Research Paper

Designing a novel multi-epitope peptide vaccine against SARS-Cov-2 using immunoinformatics tool

Shirin Mahmoodi

Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

*** Corresponding author e-mail: shirinm64@gmail.com**

Citation: Mahmoodi Sh. Designing a novel multi-epitope peptide vaccine against SARS-Cov-2 by using immunoinformatics tool. Daneshvar Medicine 2022; 30(4):23-35.
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.15936.1183

Abstract

Background and Objective: Acute Coronavirus Syndrome Virus (SARS-CoV-2) virus first appeared in China and spread rapidly around the world. Due to its wide spread around the world, efforts are needed to provide an effective and safe vaccine against this virus. The virus genome contains a single-stranded RNA molecule that encodes four different structural proteins, among which the virus spike (S) and nucleocapsid (N) proteins play an important role in stimulating the immune system to fight the virus. Multi-epitope peptide vaccines, which include immunogenic epitopes of T and B cells, have received much attention in recent years due to their high specificity. These vaccines were designed using immunoinformatics tools.

Materials and Methods: In this study, the S and N proteins of SARS-CoV-2 were analyzed with the help of bioinformatics servers to identify CD4 and B T cell epitopes. Cholera toxin B subunit and PADRE epitope were used as adjuvants. The components were linked together by peptide linkers and the structural features of the vaccine were predicted, including antigenicity, non-allergenicity, physicochemical properties, secondary and tertiary structures using bioinformatics servers.

Results: According to the results of bioinformatics analysis, the structure has high antigenicity and is not allergenic.

Conclusion: Therefore, the designed structure as a suitable vaccine candidate against SARS-CoV-2 can be examined, although experimental studies are necessary.

Keywords: Acute coronavirus respiratory syndrome virus, Vaccine, Immunoinformatics, Spike, Nucleocapsid

Received: 21 June 2022
Last revised: 26 Sep 2022
Accepted: 10 Oct 2022

مقاله پژوهشی

طراحی یک سازه جدید واکسن مولتی اپی توپ پپتیدی علیه *SARS-CoV-2* با استفاده از ابزار ایمونوانفورماتیک

نویسندگان: شیرین محمودی

گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، فارس، ایران

*نویسنده مسئول: شیرین محمودی **Email: shirinm64@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: ویروس سندرم تنفسی حاد کرونا ویروس (SARS-CoV-2) برای اولین بار در چین ظهور پیدا کرد و به سرعت در سراسر جهان منتشر شد. به دلیل شیوع گسترده آن در سراسر جهان تلاش برای ارائه واکسن موثر و ایمن علیه این ویروس ضروری می باشد. ژنوم این ویروس دارای مولکول RNA تک رشته ای می‌باشد که کدکننده چهار پروتئین ساختاری متفاوت می‌باشد، از میان آنها، پروتئین های اسپایک (S) و نوکلئوکپسید ویروس (N) نقش بسزایی در تحریک سیستم ایمنی در جهت مقابله با ویروس را دارند. واکسن های مولتی اپی توپ پپتیدی که شامل اپی توپ های ایمنی زای سلول های T و B هستند، به دلیل اختصاصیت بالا در سال های اخیر بسیار مورد توجه واقع شده اند. این واکسن ها با استفاده از ابزار ایمونوانفورماتیک طراحی می‌شوند.

مواد و روش ها: در این پژوهش پروتئین های S و N *SARS-CoV-2* با کمک سرورهای بیوانفورماتیک به منظور شناسایی اپی توپ‌های سلول های T CD4 و B آنالیز شدند. از زیر واحد B توکسین کلرا و اپی توپ PADRE به عنوان ادجوانت استفاده شد. اجزای مذکور با لینکرهای پپتیدی به هم متصل شدند و ویژگی های سازه واکسن طراحی شده از جمله آنتی ژنیسیته، عدم آلرژنیسیته، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، ساختار دوم و سوم با استفاده از سرورهای بیوانفورماتیک پیشگویی شد.

نتایج: براساس نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیک سازه مذکور دارای آنتی ژنیسیته بالا بوده و آلرژن نیز نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری: بنابراین سازه طراحی شده به عنوان یک کاندید واکسن مناسب علیه SARS-CoV-2 می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد، هر چند انجام مطالعات آزمایشگاهی ضروری می‌باشد.

واژه های کلیدی: ویروس سندرم تنفسی حاد کرونا، واکسن، ایمونوانفورماتیک، اسپایک، نوکلئوکپسید

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۳۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۸

