) ساختار ثانویه پیش‌بینی شده از کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده.

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

پیش‌بینی، بهینه‌سازی و اعتبارسنجی ساختار سه بعدی کاندید واکسن چند اپی‌توپی

ساختار سه بعدی کاندید واکسن چند اپی‌توپی با استفاده از سرور AlphaFold2 پیش‌بینی شد. از بین پنج مدل تولید شده در این سرور، مدل برتر برای بهینه‌سازی بیشتر انتخاب شد. از سرور GalaxyRefineبرای بهبود نتایج پیش‌بینی، اصلاح لوپ‌ها و به حداقل رساندن انرژی مدل استفاده شد. پارامترهای کلیدی از جمله امتیاز RMSD، GDT-HA و MolProbity در پنج مدل حاصل ارزیابی شد. مقادیر بیشتر GDT-HA نشان دهنده ساختارهای دقیق‌تر و مقادیر کمتر MolProbity مربوط به مدل‌های با کیفیت بهتر است. بنابراین، مدلی با بالاترین مقدار GDT-HAو کمترین امتیاز MolProbity و RMSD در بین پنج مدل بهینه شده برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شد (شکل ۴، A).

از سرورهای PROCHECK، ERRAT و ProSA برای ارزیابی و تأیید کیفیت و خطاهای احتمالی مدل سه بعدی بهینه شده استفاده شد. امتیاز Z برای کاندید واکسن چند اپی‌توپی ۴/۶۴- (شکل ۴، B) و ضریب کیفیت کلی ERRAT ۹۷/۱۶ پیش‌بینی شد. پلات راماچاندران نشان داد که ۹۵/۵٪ از باقی‌مانده‌ها در مناطق مطلوب، ۳/۹٪ در مناطق مجاز و ۰/۶٪ در مناطق غیرمجاز قرار دارند (شکل ۴، C). نتایج تأیید کننده کیفیت کلی ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده با استفاده از پروتئین B4R بر علیه ویروس آبله میمون بود.

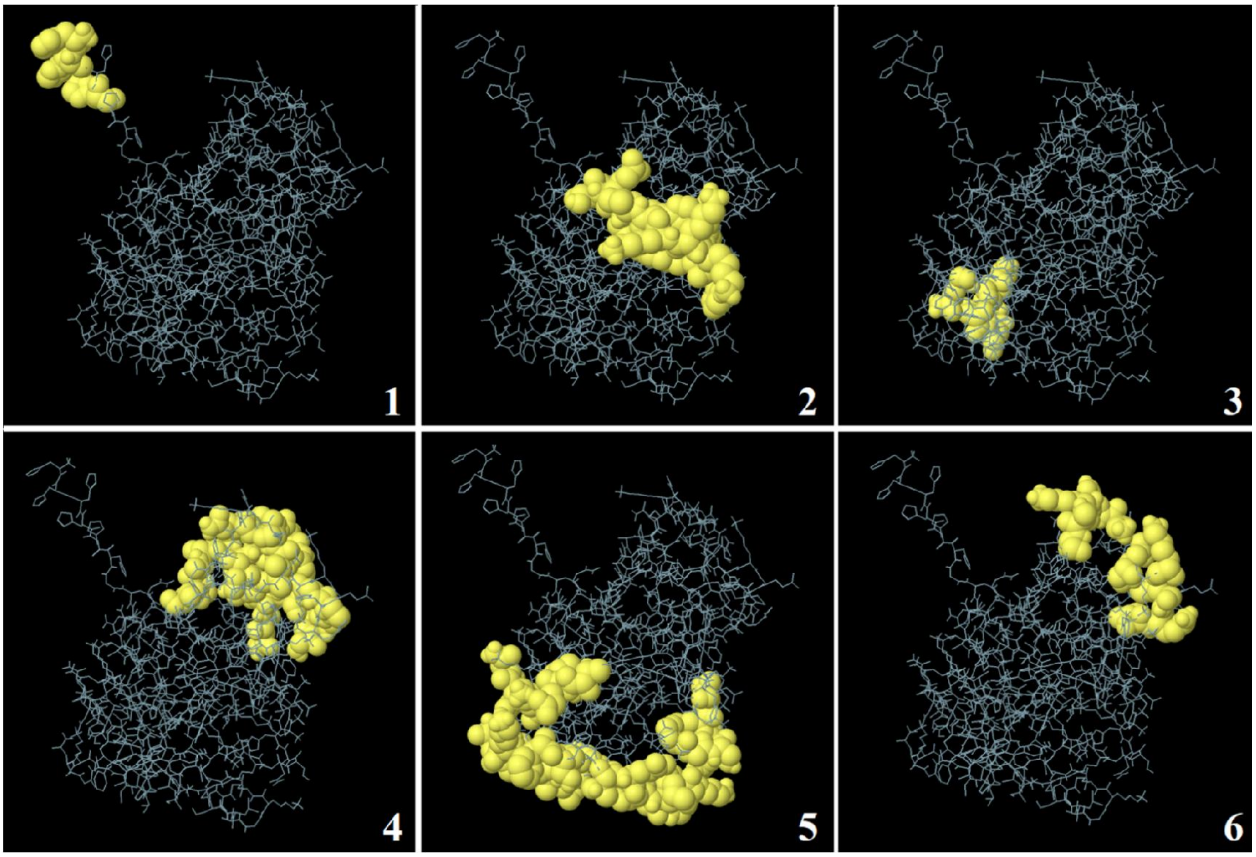


شکل ٤- پیش‌بینی و اعتبار سنجی ساختار سوم کاندید واکسن چند اپی‌توپی A) ساختار مدل سه بعدی کاندید واکسن که با استفاده از AlphaFold2 پیش‌بینی و با استفاده از GalaxyRefine بهینه‌سازی شده است. B) نمودار امتیاز Z پیش‌بینی شده توسط سرور ProSA. C) پلات راماچاندران کاندید واکسن چند اپی‌توپی، نواحی مختلف در پلات به صورت زیر مشخص شده‌اند: [A، B، L]: باقی‌مانده‌ها در نواحی مطلوب، [a، b، l، p]: باقی‌مانده‌ها در نواحی مجاز، [~a، ~b، ~l، ~p]: باقی‌مانده‌ها در نواحی کمتر مجاز. نواحی سفیدرنگ شامل نواحی غیر مجاز می‌باشند. باقی‌مانده گلایسین به شکل مثلث نشان داده شده است.

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

اپی‌توپ‌های ساختاری سلول B مستقر در کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده

با توجه به نتایج سرور ElliPro، ۶۴ باقی‌مانده از کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده با امتیاز ۰/۹۸ تا ۰/۶۴۴ در ۶ اپی‌توپ ساختاری سلول B توزیع شده‌اند (شکل ۵). اندازه اپی‌توپ‌ها از ۳ تا ۳۱ باقی‌مانده اسید آمینه متفاوت بود. جزئیات اپی‌توپ‌های ساختاری برای کاندید واکسن چند اپی‌توپی، همراه با امتیازات مربوط به آنها، در جدول ۵ ارائه شده است.



شکل ۵- نمایش گرافیکی اپی‌توپ‌های ناپیوسته سلول B در مدل سه بعدی واکسن چند اپی‌توپی. ساختار واکسن و اپی‌توپ‌های ناپیوسته سلول B به ترتیب به رنگ خاکستری و زرد نشان داده شده‌اند.

