




Introducing and Bioinformatic Evaluation of a Chimeric and Effective Immunogen Construct for Designing a Recombinant Vaccine against *Brucellosis*.

Narges Nazifi ¹ 

1. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Malt fever is a zoonotic disease caused by *Brucellosis* bacteria (an obligate intracellular pathogen) which is highly contagious. Usually, in common vaccines to deal with this pathogen, the whole body of the bacteria is used. Therefore, it causes many side effects. Nowadays, the use of subunit vaccines with the aim of eliminating pathogenic parts and strengthening immunogenic parts has been highly regarded.

Materials and Methods: In this study, the epitopes of L7/L12, BLS and bp26 antigens of *Brucella* bacteria were used to design the recombinant immunogenic structure. For this purpose, the reliable and online IEDB and IFNepitope servers were used to predict the epitopes of each antigen. After identifying the strongest epitopes of these antigens, structural engineering was performed using epitopes, peptide linkers and HBHA as a molecular adjuvant. Evaluation of the physicochemical properties, secondary structure, tertiary structure, antigenicity and allergenicity of the protein sequence of the recombinant construct were performed by ProtParam, SOPMA, I-TASSER, VaxiJen and AllerTOP servers, respectively. Finally, after predicting the second and third structure of the recombinant structure by SOPMA and I-TASSER servers, the protein-protein interaction between the HBHA molecule present in the recombinant structure and the TLR4/MD-2 receptor was investigated using ClusPro online server.

Results: Based on the results, the recombinant structure was successfully designed in two adjuvant (N-terminal) and epitopic (C-terminal) domains using rigid EAAAK linker. Other evaluations showed that the recombinant structure with a molecular weight of 36256.13 Da and an isoelectric point of 8.37, has an aliphatic index of 77.10 and a GRAVY index of -0.613. Also, based on this instability index, this protein is classified as a stable protein. Further investigations revealed that this structure was reported to be a non-allergenic structure with an antigenicity score of 0/8287. The results of protein-protein docking showed that the interaction between HBHA molecule and TLR4/MD-2 receptor with 62 cluster members and the lowest binding energy of -858.8 kcal/mol will be done successfully.

Conclusion: Therefore, the epitope-based recombinant structure can be introduced as a successful structure for engineering subunit vaccines.

Keywords: Bioinformatics, Subunit Vaccine, Brucellosis, Recombinant Protein, Epitope, HBHA

Received: 08.06.2023

Accept: 02.08.2024

Final edit: 02.16.2024

Publish Online: 02.21.2024


Corresponding Information: Narges Nazifi, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: nazifi.nrg@lu.ac.ir



Copyright © 2023, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usage with proper citation.



معرفی و ارزیابی بیوانفورماتیکی یک سازه ایمنوژن و موثر متشکل از اپی توپ‌های آنتی‌ژن‌های L7/L12، BLS، bp26 به منظور طراحی واکسن نو ترکیب بر علیه بیماری بروسلوز

نرگس نظیفی^۱ 

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: باکتری بروسلا یک پاتوژن درون سلولی اجباری است که عامل بیماری تب مالت در انسان و دام است و به شدت هم مسری می‌باشد. در ساخت واکسن رایج موجود برای مقابله با این پاتوژن معمولاً از کل پیکره باکتری مولد این بیماری استفاده می‌شود، به همین دلیل استفاده از آن عوارض بسیار زیادی دارد. امروزه استفاده از واکسن‌های زیر واحدی با هدف حذف بخش‌های پاتوژنیک و تقویت بخش‌های ایمنوژنیک بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از اپی‌توپ‌های سه آنتی‌ژن L7/L12، BLS و bp26 از باکتری بروسلا برای طراحی سازه نو ترکیب ایمنوژنیک استفاده شده است. بدین منظور برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های هریک از سه آنتی‌ژن مذکور از سرروه‌های معتبر و آنلاین IEDB و IFNepitope استفاده شد. در ادامه پس از شناسایی قویترین اپی‌توپ‌های این آنتی‌ژن‌ها، مهندسی سازه با استفاده از اپی‌توپ‌ها، لینکرهای پپتیدی و ادجوانت مولکولی HBHA انجام شد. ارزیابی خواص فیزیکی شیمایی، ساختار دوم، ساختار سوم، میزان آنتی ژنیسیته و آلرژنیسیته توالی پروتئینی سازه مذکور به ترتیب توسط سرروه‌های ProtParam، VaxiJen، I-TASSER، SOPMA و AllerTOP انجام شد. در نهایت پس از ریفاین کردن و انجام آنالیزهای رامچاندرا ن مربوط به ساختار سوم سازه طراحی شده به ترتیب توسط سرروه‌های GalaxyRefine و VADAR، فرایند برهمکنش پروتئین-پروتئین بین مولکول HBHA حاضر در سازه نو ترکیب و گیرنده TLR4/MD-2 نیز توسط سرور آنلاین ClusPro بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج بدست آمده سازه نو ترکیب در دو دمین ادجوانتی (N ترمینال) و اپی‌تویی (C ترمینال) با استفاده از لینکر غیر منعطف EAAAK با موفقیت طراحی شد. سایر ارزیابی‌ها نشان داد این سازه نو ترکیب دارای وزن مولکولی ۱۳/۳۶۲۵۶ دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۸/۳۷ است همچنین شاخص آلیفاتیک آن برابر با ۷۷/۱۰ و شاخص GRAVY آن برابر ۰/۶۱۳- می باشد. از طرفی بر اساس شاخص ناپایداری ارائه شده این پروتئین را در دسته پروتئین‌های پایدار طبقه‌بندی می‌کند. بر اساس بررسی‌های بیشتر، این ساختار یک سازه غیر آلرژن با امتیاز آنتی ژنیسیته ۰/۸۲۸۷ گزارش شد. نتایج داکینگ پروتئین-پروتئین نشان داد که همکنش بین مولکول HBHA و گیرنده TLR4/MD-2 با ۶۲ عضو خوشه و کمترین انرژی اتصال (۸/۸۵۸- کیلوکالری بر مول) با موفقیت انجام خواهد شد.

نتیجه‌گیری: بنابراین بر اساس نتایج ارائه شده می‌توان سازه نو ترکیب بر پایه اپی‌توپ را به عنوان یک سازه موفق برای ساخت واکسن‌های زیر واحدی معرفی کرد.