مقدمه

از اواخر دسامبر سال ۲۰۱۹ ویروس جدید β-*Coronavirus* در شهر ووهان چین شیوع پیدا کرد، این ویروس سندرم تنفسی حاد کرونا ویروس (*SARS-CoV-2*) نامگذاری شد که سبب بروز بیماری میشود که COVID-19 نام دارد (۳-۱). کرونا ویروس ها یک خانواده بزرگ و بسیار متنوع از ویروس های دارای ژنوم RNA تک رشته ای هستند که باعث ایجاد بیماری در انسان و حیوانات می شوند (٦-٤). ژنوم *SARS-CoV-2* نیز از یک تک رشته RNA تشکیل شده است که کدکننده ٤ پروتئین ساختاری متفاوت میباشد. این پروتئین ها شامل Spike (S) ، غشا (M) ، پاکت (E) و نوکلئوکپسید (N) می‌باشند (۷). این ویروس ها با استفاده از گلیکوپروتئین‌های به اصطلاح سنبله ای خود (S)، وارد سلول‌های میزبان شده و تکثیر می‌یابند و مانع عملکرد طبیعی بدن میزبان می‌گردند (۸،۹). بیماری ناشی از ویروس مذکور با سرعت بسیار زیاد سبب بروز همه گیری و مرگ و میر فراوان در سراسر جهان شده است. بیماران مبتلا علائم شایعی همچون خستگی، تب، سرفه خشک، گلودرد و بدن درد را نشان می دهند (۱۰،۱۱). با این حال، برخی از موارد آلوده هیچ علائمی را نشان نمی دهند به طوریکه تقریباً ۸۰٪ افراد آلوده بدون هیچ گونه اقدام درمانی بهبود می یابند (۱۲). بر اساس ناهنجاری‌های بالینی و بیوشیمیایی ناشی از کرونا ویروس و سطح بالایی از بیماری و مرگ و میر، پیشگیری، تشخیص و اقدامات درمانی علیه این بیماری ضروری به نظر می رسد (۱۳). بر اساس توصیه های سازمان بهداشت جهانی مواردی از قبیل استفاده از ماسک، استفاده از داروهای ضد ویروس، رعایت فاصله اجتماعی و استفاده از واکسن به عنوان مهمترین روش های پیشگیری و کنترل بیماری همه گیر COVID-19 در جهان میباشند (۳). استفاده از واکسن های موثر و کارآمد برای مقابله با میکروارگانیسم های بیماری زا دارای سابقه طولانی میباشند، به عنوان مثال کاربرد واکسن‌ها دارای قدمتی حدود ٤۰ سال برای مبارزه و ریشه‌کنی فلج اطفال و ۵ سال برای مقابله با ابولا میباشد (۱،۱۳،۱٤). بر اساس مطالعات انجام شده و شواهد علمی، واکسن‌های ضعیف شده با ایمنی طولانی مدت به دلیل دارا بودن گیرنده‌های Toll-Like Receptor (TLR)، پاسخ‌های ایمنی ذاتی، سلولی و هومورال را به صورت موثر تحریک می کنند. عیب اصلی این واکسن ها هزینه بر بودن آنها است. واکسن های ویروسی غیرفعال که به سرعت تولید می شوند، پاسخ ایمنی سلولی را به صورت ضعیف تحریک می کنند. واکسن‌های زیر واحدی ایمن هستند اما مهمترین معایب آنها ایمنی زایی پایین و در نتیجه نیاز به تقویت کننده برای ایمنی طولانی مدت و هزینه زیاد آنها می‌باشد. واکسن‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک که تنها بر اساس اطلاعات توالی آنتی ژنیک مربوطه تولید شده اند، شامل توالی DNA یا mRNA از آنتی‌ژن‌ها هستند که در صورت استفاده در دوزهای مختلف، پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال را به شدت تحریک می کنند (۲،۱٤). واکسن‌های پیشگیری‌کننده از عفونت نویدبخش‌ترین روش برای مهار همه‌گیری کرونا می‌باشند. بنابراین تلاش برای ارائه واکسن موثر و ایمن در جهت مقابله با این ویروس بسیار ضروری میباشد. در پایان سال ۲۰۲۰، چندین واکسن برای استفاده در مناطق مختلف جهان در دسترس قرار گرفت، تجویز اولین واکسن های *SARS-CoV-2* در دسامبر ۲۰۲۰ آغاز شد و تاکنون بیش از ٤۰ واکسن کاندید در آزمایش‌های انسانی و بیش از ۱۵۰ مورد در آزمایش‌های بالینی قرار گرفته‌اند. سازمان بهداشت جهانی لیست به روز شده ای از کاندیدهای واکسن تحت ارزیابی را نگه می دارد (۱۵). شش واکسن حداقل توسط یک کشور تأیید شده اند: دو واکسن مبتنی بر mRNA شامل فایزر-BNT162b2) BioNTech/Pfizer) و مدرنا-mRNA-1273) Moderna)، سه واکسن ضد ویروسی شامل اسپوتنیک (Sputnik V-Gamaleya)، آسترازینکا (AZD1222-Oxford/AstraZeneca) و کوویشیلد (Covishield-Serum Institute of india) و یک واکسن غیرفعال بنام سینوفارم-BBIBP-CorV) Sinopharm). تا به امروز، فقط واکسن های مبتنی بر mRNA توسط FDA و EMA تأیید شده اند (۱٦). اخیرا واکسن های مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی که شامل اپی‌توپ‌های T CD4، T CD8 و سلول‌های B هستند، به عنوان یکی از

مهم‌ترین انواع واکسن ها جهت مقابله با انواع ارگانیسم‌های بیماری زا مورد توجه واقع شده اند. دانش ایمنوانفورماتیک به عنوان یک زیر مجموعه از بیوانفورماتیک به طراحی و توسعه این قبیل واکسن‌ها کمک بسزایی نموده است که سبب صرفه جویی در زمان و هزینه می‌شود. اختصاصیت بالا و پایداری در شرایط مختلف به عنوان اصلی ترین مزایای واکسن های مولتی اپی توپ شناخته شده اند ولی ایمنی زایی پایین یکی از معایب این واکسن ها میباشد. به منظور غلبه بر این مشکل ادجوانت ها در ساختار این واکسن ها به کاربرده میشوند. زیر واحد B توکسین کلرا به عنوان یک ادجوانت موثر در ساختار بسیاری از واکسن های مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی به کار گرفته می‌شود. این زیر واحد جز غیر سمی توکسین کلرا باکتری *Vibrio cholerae* میباشد. به دلیل میل ترکیبی بالا جهت اتصال به سلول های monosialotetrahexosylganglioside (GM1) که به میزان زیاد در انواع سلول ها شامل سلول های اپیتلیال روده، سلول های عرضه کننده آنتی ژن ، سلول های B و ماکروفاژها توزیع شده اند، این ساختار به میزان بسیار موثری می‌تواند در دسترس سلول های سیستم ایمنی قرار گیرد. بنابراین به همراه آنتی ژن های مختلف میتواند به عنوان ادجوانت موثر سبب تحریک سیستم ایمنی و همچنین تقویت پاسخ سیستم ایمنی سلولی و هومورال شود؛ علاوه بر این، این ساختار میتواند سبب تحویل آنتی‌ژن ها به سلول های عرضه کننده آنتی ژن شود و به عنوان ادجوانت جهت استفاده در واکسن های انسانی توسط اروپا و کانادا تایید شده است (۱۷). در نظر گرفتن موثرترین و ایمنی زا ترین جز پاتوژن به عنوان یکی از موارد بسیار مهم در تولید واکسن علیه یک پاتوژن میباشد که در انتخاب بهترین اهداف آنتی ژنیک باید توجه داشت که شامل موثرترین و قوی ترین اپی توپ های سلول T و B برای تحریک ایمنی سلولی و هومورال باشند (۱۸،۱۹)، که به منظور تحقق این هدف آگاهی از ساختار پروتئین‌های آنتی ژنیک و مسیر بیماری زایی میکروارگانیسم پاتوژن بسیار ضروری می‌باشد. *SARS-CoV-2* برای اتصال به سلول های میزبان از پروتئین S استفاده می‌کند که این پروتئین شامل دو زیر واحد S1 و S2 میباشد، زیر واحد S1 دارای یک بخش به نام دمین متصل شونده به گیرنده (RDB) Receptor Binding Domain می‌باشد که این زیر واحد بسیار ایمونوژن می‌باشد و به همین دلیل در بسیاری از مطالعات مربوط به تولید واکسن‌های مبتنی بر اسیدنوکلئیک و سایر انواع واکسن‌ها به عنوان آنتی ژن کاندید در نظر گرفته شده است. همچنین در ساختار بسیاری از واکسن‌های مولتی اپی‌توپ‌پپتیدی علیه ویروس کرونا جهت شناسایی اپی‌توپ‌های غالب ایمنی زا با استفاده از سرورهای متعدد ایمونوانفورماتیک مورد آنالیز قرار گرفته‌اند (۲۱،۲۰). همچنین پروتئین N این ویروس بسیار حفاظت شده و ایمونوژن می‌باشد. این پروتئین در بسته بندی ژنوم ویروس درون ریبونوکلئوکپسید نقش دارد و بخش میانی و انتهای C آن در ایجاد آنتی بادی علیه ویروس نقش دارد که به دلیل آنتی ژنیسیته و غیرآلرژن بودن آن سبب ایجاد پاسخ ایمنی بدون ایجاد عارضه جانبی می‌شود، بنابراین به عنوان یک آنتی‌ژن کاندید مناسب جهت طراحی واکسن علیه ویروس مذکور می‌تواند به کار رود (۲۲،۲۳). بر اساس مطالعات پیشین Pan HLA DR-binding Epitope (PADRE) به عنوان یک پپتید غیرطبیعی با میل ترکیبی بالا به اکثریت موارد HLA-DR که تا به امروز ارزیابی شده اند و همچنین به $I\text{-}A^b$ موشی متصل میشود که ارزیابی ایمنی زایی آن نشان داده است میتواند به عنوان یک اپی‌توپ T helper در ساختار واکسن های مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی به منظور تحریک موثر پاسخ سیستم ایمنی به کار برده شود (۲۷-۲٤).