جدول۵- اپی‌توپ‌های ساختاری سلول‌های B پیش‌بینی شده توسط سرور ElliPro

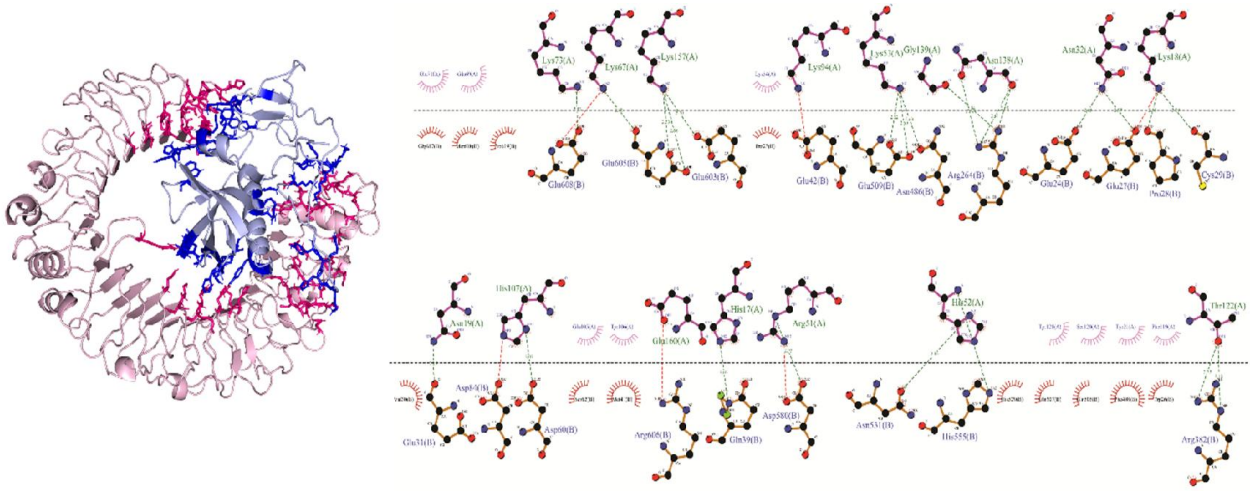
#	اپی‌توپ ساختاری سلول B	تعداد باقی‌مانده‌ها	امتیاز
۱	A:H1, A:H2, A:H4	۳	۰/۹۸
۲	A:V48, A:T49, A:Y50, A:R51, A:H52, A:K53, A:K54, A:K55, A:H56, A:V57, A:L58, A:E59, A:T60, A:G61	۱۴	۰/۷۶۴
۳	A:H107, A:N108, A:Q110, A:N183, A:N184	۵	۰/۷۳۷
۴	A:G22, A:P23, A:G24, A:P25, A:G26, A:V27, A:N32, A:K33, A:K34, A:Y35, A:N36, A:I37, A:V38, A:I82, A:H83, A:D84, A:L85, A:E86, A:G87, A:N88, A:Q89, A:E90, A:A91, A:A92, A:A93, A:T95	۲۶	۰/۷۲

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

۵	A:N115, A:D116, A:K117, A:F119, A:S120, A:T122, A:E123, A:S124, A:L125, A:A126, A:G127, A:K128, A:R129, A:T135, A:K137, A:N138, A:G139, A:A140, A:I141, A:P147, A:G148, A:S149, A:Q150, A:H151, A:I152, A:T172, A:E173, A:A174, A:K185, A:T186, A:P187	۳۱	۰/۶۸۳
۶	A:K39, A:N40, A:K41, A:A42, A:A43, A:V68, A:Q69, A:H70, A:K72, A:E74	۱۰	۰/۶۴۴

داکینگ مولکولی بین کاندید واکسن چند اپی‌توپی و TLR-4

برهم‌کنش‌های آنتی‌ژن-گیرنده ایمنی برای انتقال مولکول‌های آنتی‌ژن و فعال شدن سیستم ایمنی حیاتی است. داکینگ مولکولی با استفاده از سرور ClusPro نسخه ۲/۰ برای ارزیابی انرژی اتصال و برهم‌کنش‌های مولکولی بین گیرنده ایمنی TLR-4 و کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده انجام شد. از بین ۳۰ حالت پیش‌بینی‌شده، بهترین مجموعه گیرنده-واکسن که نشان‌دهنده اتصال کارآمد سازه واکسن در دمین اتصال گیرنده بود انتخاب شد. برهم‌کنش‌های مولکولی قوی، از جمله پیوندهای هیدروژنی، پل‌های نمکی، و برهم‌کنش‌های غیر پیوندی برای این مجموعه مشاهده شد. بین کاندید واکسن و TLR-4، ۱۵ پیوند هیدروژنی، ۷ پل نمکی و ۲۰۶ برهم‌کنش غیرپیوندی مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ٦- داکینگ مولکولی بین کاندید واکسن چند اپی‌توپی و گیرنده TLR-4 با استفاده از ClusPro 2.0 و نمایش برهم‌کنش‌ها در مجموعه با استفاده از LigPlot. کاندید واکسن چند اپی‌توپی با رنگ آبی روشن و TLR-4 با رنگ صورتی روشن نشان داده شده‌اند.

برای تأیید میل اتصال کاندید واکسن چند اپی‌توپی به TLR-4، مقادیر انرژی آزاد گیبس (ΔG) و ثابت تفکیک (KD) از سرور PRODIGY به دست آمد. نتایج نشان داد که کاندید واکسن با میل اتصال بالایی به TLR-4 ($\Delta G= -۱۹/۸\ kcal.mol^{-1}$) و $۱۰^{-۱۵}$ ×۳/۹= KD) متصل می‌شود. میل ترکیبی بالای کاندید واکسن به TLR-4 را می‌توان به تعداد بالای پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی آن نسبت داد. آنالیز داکینگ مولکولی اتصال موفقیت‌آمیز و میل ترکیبی قابل توجهی را بین ساختار واکسن پیشنهادی و گیرنده ایمنی نشان داد.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

برای بررسی پایداری مجموعه کاندید واکسن-TLR4 شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شد. سه شبیه‌سازی مستقل

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

برای این مجموعه و هر کدام به مدت ۵۰ نانوثانیه، با استفاده از GROMACS نسخه ۲۰۱۹,۲ انجام شد. انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD) یکی از پارامترهای مهم در مطالعات دینامیک مولکولی به منظور اطمینان از به تعادل رسیدن سیستم در طول شبیه‌سازی است و میزان انحراف موقعیت ذرات نسبت به موقعیت اولیه را در هر نقطه از زمان نشان می‌دهد. مقادیر پائین RMSD نشان دهنده پایداری سیستم در طول شبیه‌سازی است.