کلیدواژه‌ها: بیوانفورماتیک، واکسن زیر واحدی، بروسلوز، پروتئین نو ترکیب، اپی‌توپ، HBHA

انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۱۲/۰۲

ویرایش نهایی: ۱۴۰۲/۱۱/۲۷

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۶

اطلاعات نویسنده مسئول: نرگس نظیفی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

Email: Nazifi.nrg@lu.ac.ir

حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط



Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License توزیع شده است که اجازه کپی و توزیع مجدد

مطالب را فقط در استفاده غیر تجاری با استناد مناسب می‌دهد.

مقدمه

بیماری بروسولوز یا تب مالت (تب مدیترانه‌ای) یکی از مرموزترین بیماری‌های شناخته شده مشترک بین انسان و حیوان است که به واسطه حضور باکتری *کوکوباسیل گرم منفی بروسلا* در داخل سلول‌های پستانداران رخ می‌دهد (۱). این باکتری می‌تواند عاملی مهمی در بروز ضررهای اقتصادی و جانی برای انسان و دام شود به طوری که در صورت آلوده شدن دام‌ها به این باکتری علائمی مانند سقط جنین، جفت ماندگی، کاهش باروری، کاهش تولید شیر و ... ملاحظه می‌شود (۲). این بیماری از جمله بیماری‌های مقاوم به درمان برشمرده می‌شود و دارای طول درمان طولانی مدتی به همراه انواع مشکلات اقتصادی و روانی برای جامعه و فرد است. آنچه بیماری بروسولوز را در ایران نسبت به سایر کشورها متمایز می‌نماید اپیدمیولوژی (همه‌گیر) آن است. این بیماری در تمام فصول وجود دارد، اما در فصل بهار و تابستان، یعنی فصل زایش و شیردهی دام‌ها بیشتر دیده می‌شود (۳). پیشگیری از طریق واکسیناسیون موثرترین راه برای کاهش میزان بروز بیماری است. علاقه محققین به توسعه تکنیک‌های جدید و به روز در امر واکسیناسیون منجر به توسعه نسل‌های جدیدی از واکسن‌های ایمن شده است چرا که در طراحی این دسته از واکسن‌ها به صورت زیر واحدی از اجزای ایمنی‌زا پاتوژن‌ها استفاده شده است (۴). علاوه بر این بکارگیری تکنیک‌های مبتنی بر DNA نوترکیب منجر به تولید نسل سوم واکسن‌هایی شد که در امتداد نسل دوم واکسن‌ها که شامل اجزای مؤثر ایمونوژنیک میکروارگانیزم‌ها بود (۵) به نسل اول واکسن‌ها که از یک پاتوژن ضعیف و غیرفعال شده بود اضافه شدند (۶). فرمولاسیون و مشخصات این واکسن‌ها توسط محققان و تولیدکنندگان دارو به صورت مداوم در دست بررسی است. علاوه بر این، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مهندسی شده می‌توانند در تولید این واکسن‌ها به عنوان بستری برای تولید و بیان پروتئین‌های ایمونولوژیک استفاده شوند (۷).

پروتئین ریبوزومی L7/L12 از باکتری *بروسلا* دو پروتئینی هستند که توسط یک ژن کد می‌شوند و L7 تنها توسط یک ویرایش که بعد از رونویسی در ناحیه N ترمینال L12 رخ می‌دهد، به وجود می‌آید (۸). این پروتئین در گونه‌های *بروسلا* به عنوان یک آنتی ژن حفاظتی شناخته شده است. گزارشات نشان داده‌اند که استفاده از این آنتی ژن در DNA واکسن‌ها سبب ایجاد ایمنی سلولی مطلوب در

برابر عفونت *بروسلا* در موش (Balb/c) می‌گردد (۹، ۱۰). آنزیم باکتریایی لومازین سنتاز از دیگر آنتی ژن‌های باکتری *بروسلا* با طول ژنی ۴۷۷ جفت باز و وزن مولکولی حدود ۱۷ کیلو دالتون می‌باشد. آنزیم لومازین سنتاز استحصال شده از *بروسلا* (BLS) بشدت ایمینوژنیک بوده و زمانی که یک آنتی ژن خارجی به آن متصل شود می‌تواند دارای ویژگی ادجوانتی (adjuvant) نیز باشد. همچنین این آنتی ژن توانایی تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی را دارد (۱۱). پروتئین BLS به عنوان یک دایمر پایدار متشکل از پنتامرایی با ۱۰ محل اتصال در N-پایانه شناخته شده است. بررسی‌ها ساختاری این مولکول نشان داده است که امکان کایمرشدن پپتیدها و یا برخی از پروتئین‌ها به این پروتئین بدون ایجاد اختلال در ساختار آن وجود دارد. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که BLS می‌تواند پاسخ‌های سلولی را با ارائه اپی‌توپ‌های سلول T CD8+ به مسیر MHC کلاس I فعال کند و باعث ایجاد یک پاسخ سلولی اختصاصی آنتی-ژن با تولید IFN- γ و پاسخ هومورال قوی و طولانی در غیاب ادجوانت شود (۱۲). در مطالعه حاضر از توالی پروتئینی سه آنتی ژن L7/L12، BLS و bp26 برای پیش بینی اپی‌توپ‌ها در طراحی یک واکسن ایمونون زیر واحدی بر علیه باکتری *بروسلا* استفاده شده است.

روش انجام کار

جمع آوری توالی پروتئینی

در پژوهش حاضر برای بدست آوردن برخی از محتمل‌ترین اپی-توپ‌های ایمونوژنیک باکتری *بروسلا* از توالی اسید آمینه‌ای آنتی ژن‌های L7/L12، BLS و bp26 به ترتیب با شماره دسترسی AAA56790.1، AHW58136.1 و AAO39772.1 در پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) استفاده شد. علاوه بر این در این مطالعه از پروتئین HBHA از باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوسیز* با شماره NC_000962.3 در پایگاه داده NCBI به عنوان یک ادجوانت مولکولی استفاده شد. همچنین با هدف اجرای فرایند داکینگ مولکولی فایل pdb گیرنده TLR4/MD-2 با شماره دسترسی 2Z64 از پایگاه داده (<https://www.rcsb.org/>) استخراج شد.

شناسایی سیگنال پپتاید و پیش‌بینی بیوانفورماتیکی اپی-توپ‌ها

در ادامه این مطالعه برخی از مهمترین خواص فیزیکی شیمیایی مربوط به سازه نو ترکیب طراحی شده مانند وزن مولکولی، نیمه عمر، GRAVY، aliphatic index، شاخص پایداری و نقطه ایزوالکتریک با بکارگیری از سرور آنلاین ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) ارزیابی شدند. سنجش میزان آنتی ژنیسیته و آلرژن بودن این سازه طراحی شده نیز به ترتیب توسط سرورهای آنلاین و معتبر VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) و AllerTOP (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) انجام شد. برای استفاده از این سرورها توالی اسید آمینه‌ای پروتئین نو ترکیب مذکور به صورت خام به کار گرفته شد.