هدف از این مطالعه طراحی یک سازه جدید واکسن مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی علیه ویروس کرونا با استفاده از ابزار ایمونوانفورماتیک میباشد که در ساختار این واکسن اپی‌توپ‌های غالب ایمنی‌زا از پروتئین‌های اسپایک و نوکلئوکپسید ویروس انتخاب شده اند، همچنین از توالی اپی‌توپ PADRE به منظور تحریک موثر سیستم ایمنی و از زیر واحد B توکسین کلرا به عنوان یک ادجوانت طبیعی در ساختار این واکسن استفاده خواهد شد.

مواد و روش‌ها

گرفتن توالی آمینواسیدی پروتئین های هدف و ارزیابی آن ها

ابتدا توالی آمینواسیدی پروتئین های اسپایک (S) با شماره دسترسی A0A679G9E9 و پروتئین نوکلئوکپسید (N) با شماره دسترسی A0A6C0T6Z7 و زیر واحد B توکسین کلرا به شماره دسترسی (P01556) از پایگاه اطلاعات پروتئینی UniProt به آدرس http://www.uniprot.org/ گرفته شد (۲۸).

پیش بینی اپی توپ ها

اپی توپ های اختصاصی که به MHC کلاس II متصل شده و سبب ایجاد پاسخ اختصاصی T CD4+ میشوند، از طریق واردکردن توالی آمینواسیدی هر دو پروتئین N و S در سرور IEDB به آدرس http://tools.iedb.org/mhci/ پیش‌بینی شدند (۲۹). آلل های انتخابی در سرور IEDB شامل : H2-IAb، H2-IAd و H2-AS بودند. سرور IEDB با استفاده از چهار روش مختلف شامل یکسانی، ستورنیولو، ماتریکس پایدارشده و اتصال نسبی میانگین، اپی توپ ها را پیش بینی می کند که این روش ها براساس خصوصیات توالی آمینواسیدها و مقایسه آنها با اپی‌توپ‌های شناخته شده، اپی‌توپ‌های موجود در توالی داده شده به سرور را ارزیابی می کنند.

انتخاب اپی توپ ها

ابتدا نتایج آلل های هر کدام از پروتئین های ویروس شامل پروتئین N و پروتئین S حاصل از سرور مذکور، وارد فایل های مجزای Excel گردیده و نواحی هم پوشانی اپی توپ های آلل های هر پروتئین تعیین گردیدند که هدف از این مرحله شناسایی اپیتوپ‌های اختصاصی MHC II با بیشترین میزان ایمنی زایی می‌باشد.

شناسایی اپی توپ های خطی سلول B

به منظور پیش بینی اپی توپ های خطی پروتئین های S و N ویروس کرونا از دو سرور استفاده شد، ابتدا توالی این پروتئین‌ها به طور جداگانه به سرور ABCpred به آدرس http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ ارسال شد. سرور ABCpred با استفاده از روش شبکه عصبی مصنوعی (ANN) و با صحت ۶۵/۹۳٪ اپی‌توپ‌های خطی را پیش بینی می‌کند (۳۰).

همچنین توالی پروتئین های مذکور به سرور BepiPred به آدرس http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/ برای پیشگویی اپی توپ های خطی سلول B ارسال شد که این سرور پیش گویی اپی توپ ها را با استفاده از ۲ روش Hidden Markov Model (MMH) و Propensity Scale Method (PSM) انجام میدهد (۳۱). سپس نواحی مشترک حاصل از شناسایی اپی‌توپ‌های سلول B به عنوان اپی توپ های نهایی سلول B شناسایی شدند.

طراحی سازه

اپی‌توپ‌های شناسایی شده سلول‌های T CD4 و سلول‌های B هر یک از پروتئین‌های N و S حاصل از مراحل قبل توسط لینکرهای مناسب پپتیدی که شامل موتیف‌های کوتاه اسیدهای آمینه هستند، شامل توالی‌های KK و GPGPG به یکدیگر متصل شدند. توالی پروتئین فلاژلین به عنوان ادجوانت توسط لینکر EAAAK به سازه وصل شد.