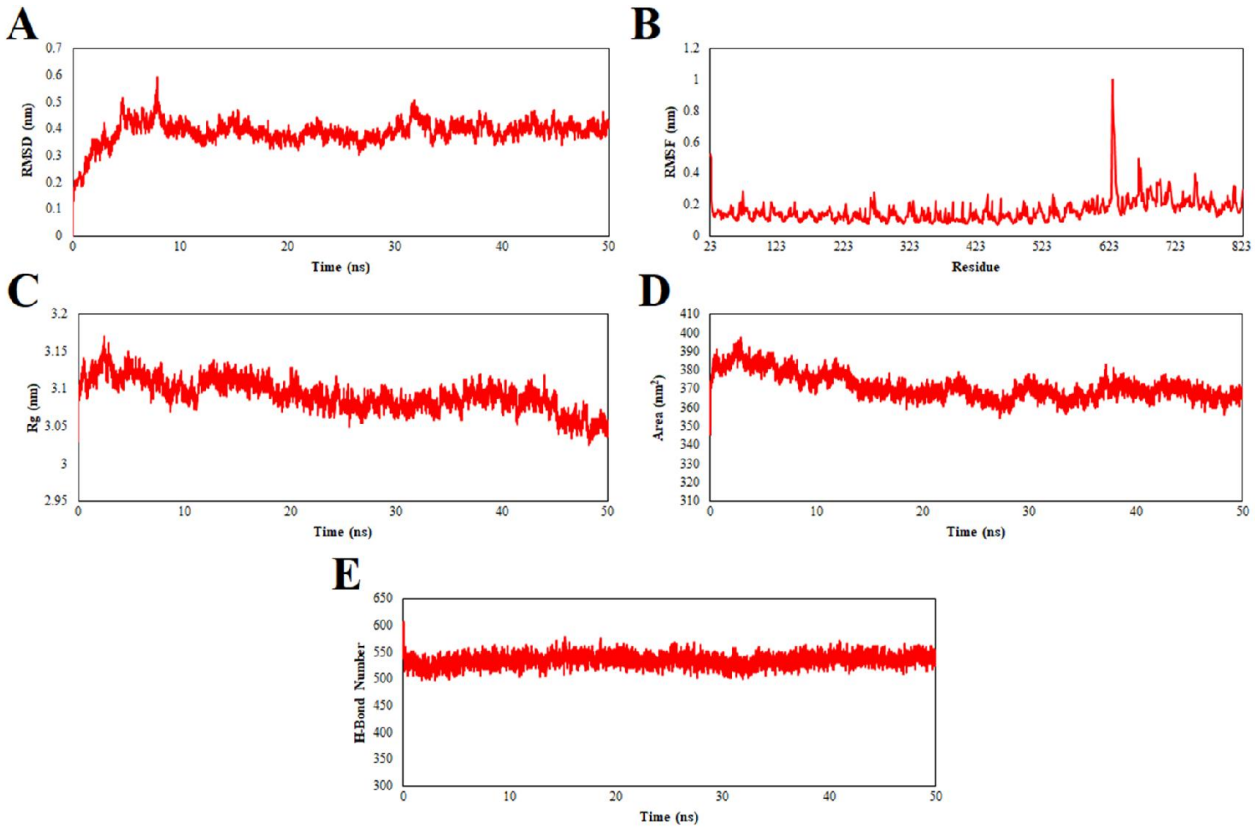
شکل ۷، A نمودار RMSD را برای مجموعه کاندید واکسن-TLR4 نشان می‌دهد. نمودار RMSD برای این مجموعه بعد از حدود ۵ نانوثانیه به تعادل رسیده و این تعادل در ادامه شبیه‌سازی حفظ شده است. این نمودار نشان داد که مجموعه کاندید واکسن-TLR4 با میانگین مقادیر RMSD ۰/۳۸ نانومتر مجموعه پایداری تشکیل می‌دهد. جذر میانگین مربعات نوسانات (RMSF)، میزان تحرک و انعطاف‌پذیری باقی‌مانده‌های آمینواسیدها در طول زمان شبیه‌سازی را نشان می‌دهد، به طوریکه مقادیر بالای RMSF نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری بالای باقی‌مانده‌های اسیدهای آمینه است. نمودار RMSF در ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در شکل ۷، B نشان داده شده است. نمودار نشان می‌دهد که مجموعه کاندید واکسن-TLR4 با میانیگن RMSF ۱/۵۷ آنگستروم نوسانات کمی داشته و مجموعه پایداری تشکیل می‌دهد. شعاع چرخش (Rg) منعکس کننده فشردگی ساختار پروتئین است.

برای تشخیص فشردگی ساختار کلی، نمودار شعاع چرخش پروتئین محاسبه و در شکل ۷، C نشان داده شده است. میانگین Rg برای مجموعه کاندید واکسن-TLR4 ۳/۰۹ نانومتر برآورد شد. مشابه با نتایج RMSD، نمودار Rg این مجموعه در طول شبیه‌سازی پایدار باقی ماند، که نشان‌دهنده فشردگی خوب ساختار سوم این مجموعه است. علاوه بر این، مساحت سطح قابل دسترس حلال (SASA)، به عنوان یک پارامتر ضروری برای توصیف آب‌گریزی پروتئین، برای این مجموعه ارزیابی شد. میانگین SASA برای مجموعه واکسن-TLR4 ۳۷۱/۳۱ نانومتر مربع برآورد شد. نمودار SASA روند اندکی کاهشی داشت که نشان می‌دهد در طول شبیه‌سازی هسته آب‌گریز کمتر در معرض حلال قرار گرفته که منجر به افزایش پایداری پروتئین می‌شود (شکل ۷، D). میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی در هر فریم در طول زمان برای تعیین تعداد پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده یا شکسته شده در طول شبیه‌سازی مولکولی آنالیز شد. الگوی تعداد پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده در این سیستم نشان داد که تعداد پیوندهای تشکیل یا شکسته شده در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ثابت باقی مانده است که نشان‌دهنده پایداری ساختارهای مولکولی است (شکل ۷، E). با بررسی انرژی اتصال مجموعه داکینگ بعد از شبیه‌سازی مولکولی توسط سرور PRODIGY مشخص شد که حتی پس از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نیز کاندید واکسن طراحی شده با TLR-4 با میل اتصال بالا (۱۹/۴- $kcal\ mol^{-1}$) برهم‌کنش می‌کند.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