پیش بینی ساختار دوم و سوم سازه نو ترکیب

با هدف پیش بینی ساختار دوم سازه نو ترکیب طراحی شده در این مطالعه، درصد میزان تشکل انواع شکل‌های مختلف فضایی اعم از مارپیچ‌ها، صفحه‌ها، حلقه‌ها و چرخش‌های موجود در توالی این سازه کایمریک، توسط سرور (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) بررسی شدند. همچنین در ادامه بررسی‌ها برای مشاهده ساختار سوم سازه مذکور از سرور معتبر I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) استفاده گردید. سپس بهترین مدل پیشنهاد شده توسط سرور I-TASSER (مدلی که بالاتری ضریب اعتماد را ارائه کرده بود)، مجدد با بکارگیری سرور GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) ریفاین شد تا از چپ‌ساز صحیح اسیدهای آمینه و همچنین زاویه صحیح گروه‌های متصل به کربن آلفا در مدلی سه بعدی پیش بینی شده پروتئین اطمینان حاصل شود. در نهایت به منظور شناسایی بهترین مدل از ساختارهای سوم ریفاین شده، پلات رامچاندرا برای هر یک از مدل‌های پیشنهاد شده توسط سرور (<http://vadar.wishartlab.com>) VADAR رسم شد.

بررسی داکینگ مولکولی سازه نو ترکیب و گیرنده TLR4/MD-2

به منظور بررسی صحت برهمکنش پروتئین-پروتئین بین کایمر نو ترکیب طراحی شده و گیرنده TLR4/MD-2، سرور

شناسایی توالی رهبر سیگنال پپتاید هر یک از آنتی‌ژن‌های BLS، L7/L12 و bp26 با استفاده از سرور تحت وب SignalP نسخه 4/1

(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) انجام شد. به منظور استفاده از این سرور از فرمت FASTA توالی نوکلئوتیدی هر یک از آنتی‌ژن‌های مذکور استفاده شد. برای پیش‌بینی دقیق‌ترین توالی‌های اپی‌توپی سلول‌های T و B هر یک از آنتی‌ژن‌های L7/L12، BLS و bp26 نیز از سرور تحت وب معتبر IEDB (<https://www.iedb.org/>) استفاده شد.

همچنین برای پیش‌بینی اپی‌توپی‌های مربوط به اینترفرون گاما نیز سرور معتبر IFNepitope (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/scan.php>) بکار گرفته شد. در این مرحله، از توالی خطی اسید آمینه‌ای هر یک از آنتی ژن‌های مذکور استفاده شد. اپی‌توپی‌هایی که توسط مولکول MHC کلاس I ارائه می‌شود به دلیل کوچک بودن شیار این دسته از مولکول‌ها به طور معمول پپتیدهای نسبتاً کوتاهی با طول ۸ الی ۱۱ اسید آمینه هستند در حالی که شیار اتصال در کلاس II مولکول‌های MHC بزرگتر می‌باشد و می‌توانند پپتیدهایی با طول ۱۳ الی ۱۷ اسید آمینه را ارائه می‌دهند (۱۳). بنابراین در تنظیمات مربوط به استفاده از سرور، برای شناسایی اپی‌توپی‌های کلاس I مولکول MHC طول‌های ۸، ۱۰ و ۱۲ اسید آمینه‌ای و در زمان شناسایی اپی‌توپی‌های کلاس II مولکول MHC طول ۱۵ اسید آمینه‌ای که پیش فرض خود سرور هم بود انتخاب شدند.

طراحی یک سازه ایمونوژنیک نو ترکیب

سازه ایمونوژنیک نو ترکیب طراحی شده در این مطالعه متشکل از یک دمین ادجوانت مولکولی که شامل مولکول HBHA (انتهای N) و یک دمین اپی‌توپی که شامل اپی‌توپی‌های خطی سلول‌های MHCI و MHCII و B Cell و INF γ مربوط به هر سه آنتی ژن L7/L12، BLS و bp26 (انتهای C) می‌باشد که با کمک لینگرهای غیر منعطف به هم متصل شده‌اند. برای چپ‌ساز و طراحی این سازه نو ترکیب از نرم افزار CLC Main Workbench استفاده شده است.

ارزیابی خواص فیزیکی شیمیایی، آنتی ژنیسیته، آلرژنیسیته سازه نو ترکیب

شناسایی توالی اپی‌توپ‌های تحریک کننده سلول‌های T و سلول‌های B، اینترفرون گاما و تعیین میزان آنتی ژنیسیته اپی‌توپ‌ها

سرورهای IEDB و IFNepitope از جمله سرورهای قدرتمند با بالاترین نرخ ارجاع در پژوهش‌های حوزه ایمونفورماتیک می‌باشند. داده‌های ارائه شده در جدول ۱، ۲ و ۳ مربوط به نتایج پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های T (سلول‌های MHC I، MHC II) و سلول‌های B توسط سرور IEDB و اپی‌توپ‌های اختصاصی اینترفرون گاما توسط سرور IFNepitope می‌باشند. در ابتدا اپی‌توپ‌های هر یک از آنتی ژن‌های L7/L12، BLS و bp26 در هر دسته مولکولی پیش‌بینی و چندین اپی‌توپ برتر که بالاترین امتیاز برای نرخ اتصال را ارائه کرده بودند انتخاب شدند. در ادامه اپی‌توپ‌های انتخاب شده توسط سرور VaxiJen بررسی شدند و اپی‌توپ‌هایی که غیر آنتی ژن بودند حذف شدند و در نهایت اپی‌توپ‌هایی که بالاترین امتیاز اتصال به سلول‌های MHC I، MHC II و B Cell را به همراه بالاترین امتیاز آنتی ژنیسیته (ارائه شده توسط سرور VaxiJen) ارائه کرده بودند انتخاب شدند و بر اساس بالاترین اسکور آنتی ژنیسیته رتبه بندی شدند.