ارزیابی خصوصیات سازه پروتئینی طراحی شده

ارزیابی آنتی ژنیسیته

به منظور ارزیابی آنتی ژنیسیته سازه واکسن طراحی شده از دو سرور استفاده شد. سرور اول ANTIGENpro (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/) که آنتی ژنیسیته پروتئین را براساس آنالیزهای میکرو اری های قبلی از پروتئین با صحت ۷۵/۵۱ درصد پیش بینی می کند. ANTIGENpro نرم افزاری مستقل از پاتوژن و مبتنی بر همراستاسازی توالی هاست (۳۲). سرور دوم مورد استفاده، Vaxijenv2.0 سروری که آنتی ژنیسیته پروتئین را براساس ارگانیسم هدف (ویروس، باکتری، تومور) و مستقل از همراستاسازی با صحت ۷۰ تا ۸۹ درصد پیش بینی می نماید (۳۳).

ارزیابی آلرژنیسیته و حلالیت

توسط دو سرور AlgPred به آدرس http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/ (34) و AllerTOP به آدرس https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/method.html (35)، آلرژنیسیته ی سازه ی واکسنی مورد سنجش قرار گرفت. سرور AlgPred از ترکیب روش های مختلفی از قبیل

SVM، blast، mast وIgEpitope جهت افزایش صحت پیش بینی آلرژنیسیته استفاده می کند در حالی که سرور AllerTOP بر اساس روش Auto Cross Covariance (ACC) عمل می کند. حلالیت سازه در بیان بالا نیز توسط سرور Solpro به آدرس http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/ مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۶).

ارزیابی ویژگی های فیزیکوشیمیایی

با استفاده از ابزار ProtParam به آدرس http://web.expasy.org/protparam ویژگی های مختلف فیزیکوشیمیایی سازه واکسن طراحی شده از قبیل وزن ملکولی، شاخص ناپایداری، نیمه عمر، pH ایزوالکتریک تئوریک و شمار آمینواسیدهای دارای بار مثبت و منفی محاسبه شد (۳۷).

تعیین ساختار دوم و سوم سازه واکسن طراحی شده

به منظور تعیین ساختار دوم سازه واکسن پپتیدی از سرور GOR4 به آدرس https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html استفاده شد (۳۸). همچنین تعیین ساختار سوم واکسن طراحی شده توسط سرور ITASSER به آدرس https://zhanggroup.org/I-TASSER انجام شد. به این منظور توالی اولیه سازه واکسن طراحی شده به هر یک از سرورهای مذکور ارسال شد (۳۹).

کلونینگ درون رایانه ای

به منظور آماده‌سازی سازه واکسن طراحی شده، جهت ورود در وکتور مناسب، دو فرآیند ترجمه معکوس و بهینه سازی کدون انجام شد. فرآیند ترجمه معکوس، به منظور تبدیل توالی آمینواسید به توالی نوکلئوتیدی هم راستا با E.coli DNA و دستیابی به بهترین سطح بیان، توسط سرور JCAT به آدرس http://www.jcat.de انجام شد (۴۰). سپس به منظور بررسی شاخص هایی از جمله سازگاری کدونی، محتوای نوکلئوتید سیتوزین-گوانین و توزیع فراوانی کدونی از GenScript Rare Codon AnalysisTool به آدرس https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis استفاده شد.

نتایج

طراحی واکسن

توالی ۳ پروتئین شامل پروتئین اسپایک (S) ویروس کرونا به طول ۱۲۷۳، پروتئین نوکلئوکپسید (N) به طول ۴۱۹ و زیرواحد B توکسین کلرا به طول ۱۲۴ اسیدآمینه انتخاب شدند.

پیش بینی اپی توپ های MHC II

نتایج حاصل از پیشگویی اپی توپ های MHC II توسط سرور IEDB نشان داد که هر یک از پروتئین های S و N ویروس کرونا دارای تعداد قابل توجهی اپی‌توپ ایمنی‌زا با میل ترکیبی متفاوت جهت اتصال به MHC II می‌باشند که از میان آنها ۲ اپی‌توپ با بیشترین میزان اتصال، جهت استفاده در ساختار واکسن انتخاب شده اند که این نتایج در جدول ۱ نشان داده شده اند.

جدول ۱. پپتیدهای انتخابی باند شونده MHC-II از پروتئین‌های اسپایک و نوکلئوکپسید ویروس کرونا توسط سرور IEDB

نام پروتئین	توالی پپتید باند شونده	نقطه شروع- پایان	Percentile Rank
اسپایک	LTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVF	۱۸-۴۳	۱/۵۰
	VLHSTQDLFLPFFS	۴۷-۶۰	۰/۳۵
نوکلئوکپسید	MSDNGPQNQRNAPRI	۱-۱۵	۰/۲۹
	DSTGSNQNGERSGARS	۲۲-۳۷	۱/۰۳

Percentile rank کمتر= اتصال بهتر

پیش گویی اپی توپ های سلول B

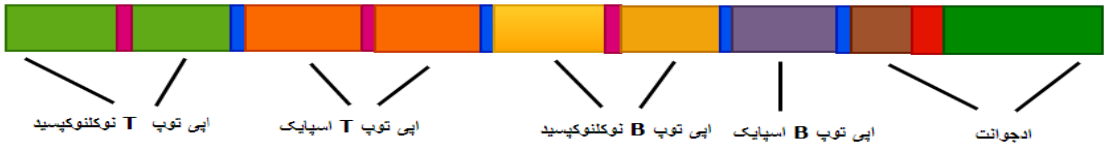
نتایج حاصل از پیش گویی اپی‌توپ‌های سلول B از پروتئین‌های S و N ویروس کرونا توسط سرورهای ABCpred و Bepipred نشان داد که پروتئین‌های مذکور دارای تعداد قابل توجهی اپی‌توپ سلول B می‌باشند که در نهایت از میان آنها اپی‌توپ‌های مشترک پیش‌بینی‌شده توسط دو سرور با بیشترین میزان اختصاصیت انتخاب شدند، بر این اساس از پروتئین S یک اپی توپ و از پروتئین N، 3 اپی توپ انتخاب شد که این نتایج به ترتیب در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. اپی توپ های انتخابی باند شونده سلول B از پروتئین اسپایک و نوکلئوکپسید ویروس کرونا توسط سرور Bepipred و ABCpred

اپی توپ	نقطه ی شروع- پایان	آنتی ژن
CVNLTTRTQLPPAYTNSFTRG	۱۵-۳۵	اسپایک
ERSGARSKQRRPQGLP DQIGYYRRATRRI	۳۱-٤٦ ۸۲-۹٤	نوکلئوکپسید

طراحی سازه

با قراردادن اپی توپ های شناسایی شده سلول‌های T و سلول B در کنار هم توسط لینکرهای مناسب و استفاده از ادجوانت زیر واحد B توکسین کلرا و همچنین توالی اپی‌توپ PADRE سازه واکسن نهایی طراحی شد. تصویر سازه واکسن طراحی شده در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. تصویر شماتیک سازه واکسن مولتی اپی توپ طراحی شده، به ترتیب شامل اپی توپ های سلول T و B انتخاب شده از پروتئین های نوکلئوکپسید و اسپایک ویروس کرونا ، ادجوانت های PADRE و زیر واحد Bتوکسین کلرا که اجزای مذکور توسط لینکرهای مناسب پپتیدی به هم متصل شده اند. لینکر GPGPG با رنگ صورتی و لینکرهای KK با رنگ آبی در تصویر نشان داده شده است. برای اتصال زیر واحد Bتوکسین کلرا به سازه طراحی شده از لینکرEAAAK استفاده شده که با رنگ قرمز در تصویر نشان داده شده است.