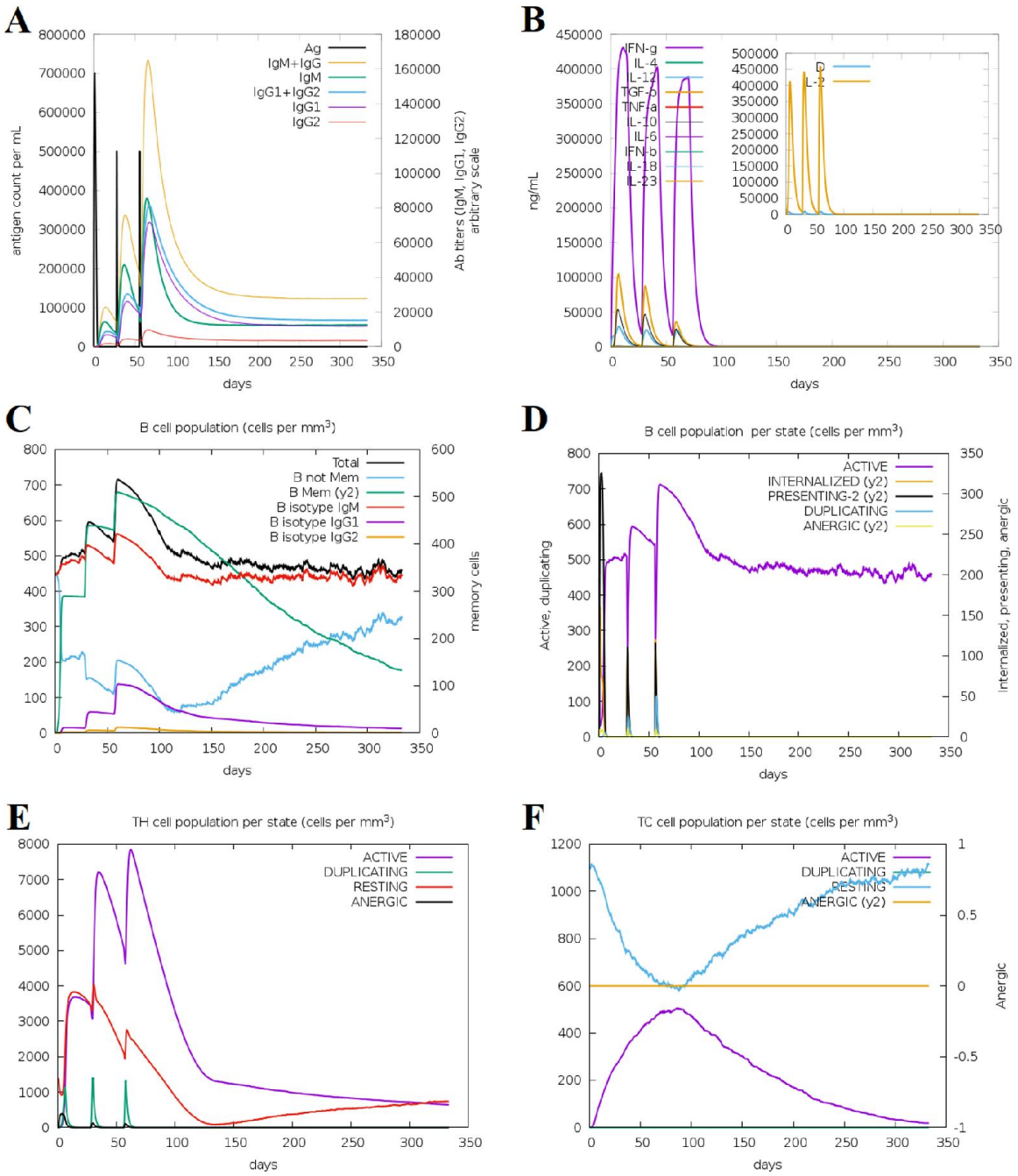


شکل ۷- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مجموعه واکسن-TLR4 در مدت زمان ۵۰ نانوثانیه. A) نمودار RMSD، B) نمودار RMSF، C) نمودار Rg، D) نمودار SASA و E) نمودار پیوندهای هیدروژنی.

شبیه‌سازی پاسخ‌های ایمنی القا شده توسط کاندید واکسن چند اپی‌توپی

شبیه‌سازی ایمنی توسط سرور C-ImmSim انجام شد. پس از سه تزریق کاندید واکسن طراحی شده، افزایش فعالیت ایمونوگلوبولین‌ها، از جمله آنتی‌بادی‌های IgM، IgM+IgG، IgG1+IgG2، و IgG1 و هم‌چنین کاهش سطح آنتی‌ژن مشاهده شد. نکته قابل توجه این‌که دوز اولیه منجر به افزایش سطح آنتی‌بادی نشد، در حالی‌که دو دوز بعدی منجر به افزایش سطح آنتی‌بادی شدند (شکل ۸، A). علاوه بر این، پس از هر تزریق، سطح سیتوکین‌ها از جمله اینترفرون گاما (IFN-γ)، اینترلوکین-۲ (IL-2)، اینترلوکین-۱۰ (IL-10) و فاکتور رشد تغییردهنده بتا (TGF-β) افزایش یافت. پس از دو تزریق اول، سطوح IFN-γ، TGF-β و IL-10 افزایش یافت اما پس از تزریق سوم کاهش یافت (شکل ۸، B). پس از هر تزریق، تعداد کل سلول‌های B و هم‌چنین ایزوتیپ‌های IgM و IgG1 سلول B افزایش یافت. علاوه بر این، تعداد سلول‌های حافظه B و جمعیت سلول‌های B فعال با هر تزریق افزایش یافت که نشان دهنده امکان تشکیل حافظه قابل‌توجه است (شکل ۸، C-D). روند مشابهی برای سلول‌های T کمک کننده و کشنده مشاهده شد. پس از هر تزریق، جمعیت HTL و CTL فعال و همچنین HTL در حال استراحت و تکثیر افزایش یافت و پس از تزریق سوم کمی کاهش یافت. با این حال، جمعیت CTL در حال استراحت پس از اولین تزریق کاهش یافت و پس از تزریق سوم افزایش یافت (شکل ۸، E-F). به طور کلی، شبیه‌سازی ایمنی نشان داد که تزریق‌های کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده باعث ایجاد پاسخ ایمنی قوی می‌شود.

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]



شکل ۸- شبیه‌سازی پاسخ ایمنی در برابر کاندید واکسن طراحی شده با استفاده از سرور C-ImmSim. A) تولید ایمونوگلوبولین در پاسخ به ایمن‌سازی با کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده. زیر کلاس‌ها با رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند B) سطوح سیتوکین‌ها: نمودار اصلی سطوح سیتوکین را پس از تزریق کاندید واکسن چند اپی‌توپی نشان می‌دهد. نمودار داخلی سطوح فاکتور رشد گلبول سفید IL-2 و سیگنال فعال‌سازی کلی ماکروفاژ D را نشان می‌دهد. C) تکامل جمعیت سلول‌های B پس از سه دوره واکسیناسیون با کاندید واکسن چند اپی‌توپی. D) تولید سلول‌های B پس از تزریق. سلول‌های B فعال (بنفش) بالاترین سطح ترشح را در مقایسه با سایر زیرگروه‌های سلول B نشان دادند. E) تولید سلول‌های T کمک کننده CD4 در پاسخ به قرار گرفتن در معرض آنتی‌ژن، از جمله سلول‌های T کمک کننده فعال، تکثیر شونده، در حال استراحت و آنرژیک. F) تولید سلول‌های T کشنده. "وضعیت آنرژیک" نشان دهنده تحمل سلول‌های T به آنتی‌ژن‌ها به دلیل قرار گرفتن در معرض مکرر است.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

بحث

اخیراً شیوع ویروس آبله میمون در بسیاری از کشورها بدون هیچ‌گونه ارتباط اپیدمیولوژیک شناسایی شده‌ای، رخ داده است. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، تقریباً ۳ تا ۵ درصد موارد آبله میمون منجر به مرگ و میر می‌شود (۵۵). با این وجود، در حال حاضر هیچ درمان قابل اعتمادی برای آبله میمون وجود ندارد. اخیراً FDA واکسن JYNNEOS را برای پیش‌گیری از آبله میمون تأیید کرده است که نرخ اثربخشی ۸۵ درصدی را ارائه می‌دهد و به دلیل رابطه ژنتیکی نزدیک بین ویروس آبله میمون و آبله، درجه قابل توجهی از محافظت در برابر آبله میمون را نیز فراهم می‌کند (۵۶). با این حال، پاسخ‌های آنتاگونیستی مربوط به JYNNEOS شامل واکنش‌های محل انفوزیون از جمله خارش، تورم، درد، سفتی و قرمزی می‌باشد. هم‌چنین برخی از عوارض جانبی سیستمیک شامل سردرد، حالت تهوع، درد عضلانی، خستگی، لرز و میالژی نیز در ارتباط با این واکسن مطرح شده است. پاسخ‌های آنتاگونیستی واقعی در ۰/۰۵ درصد از افراد دریافت کننده JYNNEOS مشاهده شده است که شامل سارکوئیدوز، سفتی گلو، بیماری کرون و فلج عضلانی خارج چشمی می‌باشد (۵۷).