جدول (۱) بهترین اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده از آنتی ژن L7/L12 با

اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط مولکول‌های MHC I		
نام سرور	توالی اپی‌توپ	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/mhci/)	۵۵ KTEFDVLA ۶۳	۱/۲۰۶
	۶۲ LADGGANKI ۷۰	۱/۱۵۵
	۳۲ ASKDEAEKIK ۴۱	۱/۰۹۷
	۵۰ AAAEETEF ۵۸	۰/۵۸۷
	۱۶ VEDLSALT V ۸	۰/۱۷۳
اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط مولکول‌های MHC II		
نام سرور	توالی اپی‌توپ	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/mhcii/)	۵۵ KTEFDVVLADGGANK ۶۹	۱/۳۷۹
	۳۷ AEKIKAQLEAAGAKV ۵۱	۱/۱۹۷
	۲۷ EEKVGWVAAPVAVAV ۴۱	۰/۷۷۵
	۴ KEVRALTGLGLKEAK ۱۸	۰/۷۳۶
	۳۵ AAAPVAVAAAGGAAPA ۴۹	۰/۸۴۵
اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط B Cell		
نام سرور	توالی اپی‌توپ	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/bcell/)	KAVKEGAKSDE 106 ۹۶	۱/۳۰۹
	۲۸ EKWGVSAAPVAVAAAGGAA ۵۵	۰/۸۷۵۰
	۷۷ RALTGLGLKE ۸۶	۰/۵۷۳
اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط مولکول‌های IFN-γ		
نام سرور	توالی اپی‌توپ	امتیاز آنتی ژنیسیته
IFNepitope (http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/scan.php)	۳۲ SAAAPVAVAAAGGAA ۴۷	۰/۹۴۷۱

بالاترین امتیاز اتصال که بر اساس امتیاز آنتی ژنیسیته مرتب سازی شده-اند.

جدول (۲) بهترین اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده از آنتی ژن BLS با بالاترین امتیاز اتصال که بر اساس امتیاز آنتی ژنیسیته مرتب سازی شده‌اند.

اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط مولکول‌های MHC I		
نام سرور	توالی اپی‌توپ	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/mhci/)	۵۵ SVEVEIFDVGGA ۴۳	۰/۹۴۷
	۳۴ ETEVPVLSV ۴۲	۰/۹۲۶
	۱۱ NQSCPKNKTSF ۲	۰/۵۳۴
	۵۴ EHHDFPHAHF ۶۳	۰/۵۹۶
اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط مولکول‌های MHC II		
نام سرور	توالی اپی‌توپ	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/mhcii/)	۴۵ SFVAELAAKTGGVVE۱	۱/۲۳۷
	۱۴۵ HFVKVGVAAHAALQ۱۳۱	۱/۱۱۳
	۱۱۴ QVLETEVPVLSVVL۱۰۰	۰/۹۳۵
	۴۳ RKSFVAELAAKTGGG ۲۹	۰/۸۹۴
	۸۰ RTGRYAAIVGAAFV۱۶۶	۰/۶۴۹
اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط B Cell		
نام سرور	توالی اپی‌توپ	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/bcell/)	۱۳۶ FHSKEHHDFPHAHFVK۱۱۹	۰/۶۲۹
اپی‌توپ‌های قابل شناسایی توسط IFN-γ		
نام سرور	توالی اپی‌توپ	امتیاز آنتی ژنیسیته
IFNepitope (http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/scan.php)	۱۱۲ VLTPHFHSKEHH ۱۲۸	۰/۶۰۴۰

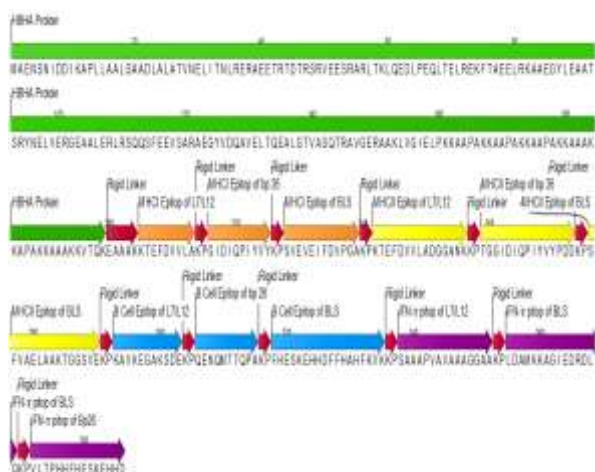
(<https://php.queue/=redir/php.login/org.cluspro/>) ClusPro ورژن ۲ بکار گرفته شد. در این رابطه، فرمت pdb پروتئین TLR4/MD-2 به عنوان فایل گیرنده و فایل pdb بهترین مدل ریفاین شده کایمر نو ترکیب طراحی شده که از مراحل قبل به دست آمده بود به عنوان لیگاند استفاده شد.

نتایج

استخراج توالی‌های پروتئینی آنتی ژن‌ها و شناسایی سیگنال پپتیدها

توالی اسید آمینه‌ای هر یک از آنتی ژن‌های L7/L12، BLS و bp26 با موفقیت از پایگاه داده NCBI استخراج شد و سپس برای بررسی و شناسایی توالی سیگنال پپتاید مورد ارزیابی قرار گرفت. سیگنال پپتیدها به عنوان یک توالی رهبر شناخته می‌شوند که پروتئین‌های در حال ساخت را به سمت محلی سازی مطلوب در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی هدایت می‌کند (۱۴، ۱۵). بنابراین این دنباله پپتید که در انتهای N پروتئین واقع است زمانی که از ترانسپوزون عبور می‌کند، جدا می‌شود (۱۶). در این مطالعه با استفاده از سرور SignalP 5، توالی‌های سیگنال پپتیدی آنتی ژن-های L7/L12، BLS و bp26 با موفقیت از N-ترمینال توالی پروتئین‌ها تعیین و سپس حذف شدند.

توالی اسید آمینه‌ای ادجوانت مولکولی HBHA نیز گنجانده شد. لازم به ذکر است که این توالی توسط لینکر پپتیدی غیر منعطف EAAAK به دمین اپی‌توبی متصل شد (شکل ۱).



شکل ۱) سازه نو ترکیب طراحی شده متشکل از دو دومین اصلی ادجوانتی و اپی‌توبی. در این تصویر رنگ سبز مربوط به ادجوانت HBHA، رنگ نارنجی مربوط به اپی‌توب‌های گروه MHCII، رنگ زرد مربوط به اپی‌توب‌های گروه MHCII، رنگ آبی مربوط به اپی‌توب‌های سلول‌های B و رنگ بنفش مربوط به اپی‌توب‌های IFN- γ می‌باشد. همچنین رنگ قرمز در این تصویر نشان دهنده لینکرهای پپتیدی غیر منعطف می‌باشد.