ویژگی های فیزیکی و شیمیایی، آلرژنیسیته، آنتی ژنیسیته و حلالیت سازه واکسن طراحی شده

ویژگی‌های متعدد فیزیکوشیمیایی سازه واکسن طراحی شده به کمک ابزارProtParam شناسایی شد، سازه‌ی نهایی به طول ۲۸۷ آمینواسید و وزن ملکولی ۳۱۸٤۳ دالتون دارای شاخص ناپایداری ۳۷/۹۷ می‌باشد. نتایج ارزیابی‌های ایمنوانفورماتیک توسط سرورهای مرتبط نشان داد که سازه‌ی نهایی ایمنوژن، غیرآلرژن و انحلال پذیر می‌باشد که نتایج حاصل از سرورهای مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است.

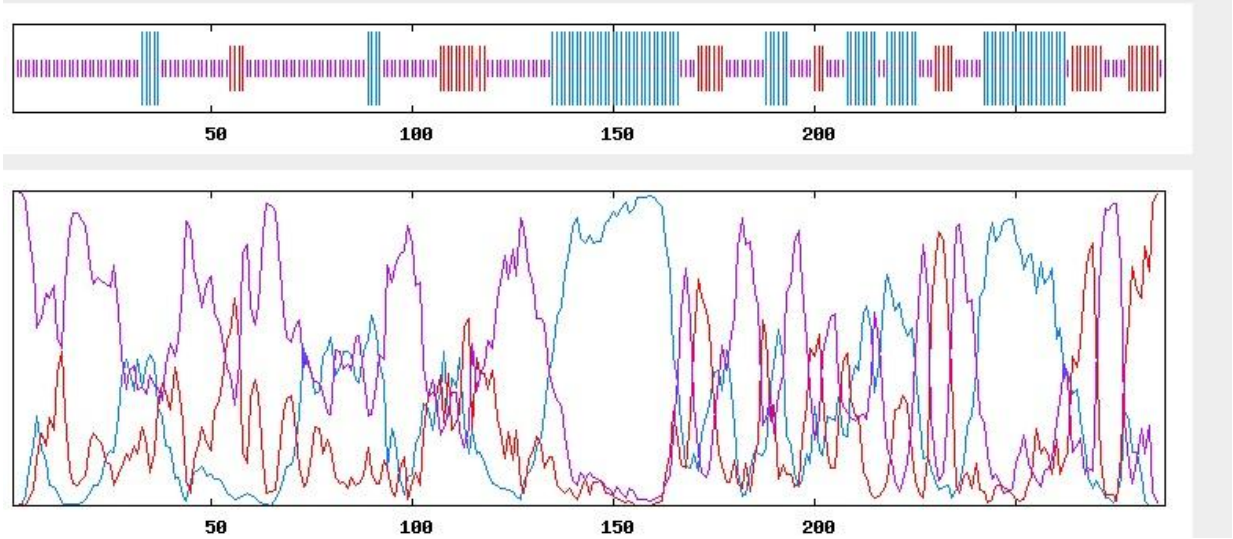
جدول ۳. ویژگی های سازه واکسن طراحی شده شامل خصوصیات فیزیکوشیمیایی، آنتی ژنیسیته، آلرژنیسیته و حلالیت

نتیجه	ویژگی
۲۸۷	تعداد اسیدهای آمینه
دالتون۳۱۸٤۳	وزن مولکولی
۱۰/۱٦	**pI** تئوریک
۱۹ ٤٥	**(Asp + Glu)** تعداد اسیدهای آمینه با بار منفی **(Arg + Lys)** تعداد اسیدهای آمینه با بار مثبت
	نیمه عمر تخمین زده شده برحسب ساعت
۳۰	**(in vitro,** رتیکولوسیت پستانداران)
>۲۰	**(in vivo,** مخمر)
>۱۰	**(Escherichia coli, in vivo)**
۳۷/۹۷	**(II)** شاخص ناپایداری
٦٦/٦٤	شاخص آلیفاتیک
-۰/۵۹۲	**Grand average of hydropathicity (GRAVY)**
Vaxijen:۰ /٦۳ **ANTIGENpro**:۰/۹۳	آنتی ژنیسیته
AlgPred غیرآلرژن **AllerTOP**	آلرژنیسیته

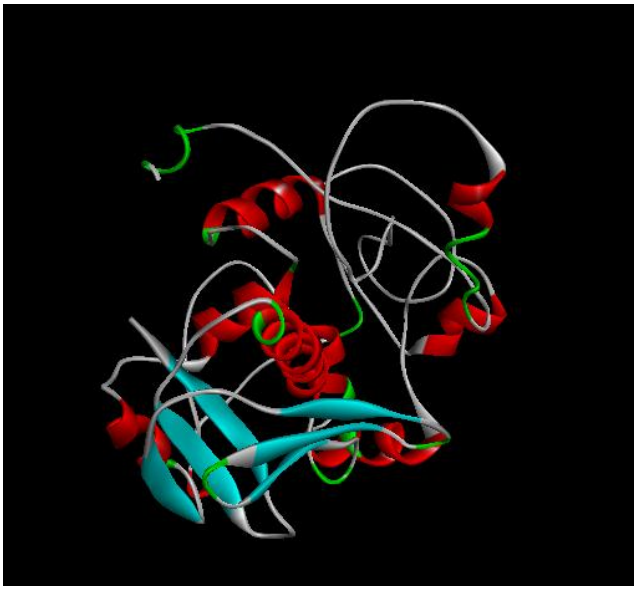
تعیین ساختار دوم و سوم سازه واکسن طراحی شده