ST-246 نیز یک ترکیب ضد ویروس آبله بسیار قوی است و تکثیر ویروس‌های آبله را در غلظت‌های نانومولار مهار می‌کند. از عوارض تزریق ST 246، ایجاد ضایعات و کاهش وزن می‌باشد (۵۸). با این حال، تولید واکسنی که به طور خاص MPXV را هدف قرار دهد ضروری است. در این راستا، مناطق اپی‌توپی کوچکی که پتانسیل بالایی برای محافظت در برابر مقدار بیش از حد بار آنتی‌ژن و واکنش‌های آلرژیک دارند، می‌توانند به عنوان کاندید واکسن به جای ویروس‌ها یا پروتئین‌های کامل استفاده شوند. این توالی‌های اپی‌توپی همچنین توانایی قابل‌توجهی در تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی دارند. واکسن‌شناسی معکوس یک رویکرد امیدوارکننده برای توسعه سریع واکسن‌های مبتنی بر پپتید است. این رویکرد شامل استفاده از اپی‌توپ‌های ایمنی پیش‌بینی شده برای تسریع توسعه و دست‌یابی به واکسن مقرون به صرفه، افزایش دقت و اطمینان از ایمنی واکسن است. این روش در سال‌های اخیر به دلیل پتانسیل بالا برای غلبه بر محدودیت‌های فرآیندهای سنتی تولید واکسن مورد توجه قرار گرفته است و به طور گسترده برای طراحی واکسن‌های جدید علیه پاتوژن‌های مختلف مانند *Mycobacterium Tuberculosis* (۵۹)، *Listeria* monocytogenes (۶۰)، سالمونلا (۶۱)، ویروس آنفولانزای A (۶۲)، SARS-CoV-2 (۶۳, ۶۴) و ویروس پاپیلومای انسانی (۲۶) استفاده شده است.

در مطالعه حاضر، یک واکسن جدید مبتنی بر پپتید با استفاده از تکنیک ایمونو انفورماتیک طراحی شده است. به جای استفاده از ژنوم کامل یا یک پروتئین کامل برای ایجاد واکسن که به طور بالقوه می‌تواند واکنش‌های آلرژیک در میزبان ایجاد کند، کاندید واکسن طراحی شده در این مطالعه برای ایجاد ایمنی با استفاده از چندین قطعه پپتید آنتی‌ژن ایجاد شده است. اپی‌توپ‌های متعدد آنتی‌ژن برای فعال کردن سلول‌های T (CD4+ و CD8+) همراه با اپی‌توپ‌های سلول B برای تحریک تولید سلول‌های پلاسما به علاوه یک ادجوانت می‌تواند ایمنی طولانی مدت واکسن را بیش از واکسن‌های معمولی تضمین کند (۶۵-۶۷).

پروتئین پوکسین-شلافن از نقطه نظر آنتی‌ژنیسیته یکی از بهترین کاندیدهای پروتئین ایمونوژن در بین پروتئین‌های ویروس آبله میمون برای طراحی واکسن شناخته شده است (۶۸). این پروتئین عملکرد لازم در اتصال به غشاء، شناسایی توسط دستگاه ایمنی میزبان و اتصال به گیرنده را دارد. پوکسین یک آنزیم نوکلئاز حفاظت شده در ویروس‌های آبله پستانداران است که در برخی

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

موارد از انتهای کربوکسیلی به یک پروتئین شلافن که همولوژی بالایی با شلافن انسانی دارد متصل می‌شود (۲۱). در این تحقیق از پروتئین پوکسین-شلافن برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن استفاده گردید. اثربخشی، پایداری و حساسیت‌زایی نگرانی‌های عمده در رابطه با واکسن طراحی شده هستند (۶۹). بر این اساس، بررسی جامعی از سمیت، حساسیت‌زایی، آنتی‌ژنیسیته و خواص فیزیکوشیمیایی اپی‌توپ‌های موجود در پروتئین فوق الذکر انجام گرفت. در این فرآیند اپی‌توپ‌هایی انتخاب شدند که نه تنها امتیاز آنتی‌ژنیسیته آن‌ها بالاتر از آستانه تعیین‌شده (۰/۴) بود، بلکه ماهیت غیر حساسیت‌زا و غیر سمی نیز داشتند.

این بررسی‌ها کارآیی و ایمنی سازه واکسن را با دقت تأیید نمود، زیرا اپی‌توپ‌های انتخاب شده به اندازه کافی آنتی‌ژنیک بودند و قادر به ایجاد مجموعه‌ای از واکنش‌های ایمنی بدون ایجاد حساسیت یا سمیت می‌باشند. آنتی‌ژن‌ها در چارچوب سیستم ایمنی تطبیقی به سلول‌های T CD4+ که به عنوان سلول‌های T کمک کننده نیز شناخته می‌شوند و سلول‌های T CD8+ که سلول‌های T کشنده هستند، به ترتیب از طریق پپتیدهای MHC-II و MHC-I ارائه می‌شوند (۷۰). در نتیجه، در این تحقیق ترکیبی از اپی‌توپ‌های منتخب از پروتئین B4R که اختصاصی گیرنده‌های سلولی MHC-I، MHC-II و B هستند، برای ایجاد دفاع ایمنی اختصاصی و انعطاف‌پذیر استفاده گردید. در این مطالعه، در یک فرآیند غربالگری و انتخاب ایمونوانفورماتیکی دقیق در مجموع ۵ اپی‌توپ کارآمد جهت برهمکنش ایمنولوژیک از طریق سلول‌های T کلاس I و II و سلول‌های B انتخاب شد. با توجه به همولوژی بالای پروتئین شلافن آبله میمونی با شلافن انسانی، پاسخ‌های ایمنی نامطلوب احتمالی پپتیدهای انتخاب شده به دلیل واکنش متقابل با آنتی‌ژن‌های میزبان بررسی شد. با این حال هیچ‌گونه واکنش متقابلی با آنتی‌ژن‌های میزبان مشاهده نشد. Hoque و همکاران (۶۸) از واکسینولوژی معکوس برای ساخت واکسن پپتیدی علیه ویروس آبله میمون با استفاده از پروتئین اتصالی سطح سلول، پوکسین-شلافن و پروتئین پوششی استفاده کردند. آن‌ها کارایی مدل واکسن خود را با انجام داکینگ مولکولی با گیرنده‌های ایمنی بررسی کرده و نتایج امیدوار کننده‌ای را بر اساس انرژی آزاد اتصال به دست آوردند.

واکسن‌های چند اپی‌توپی معمولاً به صورت ساختارهای دانه‌ای روی رشته (String-of-bead) تولید می‌شوند که در آن هر اپی‌توپ مستقیماً یا توسط لینکرها به قسمت بعدی متصل می‌شود. به این ترتیب، ساختارهای منحصربه‌فرد و بسیار متفاوتی را می‌توان با تغییر ترتیب اپی‌توپ‌ها و با استفاده از لینکرهای مختلف پیش‌بینی کرد. وجود لینکر بین اپی‌توپ‌ها می‌تواند از تولید اپی‌توپ‌های پیوندی (نئواپی‌توپ‌ها) جلوگیری کرده و ارائه آنتی‌ژن را تسریع کند (۷۱). بنابراین، در توسعه واکسن‌های پپتیدی چند اپی‌توپی برای حفظ فردیت هر اپی‌توپ معمولاً به استفاده از لینکرها توصیه می‌شود. در این راستا از لینکر KK برای اتصال اپی‌توپ‌های انتخاب شده برای سلول B و لینکرهای GPGPG و AYY به ترتیب برای اتصال اپی‌توپ‌های اختصاصی MHC-I و MHC-II استفاده شد. علاوه بر این، زیر واحد B سم وبا (CTB) به عنوان ادجوانت به انتهای کربوکسیلی توالی چند اپی‌توپی متصل شد. یکی از اشکالات اساسی واکسن‌های پپتیدی چند اپی‌توپی، ایمنی نسبتاً پایین آن‌ها است، محدودیتی که می‌توان با ترکیب ادجوانت‌ها بر آن غلبه کرد (۷۲). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تجویز همزمان ادجوانت به صورت متصل به ساختار واکسن به سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن، می‌تواند پاسخ‌های ایمنی قوی‌تری نسبت به ترکیب واکسن و ادجوانت به طور جداگانه ایجاد کند (۷۳). هم‌چنین، برای تسهیل خالص‌سازی واکسن نوترکیب

CCBY-NC.4.0 DEED
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]
[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

بیان‌شده یک برچسب هیستیدینی در انتهای آمینی آن متصل شد.