ارزیابی خواص فیزیکی شیمیایی، آنتی ژنیسیته، آلرژنیسیته سازه نو ترکیب

برخی از مهمترین خواص فیزیکی شیمیایی سازه نو ترکیب طراحی شده توسط سرور ProtParam بررسی شد. نتایج نشان داد که این سازه نو ترکیب با ۳۳۵ اسید آمینه، وزن مولکولی ۱۳ / ۳۶۲۵۶ دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۸/۳۷ / دارای شاخص آلفاتیک ۷۷/۱۰ و GRAVY ۰/۶۱۳ - می‌باشد. علاوه بر این شاخص ناپایداری این توالی پروتئینی ۳۴/۸ گزارش شده است که این پروتئین را در دسته پروتئین‌های پایدار حرارتی معرفی می‌کند. امتیاز آنتی ژنیسیته کل این سازه توسط سرور VaxiJen معادل ۰//۸۲۸۷ گزارش شد. بنابراین پروتئین را می‌بایست به عنوان یک پروتئین آنتی ژنیک برشمرد. در ادامه آلرژن بودن این توالی نیز توسط سرور AllerTOP ارزیابی شد و این سازه را غیر آلرژن معرفی کرد.

نتایج ارزیابی ساختار دوم و سوم سازه نو ترکیب طراحی شده

ساختار های دوم موجود در سازه مهندسی شده توسط سرور SOPMA ارزیابی شدند و بر اساس نتایج مشاهده شده این سازه

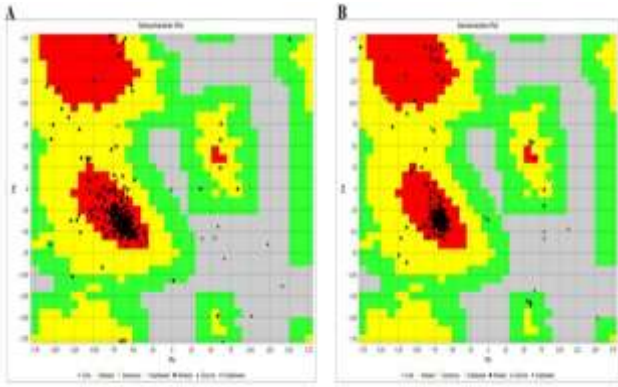
جدول ۳) بهترین اپی‌توب‌های پیش بینی شده از آنتی ژن Bp26 با بالاترین امتیاز اتصال که بر اساس امتیاز آنتی ژنیسیته مرتب سازی شده‌اند.

مهندسی سازه نو ترکیب متشکل از آنتی ژن‌ها و ادجوانت مولکولی

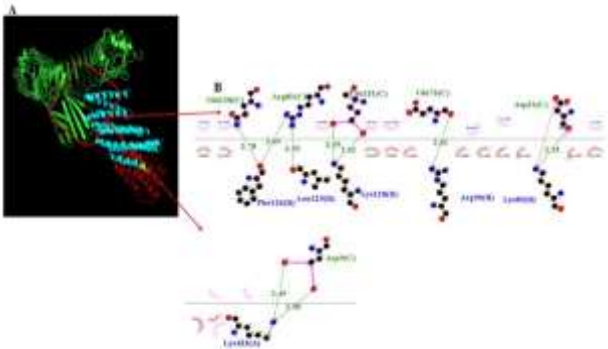
در این بخش بهترین توالی‌های پپتیدی اپی‌توب‌های هر یک از آنتی ژن انتخاب شدند. در این راستا به ترتیب توالی‌های پپتیدی VEVEIFDVP GAY و GIDIQPIYVY ، LADGGANKI ایده‌آل‌ترین اپی‌توب‌های مربوط به مولکول MHCII، توالی‌های پپتیدی KTEFDVVLADGGANK و SFVAELA AKTGG SVE و TGGIDIQPIYVYPDD بهترین اپی‌توب‌های مربوط به مولکول‌های MHCII، توالی‌های پپتیدی KAVKEGAKSDE، QENQMTTQPA و بهترین اپی‌توب‌های مربوط به مولکول‌های B Cell و همچنین توالی‌های

اپی‌توب‌های قابل شناسایی توسط مولکول‌های MHCII		
نام سرور	توالی اپی‌توبی	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/mhci/)	۳۹ GIDIQPIYVY۳۰	۲/۱۹۸
	۳۷ LQTGGIDIQPIY۲۶	۱/۴۱۵
	۵۵ TLADAAGVGL۴۶	۱/۱۷۷
	۵۹ ASPDMAILNL۵۰	۱/۰۷۹
	۱۱MTANNEAMTK۲	۱/۰۱۶
اپی‌توب‌های قابل شناسایی توسط مولکول‌های MHCII		
نام سرور	توالی اپی‌توبی	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/mhcii/)	۱۱۲ TGGIDIQPIYVYPDD۹۸	۱/۶۱۸
	۱۳۵ ITGYSVSTSLTVRVR۱۲۱	۱/۲۴۰
	۲۵۰ ENSYNSVNVVFEIK۲۳۶	۱/۲۲۷
	۴۴ ENQMTTQPARIAVTG۳۰	۰/۹۱۴
	۴۴ ENQMTTQPARIAVTG۳۰	۰/۹۱۴
اپی‌توب‌های قابل شناسایی توسط B Cell		
نام سرور	توالی اپی‌توبی	امتیاز آنتی ژنیسیته
IEDB (http://tools.iedb.org/bcell/)	۳۷ QENQMTTQPA۲۹	۱/۰۸۹
	۱۲۰ IQPIYVYPDDKNLKEPT۱۰۳	۰/۶۲۸
	۱۴۹ TLGVNQGDDLNLVNDNPSAVINE 171	۰/۸۶۹
اپی‌توب‌های قابل شناسایی توسط IFN- γ		
نام سرور	توالی اپی‌توبی	امتیاز آنتی ژنیسیته
IFNepitope (http://crdd.osdd.net/raghav/ifnepitope/scan.php)	۹۷ LDAMKKAGIEDRDLQ۸۲	۰/۶۳۴۰

و VLTPHHFHESKEHHD ، SAAAPVAVAAAGGAA و LDAMKKAGIEDRDLQ بهترین اپی‌توب‌های مربوط به مولکول‌های IFN- γ از هر یک از آنتی ژن‌های L7/L12، BLS و bp26 بودند که توسط لینکر پپتیدی غیر منعطف KP به یکدیگر متصل شدند. سپس در بالادست این چهار چوب اپی‌توبی (N ترمینال)



شکل ۳) مقایسه پلات رامچاندران بین اولین مدل سه بعدی پیش بینی شده توسط سرور I-TASSER (A) و بهترین مدل ریفاین شده توسط سرور GalaxyRefine (B).