نتایج حاصل از تعیین ساختار دوم و سوم سازه واکسن طراحی شده به ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

```
GOR4 :
  Alpha helix      (Hh) :    84 is  29.27%
  3₁₀ helix        (Gg) :     0 is   0.00%
  Pi helix         (Ii) :     0 is   0.00%
  Beta bridge      (Bb) :     0 is   0.00%
  Extended strand  (Ee) :    46 is  16.03%
  Beta turn        (Tt) :     0 is   0.00%
  Bend region      (Ss) :     0 is   0.00%
  Random coil      (Cc) :   157 is  54.70%
  Ambiguous states (?)  :     0 is   0.00%
  Other states          :     0 is   0.00%
```



شکل ۲. تصویر مربوط به ساختار دوم سازه واکسن مولتی اپی توپ پپتیدی که توسط سرور **GOR** پیش بینی شده است. درصد نواحی آلفا هلیکس، بتا و..... در تصویر نشان داده شده است.



شکل ۳. مدل ۳ بعدی پیش بینی شده سازه واکسن طراحی شده توسط سرور **ITASSER**

کلونینگ درون رایانه ای

بعد از انجام ترجمه معکوس، توالی نوکلئوتیدی حاصل مورد بهینه سازی کدون قرار گرفت. نتایج حاصل از ابزار مربوطه در پارامتر Codon Adaptation Index برابر با ۰/۸۵، در حالی که CAI بیشتر از ۰/۸ جهت بیان در ارگانیسم بیانی مورد نظر مناسب می باشد، میانگین محتوای نوکلئوتیدهای GC برابر با ۵۰/۹۸ است. اعداد Negative CIS elements و Negative repeat elements نیز به ترتیب ۰ و ۳ می‌باشد. کدون هایی با مقدار CFD یا توزیع فروانی کدون‌ها، کمتر از ۳۰ احتمال مختل کردن کارآیی بیان را دارند و در این جا درصد CFD پایین (کمتر از ۳۰٪) برابر با صفر است.

بحث

پاندمی کووید ۱۹ سبب ایجاد مرگ و میر فراوان در جهان شده است که این موضوع نگرانی های زیادی را سبب شده است. ضروری‌ترین اقدام برای کنترل این پاندمی تلاش برای توسعه و ارائه واکسن های ایمن و موثر علیه ویروس کرونا میباشد. به همین دلیل از اوایل شیوع این ویروس تیم‌های مختلف تحقیقاتی و شرکت های داروسازی در سراسر جهان تلاش برای ساخت واکسن علیه این ویروس را آغاز نموده که این تلاش ها همچنان نیز ادامه دارند (۱). اخیرا استفاده از تکنولوژی واکسن شناسی معکوس برای شناسایی اپی‌توپ‌های یک آنتی‌ژن به منظور توسعه واکسن‌های مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی علیه انواع مختلف پاتوژن‌ها بسیار مورد توجه واقع شده است که در ماه‌های اخیر محققان مختلف با به کارگیری این تکنولوژی سازه های متنوعی از واکسن های مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی را با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک علیه ویروس کرونا طراحی نموده اند (۷،۲۰،۲۱).

صنمی و همکاران در سال ۲۰۲۰ پروتئین اسپایک (S) ویروس کرونا را با استفاده از سرورهای متعدد ایمونوانفورماتیک به منظور شناسایی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T مورد آنالیز قرار دادند (۲۰). در مطالعه دیگری که در همان سال توسط احمد و همکاران انجام شد، پروتئین غیرساختاری ۸ (NSP 8)، پروتئیناز lik-3c و پروتئین S ویروس کرونا از طریق ابزارهای ایمونوانفورماتیک مورد ارزیابی قرار گرفت که سبب شناسایی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T شد. به منظور تحریک موثر سیستم ایمنی از زیرواحد B توکسین کلرا به عنوان ادجوانت در ساختار سازه واکسن طراحی شده استفاده شد (٤١). در مطالعه حاضر براساس مطالعات گذشته (۲۰،۲۲)، پروتئین های ساختاری ویروس کرونا شامل پروتئین های S و نوکلئوکپسید) (N به عنوان آنتی‌ژن‌های هدف جهت شناسایی اپی توپ های سلول‌های B و T توسط سرورهای بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفتند. پروتئین S ویروس کرونا یک ایمونوژن بسیار قوی میباشد که نقش اساسی در ورود ویروس به سلول میزبان را دارد. همچنین پروتئین N بسیار حفاظت شده می‌باشد که در پیچیده شدن ژنوم ویروس درون کپسید نقش دارد و بسیار ایمونوژن نیز می‌باشد. این پروتئین میتواند به عنوان یک هدف برای تست تشخیص آنتی ژن نیز به کار گرفته شود و اخیرا آنتی بادی مونوکلونال که به اپی توپ های سطح خارجی پروتئین N متصل میشود، تولید شده است که جهت تست تشخیص سریع آنتی ژن ویروس COVID-19 می‌تواند به کار رود (٤٢). بنابراین ۲ پروتئین مذکور به عنوان اهداف مناسبی جهت طراحی واکسن علیه ویروس کرونا میباشند (۲۱،۲۲)، نتایج آنالیزهای ایمونوانفورماتیک منجر به شناسایی اپی‌توپ‌های B و T در ساختار دو پروتئین مذکور شد که در بخش نتایج ذکر شده‌اند. به دلیل ایمنی زایی ضعیف واکسن های مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی وجود یک ادجوانت جهت تحریک و تعدیل پاسخ سیستم ایمنی ضروری میباشد (٤٣)، به این منظور زیرواحد B توکسین کلرا به همراه توالی اپی‌توپ PADRE که نقش ادجوانتی آنها در مطالعات پیشین تایید شده (٤٤،١٧)، به عنوان یک ادجوانت طبیعی در ساختار واکسن استفاده شد. در حالی که در پژوهش انجام شده توسط یزدانی و همکاران از فلاژلین به همراه پروتئین های بتا دفنسین ۳ و Hp-91 به عنوان ادجوانت برای استفاده در ساختار واکسن مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی علیه ویروس کرونا استفاده شد. همچنین در این مطالعه پروتئین های S، N، غشایی(M) و پوششی (E) به عنوان آنتی ژن‌های هدف برای طراحی واکسن مورد آنالیز قرار گرفتند که میزان آنتی ژنیسیته این سازه، در مقایسه با سازه طراحی شده در