TLRها پاتوژن‌های مختلف را در میزبان از طریق شناسایی الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMPs) گروه‌های خاصی از میکروارگانیسم‌ها شناسایی می‌کنند. TLRها پروتئین‌های گیرنده حیاتی هستند که توسط اکثر سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی مانند گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و مونوسیت‌ها بیان می‌شوند. TLRها با درگیر شدن با اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های پوششی پاتوژن‌های عفونی، پاسخ ایمنی ایجاد می‌کنند (۷۴). MHCها بازیگران کلیدی در سیستم ایمنی هستند و قطعاتی از پاتوژن‌ها را روی سطوح سلولی ارائه می‌دهند. شناسایی این قطعات توسط سلول‌های T منجر به تحریک پاسخ‌های ایمنی تطبیقی می‌شود (۷۵). با توجه به گزارشات مربوط به اهمیت مولکولی TLR-4 در ایمنی‌زایی علیه ویروس آبله میمون (۷۶)، با استفاده از روش‌های داکینگ مولکولی، برهم‌کنش‌های مولکولی و الگوهای پیوندی کاندید واکسن طراحی شده با TLR-4 مورد بررسی قرار گرفت.

شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی (MD) به عنوان ابزار محاسباتی قدرت‌مندی برای مطالعه رفتار دینامیکی سیستم‌های مولکول زیستی در سطح اتمی مورد استفاده قرار می‌گیرند. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اطلاعات دقیقی را در مورد دینامیک ساختاری، تغییرات ساختاری، و برهم‌کنش‌های درشت مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای‌نوکلئیک و لیپیدها ارائه می‌دهند (۷۷, ۷۸). بنابراین، پایداری مجموعه کاندید واکسن-TLR4 با استفاده از شبیه‌سازی‌های MD تأیید شد. این نتایج نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های مولکولی پایدار بین کاندید واکسن و گیرنده ایمونولوژیک است، که در نتیجه پایداری مولکولی مجموعه واکسن چند اپی‌توپی را در محیط سلولی تضمین می‌کند.

با توجه به مطالعه شبیه‌سازی ایمنی، و هم‌چنین تولید مولکول‌های سیگنالی‌دهی مهم ایمنی مانند اینترلوکین‌ها و سیتوکین‌ها، پاسخ ایمنی کافی توسط کاندید واکسن طراحی شده در این مطالعه در طول مواجهه با واکسن ارائه شد. از آن‌جایی‌که هر نوع آنتی‌بادی نقش مشخصی در پاسخ ایمنی دارد (۷۹)، اثربخشی کاندید واکسن طراحی شده با توانایی آن در تحریک طیف وسیعی از پاسخ‌های آنتی‌بادی تأیید شد. نتایج به‌دست آمده از طریق شبیه‌سازی ایمنی نه تنها پتانسیل واکسن را تأیید می‌کند، بلکه اهمیت آن را در تقویت ایمنی در برابر ویروس آبله میمون نیز بیشتر می‌کند.

کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده در این تحقیق نویدبخش بوده و پتانسیل ایجاد یک پاسخ ایمنی قوی را نشان می‌دهد. با وجود این که رویکردهای ایمونوانفورماتیک ابزارهای ارزشمندی برای طراحی واکسن ارائه می‌دهند، اما بدون محدودیت نیستند. یکی از محدودیت‌های مهم در اتکا به پیش‌بینی‌های محاسباتی، عدم قطعیت نسبی است. دقت الگوریتم‌های پیش‌بینی اپی‌توپ به کیفیت و جامعیت داده‌های موجود بستگی داشته و ممکن است به طور بالقوه منجر به مثبت کاذب یا منفی کاذب شود. علاوه بر این، پیچیدگی واکنش‌های میزبان و پاتوژن و تنوع در پاسخ‌های ایمنی در افراد و جمعیت‌ها چالش‌های قابل توجهی را ایجاد می‌کند. علی‌رغم این محدودیت‌ها، رویکردهای ایمونو انفورماتیک یک راه امیدوارکننده برای طراحی واکسن هستند که نقطه شروع ارزشمندی برای تحقیقات تجربی و بالینی اعتبارسنجی کاندیدهای واکسن ارائه می‌کنند.

نتیجه‌گیری

روش‌های ایمونوانفورماتیکی پتانسیل بالایی برای طراحی واکسن‌های پپتیدی چند اپی‌توپی مؤثر علیه انواع مختلف

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

ویروس‌ها دارند. در این مطالعه، از ابزارهای مختلف ایمونوانفورماتیک برای طراحی یک واکسن جدید چند اپی‌توپی علیه ویروس آبله میمون استفاده گردید. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کاندید واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده آنتی‌ژنیسیته و ایمنی‌زایی امیدوارکننده‌ای نشان می‌دهد، غیرحساسیت‌زا و غیرسمی است و می‌تواند پاسخ‌های ایمنی قوی را بدون ایجاد عوارض جانبی ایجاد کند. همچنین برهم‌کنش بین واکسن چند اپی‌توپی وگیرنده TLR-4 با استفاده از داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که واکسن چند اپی‌توپی طراحی شده، پتانسیل ایجاد ایمنی در برابر ویروس آبله میمون را دارد و می‌تواند گامی مهم در جهت جلوگیری از عفونت‌های آبله میمون و مرگ و میر ناشی از آن باشد. با این حال، پس از بیان موفق پروتین نوترکیب طراحی شده به عنوان کاندید واکسن برای تأیید اثر بخشی آن نیاز به آزمایشات پیش‌بالینی بر روی مدل‌های حیوانی است.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع: نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که تضاد منافعی وجود ندارد.

حامی مالی: این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی (کد اخلاق): با توجه به ماهیت بیوانفورماتیکی مطالعه حاضر و مطابق با آیین‌نامه اختصاص کد اخلاق در کمیته اخلاق دانشگاه تبریز، امکان ارائه کد اخلاق برای این مطالعه وجود نداشت.

مشارکت نویسندگان

- **طراحی ایده:** بهرام باغبان کهنه‌روز
- **روش کار:** بهرام باغبان کهنه‌روز، مریم احساسات‌وطن
- **جمع‌آوری داده‌ها:** مریم احساسات‌وطن، فدرا نژاد ایران نژاد
- **تجزیه و تحلیل داده‌ها:** مریم احساسات‌وطن
- **نظارت:** بهرام باغبان کهنه‌روز
- **مدیریت پروژه:** بهرام باغبان کهنه‌روز
- **نگارش-پیش‌نویس اصلی:** مریم احساسات‌وطن
- --**نگارش-بررسی و ویرایش:** بهرام باغبان کهنه‌روز

References

1. Alakunle EF, Okeke MI. Monkeypox virus: a neglected zoonotic pathogen spreads globally. *Nat Rev Microbiol* 2022; 20(9): 507-8.

2. Happi C, Adetifa I, Mbala P, Njouom R, Nakoune E, Happi A, et al. Urgent need for a non-discriminatory and non-stigmatizing nomenclature for monkeypox virus. *PLoS Biol* 2022; 20(8): 3001769.

3. Earl PL, Americo JL, Moss B. Lethal monkeypox virus infection of CAST/EiJ mice is associated with a

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

deficient gamma interferon response. *J Virol* 2012; 86(17): 9105-12.