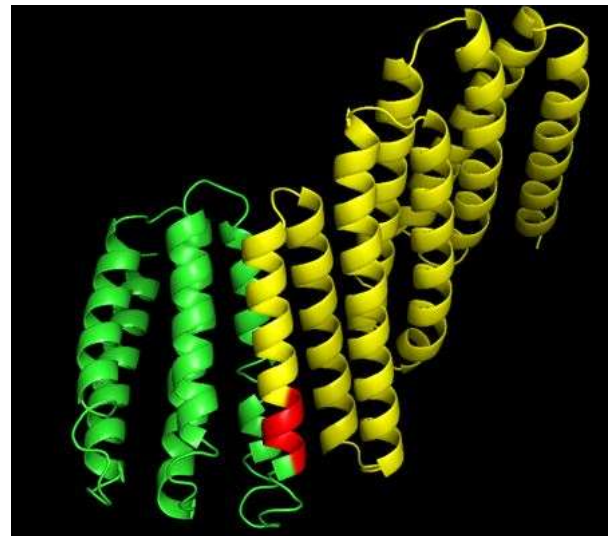


شکل ۴- A: برهمکنش بینادجوانت مولکولی HBHA در کایمر نوترکیب طراحی شده مولکول گیرنده TLR4/MD-2. رنگ سبز نشان دهنده مولکول گیرنده TLR4/MD-2، رنگ آبی دمین ادجوانت مولکولی HBHA، رنگ زرد لینکر EAAAK، و رنگ قرمز دمین اپی تویی را نشان میدهد. B: تعداد و طول پیوندهای هیدروژنی بین ادجوانت مولکول HBHA و گیرنده TLR4/MD-2 که توسط نرم افزار LigPlot+ ظاهر سازی شده است. پیوندهای هیدروژنی توسط خط چین سبز نشان داده شده است.

نتایج داکینگ پروتئین-پروتئین سازه نوترکیب طراحی شده و گیرنده TLR4/MD-2

بررسی داکینگ بین پروتئین نوترکیب طراحی شده و پروتئین گیرنده آن در سطح سلول توسط سرور ClusPro با موفقیت انجام شد. نتایج نشان داد که پروتئین HBHA موجود در سازه مورد مطالعه توانست با کمترین انرژی به گیرنده خود (TLR4/MD-2) متصل شود (شکل ۴) در این برهمکنش ۶۲ عضو خوشه وجود داشت و امتیاز مرکز خوشه ۴/۶۵۷- بود. کمترین انرژی این اتصال نیز ۸/۸۵۸- کیلوکالری بر مول محاسبه شد. در ادامه نیز از نرم افزارهای PyMol و LigPlot+ جهت ارزیابی بیشتر محصول داک شده و برآورد تعداد و طول پیوندهای هیدروژنی مورد استفاده قرار گرفت. بر این اساس، همانطور که در شکل ۵ مشاهده می شود در طی برهمکنش مولکول HBHA با پروتئین گیرنده مولکولی

دارای ۶۰/۸۸٪ آلفا هلیکس، ۵/۹۶٪ صفحات گسترده و ۳۳/۱۶٪ رندوم کویل می باشد (شکل ۲). ساختار سوم سازه مذکور با موفقیت توسط سرور I-TASSER پیش بینی شد و بهترین مدل پیش بینی شده با بالاترین ضریب اطمینان انتخاب شد. صحت پیش بینی ساختار سوم توسط آنالیزهای رامچاندران بررسی شد و نتایج نشان داد که درصد حضور اسیدهای آمینه در بخش هسته، مجاز و غیر مجاز به ترتیب ۸۶٪، ۱۰٪ و ۱٪ درصد بود. بنابراین با توجه به کم بودن درصد اسیدهای آمینه در ناحیه هسته، برای تصویب و بهبود دقت مدل اولیه از سرور Galaxy Refine استفاده شد (شکل ۳). نتایج آنالیز رامچاندران بهترین مدل pdb که تصویب شده بود نشان داد که درصد حضور اسیدهای آمینه در بخش هسته، مجاز و غیر مجاز به ترتیب به ۹۴٪، ۴٪ و ۱٪ درصد ارتقاء یافت (شکل ۴).



شکل ۵) بهترین مدل سه بعدی ریفاین شده (توسط سرور GalaxyRefine) از مدل اولیه پیش بینی شده سازه نوترکیب طراحی شده توسط سرور I-TASSER. رنگ سبز مربوط به دمین ادجوانت مولکولی HBHA، رنگ قرمز مربوط به لینکر غیر منعطف و رنگ زرد نیز مربوط به دمین اپی تویی می باشد.

TLR4/MD-2، تعداد ۹ پیوند هیدروژنی ایجاد شد. اسیدهای آمینه در گیر پیوندهای هیدروژنی در جدول ۴ گزارش شده است.

اسید آمینه‌های گیرنده TLR4/MD2	اسید آمینه‌های مولکول HBHA	طول پیوند هیدروژنی (آنکستروم)
فنیل آلانین ۱۲۶	گلوتامین ۱۲۸	۲/۷۸
فنیل آلانین ۱۲۶	آرژینین ۸۱	۲/۶۹
لوسین ۱۲۵		۲/۵۵
لیزین ۱۲۸	گلوتامین ۱۳۱	۲/۵۵
		۲/۶۹
آرژینین ۹۰	گلوتامین ۷۳	۲/۶۱
لیزین ۸۹	آسپارژین ۲۲	۲/۵۳
لیزین ۴۳۳	آسپارژین ۹	۲/۴۹
		۲/۵۸

جدول ۴) لیست اسید آمینه‌هایی که در تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکول‌های HBHA و TLR4/MD2 دخالت دارند

بحث

بکارگیری راهبردهای کامپیوتر که در مطالعات ایمونولوژی و بلاخص در رابطه با طراحی و معرفی واکسن‌هایی با ترکیبات جدید مزایای زیادی نسبت به روش‌های سنتی دارند. در واقع با بکارگیری استراتژی‌های جدید با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای طراحی واکسن، می‌توان مهم‌ترین ویژگی‌ها را به دقت پیش‌بینی کرد. در نتیجه، می‌توان ادعا کرد که این استراتژی‌های کامپیوتری توانسته‌اند زمان و هزینه طراحی واکسن را به طور چشمگیری کاهش دهند (۱۷). تاکنون روش‌های بیوشیمیایی، سرولوژیکی و میکروبیولوژیکی برای تشریح پاتوژن‌ها و شناسایی اجزای مفید آن‌ها برای توسعه واکسن مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اگر چه این روش‌ها در بسیاری از موارد موفق بوده است اما وقت گیر هستند و در زمانی که پاتوژن‌ها را نمی‌توان در شرایط آزمایشگاهی کشت داد و یا زمانی که توالی برخی آنتی‌ژن‌ها ممکن است دستخوش تغییر شوند، شکست می‌خورند. اکنون پویش‌های ژنومی امکان پیش‌بینی تمام آنتی‌ژن‌ها را بدون توجه به فراوانی و ایمنی‌زایی آن‌ها در طول عفونت بدون نیاز به رشد عامل بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌کند. این امر امکان تولید واکسن با استفاده از آنتی‌ژن‌های غیر متعارف و بهره‌برداری از بازوهای غیر متعارف سیستم ایمنی را فراهم می‌کند و بسیاری از واکسن‌هایی که توسعه آن‌ها تاکنون غیر ممکن بود به واقعیت تبدیل خواهند شد (۱۸). استفاده از ابزارهای مناسب با دقت بالا در حوزه مطالعات بیوانفورماتیکی ساخت سازه‌های جدید و نو ترکیب که در طراحی آنها از زیر واحدی‌های ایمونوزیک پاتوژن‌های بهره‌گرفته است را ممکن می‌سازد. این