پژوهش حاضر کمتر میباشد (٤٥) همچنین در پژوهش انجام شده توسط Devi و همکاران در سال ۲۰۲۱ از پروتئین زیرواحد S 50 ریبوزومی L7/L12 به عنوان ادجوانت در سازه واکسن چند اپی توپی پپتیدی طراحی شده علیه کرونا ویروس استفاده شد (۱۷). توالی PADRE به عنوان یک اپی‌توپ عمومی تحریک کننده پاسخ T-helper می‌باشد که در مجاورت با ادجوانت سبب افزایش پاسخ سیستم ایمنی می‌شود، بنابراین این توالی در ساختار واکسن‌های مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی جهت تحریک موثر سیستم ایمنی به کار می‌رود، Rahman و همکاران نیز در طراحی یک سازه واکسن مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی علیه COVID-19 در سال ۲۰۲۰ از این توالی استفاده نموده اند (٤٦،٤٧). به این دلیل در سازه واکسن طراحی شده در این پژوهش نیز از این توالی استفاده شده است. اخیرا به منظور شناسایی اپی‌توپ‌های ایمونوژن از پروتئین‌های ویروس کرونا علاوه بر مطالعات بیوانفورماتیک، مطالعات آزمایشگاهی نیز صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط Musico و همکاران در سال ۲۰۲۰ صورت گرفت. نمونه‌های سرم جمع‌آوری شده از ۵۰ فرد مبتلا به COVID-19 به منظور شناسایی اپی‌توپ های خطی سلول B توسط تکنیک Micro array مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج حاصل یک اپی‌توپ از پروتئین N در ناحیه ۱۵۵–۷۱ قرار دارد، از آنجا که یکی از اپی توپ های سلول B در مطالعه حاضر نیز توسط ابزار بیوانفورماتیک در ناحیه ۹٤–۸۲ پیش بینی شد، مقایسه این نتایج دقت پیش‌بینی بیوانفورماتیک را در مطالعه حاضر تا حدودی تایید می‌نماید (٤٨). در مطالعه دیگری که توسط Zhang و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد در بررسی سرم بیماران مبتلا به COVID-19، 9 اپی‌توپ خطی سلول B از پروتئین S شناسایی شد که یکی از آنها در ناحیه ٤٥–۲۱ قرار دارد (٤٩)، در حالی که در مطالعه حاضر از میان اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده توسط سرورهای بیوانفورماتیک اختصاصی‌ترین اپی‌توپ خطی سلول B از پروتئین مذکور که جهت استفاده در ساختار سازه واکسن طراحی شده انتخاب شد در ناحیه ۳۵–۱۵ قرار دارد که این نتایج صحت و دقت پیش‌گویی‌های بیوانفورماتیک را در مطالعه حاضر تا حد زیادی تایید می‌نماید. همچنین در پژوهش آزمایشگاهی دیگری که توسط Yang Li و همکاران در سال ۲۰۲۰ به منظور شناسایی اپی‌توپ‌های خطی محرک تولید آنتی بادی پروتئین S با استفاده از Micro array انجام شد، بر اساس نتایج حاصل تعدادی اپی توپ شناسایی شد که یکی از آنها در دمین انتهای C این پروتئین در ناحیه ۹۳–۱ واقع شده است که آنتی بادی تولیدی علیه این بخش دارای فعالیت خنثی‌کنندگی میباشد، این ناحیه با نتایج شناسایی اپی‌توپ‌های خطی سلول B (35-15) توسط ابزار بیوانفورماتیک در پژوهش حاضر مطابقت دارد (۵۰).

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر یک سازه جدید واکسن مولتی‌اپی‌توپ‌پپتیدی علیه ویروس کرونا طراحی شد که بر اساس نتایج بیوانفورماتیک دارای آنتی ژنیسیته بالا، پایداری و حلالیت مناسب بوده و همچنین غیرآلرژن نیز می‌باشد، بنابراین می‌تواند به عنوان یک واکسن کاندید مناسب، جهت مقابله با عفونت ناشی از ویروس کرونا به کار رود ولی به منظور تایید نتایج بیوانفورماتیک انجام مطالعات سنجش ایمنی زایی در مدل‌های حیوانی بسیار ضروری می‌باشد.

تعارض منافع

نویسنده مقاله اعلام می‌دارد که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

منابع

1. Wibawa T. COVID-19 vaccine research and development: ethical issues. Tropical Medicine & International Health 2021;26(1):14-9.
2. Su S, Du L, Jiang S. Learning from the past: development of safe and effective COVID-19 vaccines. Nature Reviews Microbiology 2021;19(3):211-9.
3. Sharma O, Sultan AA, Ding H, Triggle CR. A Review of the Progress and Challenges of Developing a Vaccine for COVID-19. Frontiers in Immunology 2020;11:2413.
4. Singh S, Singh R, Singh K, Singh V, Malik Y, Kamdi B, et al. Immunohistochemical and molecular detection of natural cases of bovine rotavirus and coronavirus infection causing enteritis in dairy calves. Microbial Pathogenesis 2020;138:103814.
5. Shen M, Zhou Y, Ye J, Al-Maskri AAA, Kang Y, Zeng S, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. Journal of Pharmaceutical Analysis 2020;10(2):97-101.
6. Muhammad S, Long X, Salman M. COVID-19 pandemic and environmental pollution: A blessing in disguise? Science of the total environment. 2020;728:138820.
7. He J, Tao H, Yan Y, Huang S-Y, Xiao Y. Molecular mechanism of evolution and human infection with SARS-CoV-2. Viruses 2020;12(4):428.
8. Das O, Neisiany RE, Capezza AJ, Hedenqvist MS, Försth M, Xu Q, et al. The need for fully bio-based facemasks to counter coronavirus outbreaks: A perspective. Science of the Total Environment 2020;736:139611.
9. Saadat S, Rawtani D, Hussain CM. Environmental perspective of COVID-19. Science of the Total Environment 2020;728:138870.
10. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. Tropical Medicine & International Health 2020;25(3):278.
11. Heller L, Mota CR, Greco DB. COVID-19 faecal-oral transmission: Are we asking the right questions? Science of the Total Environment 2020;729:138919.
12. Mohammed M, Syamsudin H, Al-Zubaidi S, AKS RR, Yusuf E. Novel COVID-19 detection and diagnosis system using IOT based smart helmet. International Journal of Psychosocial Rehabilitation 2020;24(7):2296-303.
13. Horowitz RI, Freeman PR. Three novel prevention, diagnostic, and treatment options for COVID-19 urgently necessitating controlled randomized trials. Medical Hypotheses 2020;143:109851.
14. Koirala A, Joo YJ, Khatami A, Chiu C, Britton PN. Vaccines for COVID-19: The current state of play. Paediatric Respiratory Reviews 2020;35:43-9.
15. McIntosh K, Hirsch M, Bloom A. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, virology, and prevention. Lancet Infectious Diseases 2020;1:2019-20.
16. Scarabel L, Guardascione M, Dal Bo M, Toffoli G. Pharmacological strategies to prevent SARS-CoV-2 infection and to treat the early phases of COVID-19 disease. International Journal of Infectious Diseases 2021.
17. Stratmann T. Cholera toxin subunit B as adjuvant—an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity. Vaccines 2015;3(3):579-96.
18. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. The Lancet 2020;395(10224):565-74.
19. Rueckert C, Guzmán CA. Vaccines: from empirical development to rational design. PLoS Pathogens 2012;8(11):e1003001.
20. Sanami S, Zandi M, Pourhossein B, Mobini G-R, Safaei M, Abed A, et al. Design of a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2 using immunoinformatics approach. International Journal of Biological Macromolecules 2020;164:871-83.
21. Naz A, Shahid F, Butt TT, Awan FM, Ali A, Malik A. Designing multi-epitope vaccines to combat emerging coronavirus disease 2019 (COVID-19) by employing immuno-informatics approach. Frontiers in Immunology 2020;11:1663.