4. Grothe JH, Cornely OA, Salmanton-García J. Monkeypox diagnostic and treatment capacity at epidemic onset: A VACCELERATE online survey. *J Infect Public Health* 2022; 15(10): 1043-6.

5. WHO. Multi-country monkeypox outbreak: situation update. 2022.

6. Choudhary G, Prabha PK, Gupta S, Prakash A, Medhi B. Monkeypox infection: A quick glance. *Indian J Pharmacol* 2022 54(3); 161-4.

7. Bunge EM, Hoet B, Chen L, Lienert F, Weidenthaler H, Baer LR, et al. The changing epidemiology of human monkeypox—A potential threat? A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2022; 16(2): 0010141.

8. Plotkin SA, Orenstein W, Offit PA. Vaccines. E-book, Elsevier Health Sciences. 2012; 1570.

9. Grosenbach DW, Honeychurch K, Rose EA, Chinsangaram J, Frimm A, Maiti B, et al. Oral tecovirimat for the treatment of smallpox. *NEJM* 2018; 379(1): 44-53.

10. Chittick G, Morrison M, Brundage T, Nichols WG. Short-term clinical safety profile of brincidofovir: A favorable benefit–risk proposition in the treatment of smallpox. *Antiviral Res* 2017; 143: 269-77.

11. Delany I, Rappuoli R, Seib KL. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(5): 012476.

12. Albekairi TH, Alshammari A, Alharbi M, Alshammary AF, Tahir ul Qamar M, Ullah A, et al. Designing of a novel multi-antigenic epitope-based vaccine against E. hormaechei: an intergraded reverse vaccinology and immunoinformatics approach. *Vaccines* 2022; 10(5): 665.

13. Seib KL, Dougan G, Rappuoli R. The key role of genomics in modern vaccine and drug design for emerging infectious diseases. *PLoS Genet* 2009; 5(10): 1000612.

14. Goumari MM, Farhani I, Nezafat N, Mahmoodi S. Multi-epitope vaccines (MEVs), as a novel strategy against infectious diseases. *Curr Proteomics* 2020; 17(5): 354-64.

15. Negahdaripour M, Nezafat N, Eslami M, Ghoshoon MB, Shoolian E, Najafipour S, et al. Structural vaccinology considerations for in silico designing of a multi-epitope vaccine. *Infect Genet Evol* 2018; 58: 96-109.

16. Eaglesham JB, Pan Y, Kupper TS, Kranzusch PJ. Viral and metazoan poxins are cGAMP-specific nucleases that restrict cGAS–STING signalling. *Nature* 2019; 566(7743): 259-63.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

17. Maluquer de Motes C. Poxvirus cGAMP nucleases: Clues and mysteries from a stolen gene. *PLoS Pathog* 2021; 17(3): 1009372.

18. Eaglesham JB, McCarty KL, Kranzusch PJ. Structures of diverse poxin cGAMP nucleases reveal a widespread role for cGAS-STING evasion in host–pathogen conflict. *Elife* 2020; 9: 59753.

19. Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Röhl I, et al. cGAS produces a 2′-5′-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 2013; 498(7454): 380-4.

20. Phelan T, Little MA, Brady G. Targeting of the cGAS-STING system by DNA viruses. *Biochem Pharmacol* 2020; 174: 113831.

21. Liu F, Zhou P, Wang Q, Zhang M, Li D. The Schlafen family: complex roles in different cell types and virus replication. *Cell Bio Int* 2018; 42(1): 2-8.

22. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci* 2018; 27(1): 135-45.

23. Clifford JN, Høie MH, Deleuran S, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models. *Protein Sci* 2022; 31(12): 4497.

24. Saha S, Raghava GPS. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins:Struct., Funct., Bioinf* 2006; 65(1): 40-8.

25. Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Res* 2020; 48(1): 449-54.

26. Ehsasatvatan M, Kohnehrouz BB. Designing and immunomolecular analysis of a new broad-spectrum multiepitope vaccine against divergent human papillomavirus types. *PLoS One* 2024; 19(12): 0311351.

27. Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comp Biol* 2008; 4(4): 1000048.

28. 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. *Immunol* 2018; 154(3): 394-406.

29. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 4.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

30. 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): 1003266.

31. Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics* 2014; 30(6): 846-51.

32. Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP--a server for in silico prediction of allergens. *BMC Bioinformatics* 2013; 14: 4.

33. Sharma N, Naorem LD, Jain S, Raghava GP. ToxinPred2: An improved method for predicting toxicity of proteins. *Brief Bioinform* 2022; 23(5): 174.

34. Mahram A, Herbordt MC. NCBI BLASTP on high-performance reconfigurable computing systems. *TRETS* 2015; 7(4): 1-20.

35. Bui H-H, 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(1): 1-5.

36. Cepeda MS, Katz EG, Blacketer C. Microbiome-gut-brain axis: probiotics and their association with depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2017; 29(1): 39-44.

37. Dong R, Chu Z, Yu F, Zha Y. Contriving multi-epitope subunit of vaccine for COVID-19: immunoinformatics approaches. *Front Immunol* 2020; 11: 1784.

38. Hajighahramani N, Nezafat N, Eslami M, Negahdaripour M, Rahmatabadi SS, Ghasemi Y. Immunoinformatics analysis and in silico designing of a novel multi-epitope peptide vaccine against Staphylococcus aureus. *Infect Genet Evol* 2017; 48: 83-94.

39. 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.

40. Saadi M, Karkhah A, Nouri HR. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoin_ formatics based approaches. *Infect Genet Evol* 2017; 51: 227-34.

41. 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.

42. Garnier J, Gibrat J-F, Robson B. [32] GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. In Methods in enzymology. 266, Elsevier, Academic Press 1996; 540-53.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

43. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 2000; 16(4): 404-5.

44. Tunyasuvunakool K, Adler J, Wu Z, Green T, Zielinski M, Žídek A, et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* 2021; 596(7873): 590-6.

45. Ko J, Park H, Heo L, Seok C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(1): 294-7.

46. Laskowski R, MacArthur M, Thornton J. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. *International Table for Crystallography* 2012; 684-8.

47. Colovos C, Yeates T. ERRAT: an empirical atom-based method for validating protein structures. *Protein Sci* 1993; 2(9): 1511-9.

48. 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: 407-10.

49. Potocnakova L, Bhide M, Pulzova LB. An introduction to B-cell epitope mapping and in silico epitope prediction. *J Immunol Res* 2016; 2016.

50. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc* 2017; 12(2): 255-78.

51. Xue LC, Rodrigues JP, Kastritis PL, Bonvin AM, Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics* 2016; 32(23): 3676-8.

52. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 1995; 8(2): 127-34.

53. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 2005; 26(16): 1701-18.

54. Lindquist JM, Sulewski CA. Microsoft Excel: The Universal Tool of Analysis. In Handbook of Military and Defense Operations Research. Chapman and Hall/CRC, Taylor & Francis. 2020; 19-54.

55. DeWitt ME, Polk C, Williamson J, Shetty AK, Passaretti CL, McNeil CJ, et al. Global monkeypox case hospitalisation rates: a rapid systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine* 2022; 54.

56. Gruber MF. Current status of monkeypox vaccines. *NPJ Vaccines* 2022; 7(1): 94.

57. Owens LE. JYNNEOS vaccination coverage among persons at risk for mpox—United States, May 22,

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

2022–January 31, 2023. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2023; 72: 342-7.