فرایند گام مهم و اساسی در ارتقاء و پوشش نقایص نسل اول واکسن‌ها است که از کل پیکره یک پاتوژن در ساخت واکسن استفاده می‌کردند. اهمیت این نسل دوم واکسن‌ها نه تنها مربوط به خاصیت غیر پاتوژنیک بودن و در عین حال ایمونوژن بودن آنها می‌باشد بلکه با صرفه جویی در زمان و هزینه می‌تواند از دفعات آزمایشات در حوزه *In vitro* کاهش دهد. اپی‌توپ‌های خطی شامل باقی مانده‌های با طول کوتاه از جنس آمینواسیدهای موجود در توالی پروتئینی آنتی‌ژن‌ها هستند که در سطح صاف مولکول ارائه شده اند (۱۹، ۲۰). این دسته از اپی‌توپ‌ها توسط هر دو گروه لنفوسیت B و T شناسایی می‌شوند بنابراین این گروه از اپی‌توپ‌ها نسبت به اپی‌توپ‌های فضایی یا غیر ممتد قدرت ایمنی‌زایی و در نتیجه میزان تولید آنتی‌بادی بیشتری دارند (۲۱). در دهه اخیر مطالعات بسیاری دیده می‌شود که در آن‌ها از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی و بکارگیری اپی‌توپ‌های قدرتمند در طراحی سازه‌های واکسنی بهره‌گرفته شده است (۴، ۲۲-۲۴). در مطالعه حاضر با بهره‌گیری از ابزارهای قدرتمند در پیش‌بینی و آنالیزهای تخصصی اپی‌توپ‌ها در حوزه ایمونولوژی بهترین اپی‌توپ‌های مربوط به سه آنتی‌ژن قدرتمند L7/L12، BLS و bp26 از باکتری *Brosella* شناسایی و در طراحی یک سازه واکسنی از آن‌ها بهره‌گرفته شد. علاوه بر این در سازه معرفی شده در این مطالعه از ادجوانت مولکولی HBHA برای تقویت خاصیت آنتی‌ژنیسیته و همچنین افزایش وزن سازه به منظور جلوگیری از حذف از طریق سیستم فیلتراسیون کلیوی استفاده شد (۲۵). ادجوانت‌ها ترکیباتی هستند که علاوه بر افزایش طول عمر و زنده ماندن آنتی‌ژن‌ها، ایمنی‌زایی علیه آنتی‌ژن‌های تزریق شده را افزایش می‌دهند، همچنین در مواردی با افزایش میل ترکیبی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن، موجب تحریک اختصاصی تر سیستم ایمنی همورال و سلولار می‌شود که می‌تواند موجب کاهش دوز آنتی‌ژن مصرفی در واکسن و در نتیجه کاهش قیمت واکسن شوند (۲۶). HBHA آگونیست مولکول TLR4 است که می‌تواند تولید سیتوکین‌های پیش التهابی و کموکاین‌ها را آغاز کند. امروزه بکارگیری آگونیست‌های TLR4 به عنوان ادجوانت در کارآزمایی‌های بالینی توسعه یافته‌اند (۲۷، ۲۸). استفاده از مولکول HBHA در طراحی انواع واکسن‌های زیر واحدی نسل دوم برای مقابله با طیف وسیعی از پاتوژن‌ها بسیار مورد توجه و استفاده محققین قرار گرفته است (۲۹-۳۲). علاوه بر این، نقطه ایزوالکتریک پروتئین سازه طراحی شده ۸/۳۷ بود که این شاخص از نظر تئوری pH است که

1. Vizcaino N, Cloeckart A, Zygmunt MS, Dubray G. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infection and immunity*. 1996;64(9):3744-51.
2. Moreno E, Cloeckart A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1-4):209-27.
3. Corbel M. Recent advances in brucellosis. *Journal of medical microbiology*. 1997;46(2):101-3.
4. Jaydari A, Nazifi N, Forouharmehr A. Computational design of a novel multi-epitope vaccine against *Coxiella burnetii*. *Human Immunology*. 2020;81(10-11):596-605.
5. Delany I, Rappuoli R, Seib KL. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3:5.
6. Tahamtan A, Charostad J, Shokouh SJH, Barati M. An overview of history, evolution, and manufacturing of various generations of vaccines. *Journal of Archives in Military Medicine*. 2017;5:3.
7. Jorge S, Dellagostin OA. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*. 2017;1(1):6-13.
8. Bachrach G, Banai M, Fishman Y, Bercovier H. Delayed-type hypersensitivity activity of the *Brucella* L7/L12 ribosomal protein depends on posttranslational modification. *Infection and immunity*. 1997;65(1):267-71.
9. Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS. Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS microbiology reviews*. 2010;34(3):379-94.
10. Kazak E, Costa Oliveria S, Goral G, Akalin H, Yilmaz E, Heper Y, et al. *Brucella abortus* L7/L12 recombinant protein induces strong Th1 response in acute brucellosis patients. *Iranian journal of immunology*. 2010;7(3):132-41.
11. Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Velikovskiy CA, de la Barrera S, Bowden R, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infection and immunity*. 2005;73(12):80;88-79.
12. Velikovskiy CA, Goldbaum FA, Cassataro J, Estein S, Bowden RA, Bruno L, et al. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infection and immunity*. 2003;71(10):5750-5.