22. Kumar J, Qureshi R, Sagurthi SR, Qureshi IA. Designing of nucleocapsid protein based novel multi-epitope vaccine against SARS-COV-2 using immunoinformatics approach. International Journal of Peptide Research and Therapeutics 2021;27(2):941-56.
23. McBride R, Van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. Viruses 2014;6(8):2991-3018.
24. Alexander J, Fikes J, Hoffman S, Franke E, Sacci J, Appella E, et al. The optimization of helper T lymphocyte (HTL) function in vaccine development. Immunologic Research 1998;18(2):79-92.
25. Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. European Journal of Immunology 1989;19(12):2237-42.
26. Del Guercio M-F, Alexander J, Kubo RT, Arrhenius T, Maewal A, Appella E, et al. Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. Vaccine 1997;15(4):441-8.
27. Safavi A, Kefayat A, Mahdevar E, Abiri A, Ghahremani F. Exploring the out of sight antigens of SARS-CoV-2 to design a candidate multi-epitope vaccine by utilizing immunoinformatics approaches. Vaccine 2020;38(48):7612-28.
28. Consortium U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Research 2019;47(D1):D506-D15.
29. Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, et al. The immune epitope database (IEDB): 2018 update. Nucleic Acids Research 2019;47(D1):D339-D43.
30. Saha S, Raghava GPS. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 2006;65(1):40-8.
31. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. Nucleic Acids Research 2017;45(W1):W24-W9.
32. Magnan CN, Zeller M, Kayala MA, Vigil A, Randall A, Felgner PL, et al. High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data. Bioinformatics 2010;26(23):2936-43.
33. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics 2007;8(1):1-7.
34. Saha S, Raghava G. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. Nucleic Acids Research 2006;34(suppl_2):W202-W9.
35. Patra P, Bhattacharya M, Sharma AR, Ghosh P, Sharma G, Patra BC, et al. Identification and design of a next-generation multi epitopes bases peptide vaccine candidate against prostate cancer: an in silico approach. Cell Biochemistry and Biophysics 2020;78(4):495-509.
36. Magnan CN, Randall A, Baldi P. SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. Bioinformatics 2009;25(17):2200-7.
37. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The Proteomics Protocols Handbook 2005:571-607.
38. Deléage G. ALIGNSEC: viewing protein secondary structure predictions within large multiple sequence alignments. Bioinformatics 2017.
39. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nature Methods 2015;12(1):7-8.
40. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. Nucleic Acids Research 2005;33(suppl_2):W526-W31.
41. Ahmad S, Navid A, Farid R, Abbas G, Ahmad F, Zaman N, et al. Design of a novel multi epitope-based vaccine for pandemic coronavirus disease (COVID-19) by vaccinomics and probable prevention strategy against avenging zoonotics. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2020;151:105387.
42. Yamaoka Y, Miyakawa K, Jeremiah SS, Funabashi R, Okudela K, Kikuchi S, et al. Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-

CoV-2 nucleocapsid protein for antigen detection tests. Cell Reports Medicine 2021;2(6):100311.
43. Farhani I, Nezafat N, Mahmoodi S. Designing a novel multi-epitope peptide vaccine against pathogenic Shigella spp. based immunoinformatics approaches. International Journal of Peptide Research and Therapeutics 2019;25(2):541-53.
44. Ayyagari VS, TC V, Srirama K. Design of a multi-epitope-based vaccine targeting M-protein of SARS-CoV2: an immunoinformatics approach. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 2020:1-15.
45. Yazdani Z, Rafiei A, Yazdani M, Valadan R. Design an efficient multi-epitope peptide vaccine candidate against SARS-CoV-2: An in silico analysis. Infection and Drug Resistance 2020;13:3007.
46. Rosa DS, Tzelepis F, Cunha MG, Soares IS, Rodrigues MM. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. Immunology Letters 2004;92(3):259-68.
47. Rahman N, Ali F, Basharat Z, Shehroz M, Khan MK, Jeandet P, et al. Vaccine design from the ensemble of surface glycoprotein epitopes of SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach. Vaccines 2020;8(3):423.
48. Heggestad JT, Kinnamon DS, Olson LB, Liu J, Kelly G, Wall SA, et al. Multiplexed, quantitative serological profiling of COVID-19 from blood by a point-of-care test. Science Advances 2021;7(26):eabg4901.
49. Zhang B-z, Hu Y-f, Chen L-l, Yau T, Tong Y-g, Hu J-c, et al. Mining of epitopes on spike protein of SARS-CoV-2 from COVID-19 patients. Cell Research 2020;30(8):702-4.
50. Li Y, Lai D-y, Zhang H-n, Jiang H-w, Tian X, Ma M-l, et al. Linear epitopes of SARS-CoV-2 spike protein elicit neutralizing antibodies in COVID-19 patients. Cellular & Molecular Immunology 2020;17(10):1095-7.