58. Grosenbach DW, Jordan R, King DS, Berhanu A, Warren TK, Kirkwood-Watts DL, et al. Immune responses to the smallpox vaccine given in combination with ST-246, a small-molecule inhibitor of poxvirus dissemination. *Vaccine* 2008; 26(7): 933-46.

59. Cheng P, Gong W. In silico analysis of peptide-based biomarkers for the diagnosis and prevention of latent tuberculosis infection. *Front Microbiol* 2022; 13: 947852.

60. Mahapatra SR, Dey J, Kushwaha GS, Puhan P, Mohakud NK, Panda SK, et al. Immunoinformatic approach employing modeling and simulation to design a novel vaccine construct targeting MDR efflux pumps to confer wide protection against typhoidal Salmonella serovars. *J Biomol Struct Dyn* 2022; 40(22): 11809-21.

61. Beikzadeh B. Immunoinformatics design of multi-epitope vaccine using OmpA, OmpD and enterotoxin against non-typhoidal salmonellosis. *BMC Bioinformatics* 2023; 24(1): 63.

62. Maleki A, Russo G, Parasiliti Palumbo GA, Pappalardo F. In silico design of recombinant multi-epitope vaccine against influenza A virus. *BMC Bioinformatics* 2021; 22: 617.

63. 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.

64. Sarvmeili J, Baghban Kohnehrouz B, Gholizadeh A, Shanehbandi D, Ofoghi H. Immunoinformatics design of a structural proteins driven multi-epitope candidate vaccine against different SARS-CoV-2 variants based on fynomer. *Sci Rep* 2024; 14(1): 10297.

65. He R, Yang X, Liu C, Chen X, Wang L, Xiao M, et al. Efficient control of chronic LCMV infection by a CD4 T cell epitope-based heterologous prime-boost vaccination in a murine model. *Cell Mol Immunol* 2018; 15(9): 815-26.

66. Jiang P, Cai Y, Chen J, Ye X, Mao S, Zhu S, et al. Evaluation of tandem Chlamydia trachomatis MOMP multi-epitopes vaccine in BALB/c mice model. *Vaccine* 2017; 35(23): 3096-103.

67. Lu I-N, Farinelle S, Sausy A, Muller CP. Identification of a CD4 T-cell epitope in the hemagglutinin stalk domain of pandemic H1N1 influenza virus and its antigen-driven TCR usage signature in BALB/c mice. *Cell Mol Immunol* 2017; 14(6): 511-20.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

68. Hoque SF, Bappy MNI, Chowdhury AT, Parvez MSA, Ahmed F, Imran MAS, et al. Scrutinizing surface glycoproteins and poxin-schlafen protein to design a heterologous recombinant vaccine against monkeypox virus. *bioRxiv* 2020; 919332.

69. Sandrini A, Rolland JM, O'Hehir RE. Current developments for improving efficacy of allergy vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2015; 14(8): 1073-87.

70. Jasenosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Goldfeld AE. T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Immunolo Rev* 2015; 264(1): 74-87.

71. Papaleo E, Saladino G, Lambrughi M, Lindorff-Larsen K, Gervasio FL, Nussinov R. The role of protein loops and linkers in conformational dynamics and allostery. *Chem Rev* 2016; 116(11): 6391-423.

72. Marciani DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today* 2003; 8(20): 934-43.

73. Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol* 2010; 185(10): 5677-82.

74. Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol* 2014; 426(6): 1246-64.

75. Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 2013; 14(2): 135-52.

76. Alakunle E, Kolawole D, Diaz-Canova D, Alele F, Adegboye O, Moens U, et al. A comprehensive review of monkeypox virus and mpox characteristics. *Front Cell Infect Microbiol* 2024; 14: 1360586.

77. Adcock SA, McCammon JA. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem Rev* 2006; 106(5): 1589-615.

78. Machado MR, Pantano S. Split the charge difference in two! A rule of thumb for adding proper amounts of ions in MD simulations. *J Chem Theory Comput* 2020; 16(3): 1367-72.

79. Pang J, Cui J-a, Hui J. The importance of immune responses in a model of hepatitis B virus. *Nonlinear Dyn* 2012; 67: 723-34.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]

CCBY-NC.4.0 DEED

Immunoinformatics Design of a Multi-Epitope Vaccine Candidate via Poxin-Schlafen Protein of Monkeypox Virus

Maryam Ehsasatvatan[1], Bahram Baghban Kohnehrouz[2], Fedra Nejad Iran Nejad[3]

Received: 15/12/24 Sent for Revision: 19/01/25 Received Revised Manuscript: 01/03/25 Accepted: 04/03/25

Background and Objectives: Monkeypox virus, a DNA-enveloped virus of the orthopoxvirus family, causes monkeypox infection in humans. Poxviruses have a distinctive nuclease called poxin, which cleaves cyclic dinucleotide 2'-3'-cGAMP, a crucial secondary messenger in the cGAS-STING (Cyclic GMP-AMP Synthase-Stimulator of Interferon Genes) signaling pathway. Despite existing drugs and vaccines for orthopoxvirus infections, the recent spread of monkeypox has raised global concerns. This study investigated the poxin-schlafen protein of monkeypox virus as a potential target for a novel multi-epitope vaccine.

Materials and Methods: This study was conducted using bioinformatic data analysis. Epitopes of this protein were evaluated for non-allergenicity, non-toxicity, and the ability to elicit T and B cell responses. The interaction between the vaccine and toll-like receptor-4 (TLR-4) was assessed using Cluspro 2.0. Immune, and MD simulations were performed to confirm the reliability of the docked complexes.

Results: The designed vaccine candidate was highly antigenic, non-allergenic, soluble, and had acceptable physicochemical properties. The three-dimensional structure of the vaccine and its interaction with TLR-4 were elucidated. Molecular dynamics simulations corroborated the high stability of the vaccine-TLR-4 complex. Immune simulation indicated that the vaccine candidate effectively elicited robust protective immune responses in the human body.

Conclusion: This study identified the most efficacious epitopes from the poxin-schlafen protein of the monkeypox virus. These findings demonstrate the potential efficacy of this vaccine candidate in eliciting immune responses. This study could significantly advance the development of an antiviral vaccine against monkeypox viruses. However, further in vitro and in vivo studies are required.

Keywords: Monkeypox, Immunoinformatic, Poxin-schlafen, Vaccine candidate

Funding: The study was funded by Tabriz University, Tabriz, Iran.

Conflict interest: None declared.

Ethical considerations: Not applicable.

Authors' contributions:

-Conceptualization: Bahram Baghban Kohnehrouz

-Methodology: Bahram Baghban Kohnehrouz, Maryam Ehsasatvatan

- Data collection: Maryam Ehsasatvatan, Fedra Nejad Iran Nejad

-Formal analysis: Maryam Ehsasatvatan

-Supervision: Bahram Baghban Kohnehrouz

-Project administration: Bahram Baghban Kohnehrouz

-Writing - original draft: Maryam Ehsasatvatan

-Writing - review & editing: Bahram Baghban Kohnehrouz

Citation: Ehsasatvatan M, Baghban Kohnehrouz B, Nejad Iran Nejad F. Immunoinformatics Design of a Multi-Epitope Vaccine Candidate via Poxin-Schlafen Protein of Monkeypox Virus. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2025; 24 (1): 19-46. [Farsi]

1- Post Doctoral Researcher in Plant Biotechnology, Dept. of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Associate Prof., Dept. of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- MSc Graduate in Plant Biotechnology, Dept. of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, ORCID: 0009-0003-5258-1011

(Corresponding Author) Tel: (041) 33356003, E-mail: nejadiran.f@gmail.com

CCBY-NC.4.0 DEED

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-02]

[DOI: 10.61186/jrums.24.1.19]