در آن یک مولکول یا سطح خاص بار الکتریکی خالص ندارد و برای درک پایداری بار پروتئین مفید است (۳۳). از طرفی شاخص آلیفاتیک یک پروتئین به عنوان حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک (آلانین (Ala)، والین (Val)، ایزولوسین (Ile) و لوسین (Leu) تعریف می‌شود. ممکن است به عنوان یک عامل مثبت برای افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌های کروی در نظر گرفته شود (۳۳، ۳۴). شاخص آلیفاتیک برای توالی‌های پروتئینی سازه طراحی شده در این مطالعه ۷۷/۱۰ بود. یک شاخص آلیفاتیک بالا نشان می‌دهد که یک پروتئین در محدوده دمایی وسیعی از حرارت پایدار است. علاوه بر این مقدار GRAVY برای یک پپتید یا پروتئین به عنوان مجموع مقادیر هیدروپاتی تمام اسیدهای آمینه تقسیم بر تعداد باقیمانده‌ها در دنباله محاسبه می‌شود (۳۳). پروتئین مورد بررسی در این مطالعه دارای شاخص‌های GRAVY ۰/۶۱۳- بود. این محدوده کم و منفی شاخص GRAVY، احتمال کروی بودن (آب دوست) پروتئین را به جای غشایی (آب گریز) نشان می‌دهد. این اطلاعات ممکن است برای محلی سازی این پروتئین‌ها مفید باشد (۳۵). از طرفی همانطور که در نتایج این مطالعه ملاحظه می‌شود، پروتئین طراحی شده یک پروتئین غیر آلرژن با امتیاز آنتی ژنیستی مطلوب ۰/۸۲۸۷ شناخته شده است. به طور کلی، آنتی ژنیستی مربوط به توانایی یک آنتی ژن برای تحریک پاسخ‌های ایمنولوژیک طبیعی می‌شود، در حالی که آلرژنیستی یا حساسیت-زایی مربوط به توانایی یک آنتی ژن برای القای پاسخ‌های ایمنی غیر طبیعی است که می‌تواند منجر به آسیب‌های فیزیولوژیکی شود (۳۶). در ادامه ارزیابی سایر خواص فیزیکوشیمیایی سازه طراحی شده، شاخص پایداری برای این پروتئین پیش بینی شد. از آنجا که این شاخص زیر ۴۰ است این پروتئین را یک پروتئین پایدار می‌توان در نظر گرفت (۱۵). بر اساس نتایج ارائه شده در بالا، می‌توان با درصد اطمینان بالایی سازه کایمیریک بر پایه اپی‌توپ را به عنوان یک کاندید امید بخش برای ساخت واکسن‌های زیر واحدی معرفی کرد. البته لازم به ذکر است که برای تکمیل و تایید قوی‌تر نتایج ارائه شده مطالعات *invitro* و *invivo* نیز نیاز می‌باشد

تعارض منافع

نگارنده این مقاله به این وسیله اعلام می‌دارد که در رابطه با نگارش و چاپ مقاله هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

26. Aguilar J, Rodriguez E. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007;25(19):3752-62.
27. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature medicine*. 2007;13:552-559.
28. Jung ID, Jeong SK, Lee C-M, Noh KT, Heo DR, Shin YK, et al. Enhanced efficacy of therapeutic cancer vaccines produced by co-treatment with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin, a novel TLR4 agonist. *Cancer Research*. 2011. 71(24):6811-6819.
29. Rashidian E, Gandabeh ZS, Forouharmehr A, Nazifi N, Shams N, Jaydari A. Immunoinformatics approach to engineer a potent poly-epitope fusion protein vaccine against *Coxiella burnetii*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2020;26:2191-201.
30. Shams N, Forouharmehr A. Assembling the Most Antigenic Peptides of COVID-19 Immunogenic Proteins Along with a Molecular Adjuvant to Develop a Novel Polyepitope Vaccine: a Bioinformatics Investigation. *Vaccine Research*. 2021;8: 36-46.
31. Rashidian E, Forouharmehr A, Nazifi N, Jaydari A, Shams N. Computer-aided design of a novel poly-epitope protein in fusion with an adjuvant as a vaccine candidate against leptospirosis. *Current Proteomics*. 2021;18(2):113-23.
32. Shams N, Shakarami Gandabeh Z, Nazifi N, Forouharmehr A, Jaydari A, Rashidian E. Computational design of different epitope-based vaccines against *Salmonella typhi*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2020;26:1527-39.
33. Walker JM. *The proteomics protocols handbook*: Springer; 2005.
34. Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*. 1980;88(6):1895-8.
35. Enany S. Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*. *Journal of infection and public health*. 2014;7(4):296-307.
36. Zhang J, Tao A. Antigenicity, immunogenicity, allergenicity. *Allergy bioinformatics*. 2015:175-86.
13. Chen X, Zaro JL, Shen W-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(10):1357-69.
14. Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Haghparast A, Behroozikhah MA. Assessment of signal peptides to optimize interleukin 2 (IL-2) folding and expression. *Current Proteomics*. 2019;16(3):188-98.
15. Forouharmehr A, Nassiri M, Ghovvati S, Javadmanesh A. Evaluation of different signal peptides for secretory production of recombinant bovine pancreatic ribonuclease A in gram negative bacterial system: an in silico study. *Current Proteomics*. 2018;15(1):24-33.
1. Lührink J, Sinning I. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1694.
17. Sobolev BN, Olenina LV, Kolesanova EF, Poroikov VV, Archakov AI. Computer design of vaccines: approaches, software tools and informational resources. *Current Computer-Aided Drug Design*. 2005;1(2):207-22.
18. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology*. 2000;3(5):445-50.
19. Tomar N, De RK. Immunoinformatics: an integrated scenario. *Immunology*. 2010;131(2):153-68.
20. Korber B, LaBute M, Yusim K. Immunoinformatics comes of age. *PLoS Computational Biology*. 2006;2(6):e71.
21. Van Regenmortel M, editor *Synthetic peptides versus natural antigens in immunoassays*. *Annales de biologie clinique*; 1993.
22. Tahmoorespur M, Nazifi N, Pirkhezranian Z. In silico prediction of B-cell and T-cell epitopes of protective antigen of *Bacillus anthracis* in development of vaccines against anthrax. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 2017;7(3):429-36.
23. Forouharmehr A, Nazifi N, Mousavi SM, Jaydari A. Designing an efficient epitope-based vaccine conjugated with a molecular adjuvant against Bovine Babesiosis: A computational study. *Process Biochemistry*. 2022;121:170-7.
24. Nazifi N, Mousavi SM, Moradi S, Jaydari A, Jahandar MH, Forouharmehr A. In Silico B Cell and T Cell epitopes evaluation of lipL32 and OmpL1 proteins for designing a recombinant multi-epitope vaccine against leptospirosis. *International Journal of Infection*. 2018;5: (2).
25. Werle M, Bernkop-Schnürch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino acids*. 2006;30:351-6.