

طراحی واکسن پلی‌اپی‌توپی سلول‌های B و T ضد سویه‌های باکتری هموفیلوس: با رویکرد بیوانفورماتیکی

غلامرضا نیکبخت‌بروجنی^۱، فاطمه عباس‌آبادی^۱، رامین عبیری^۲، امیر هوشنگ الوندی^۳، فرهاد سالاری^۴

^۱ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۳ مرکز تحقیقات تکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۴ گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۳۰ مهر ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۲ دی ماه ۱۳۹۹

doi: 10.22059/jvr.2019.271610.2882

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.1.15.3>

چکیده

زمینه مطالعه: علی‌رغم وجود واکسن‌های کونژوگ ضد سویه‌های هموفیلوس عفونت‌های ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا و هموفیلوس سومنوس چه در بعد انسانی و چه در صنعت دامپروری خسارت‌های اقتصادی بسیاری را به جوامع تحمیل می‌کند. کارا نبودن واکسن‌های موجود ضد همه سویه‌ها می‌تواند در گسترش عفونت ناشی از هموفیلوس مؤثر باشد. از نقاط ضعف این واکسن‌ها می‌توان به عدم پوشش اپی‌توپ‌های گوناگون از سویه‌های هموفیلوس در واکسن‌های موجود اشاره کرد. از این رو انتخاب یک مجموعه‌ای از پروتئین‌های حراست‌شده و مشترک در سویه‌های تهاجمی هموفیلوس آنفلوانزا و هموفیلوس سومنوس جهت پیشگویی اپی‌توپ‌ها و طراحی واکسن ضروری است.

هدف: این مطالعه با هدف طراحی واکسن پلی‌اپی‌توپی مؤثر بر ضد سویه‌های بیماری‌زای هموفیلوس آنفلوانزا و هموفیلوس سومنوس با بهره‌گیری از رهیافت‌های *in silico* انجام شد.

روش کار: ابتدا توالی‌های پروتئین‌های مورد نظر از پایگاه‌های داده بازیابی شدند و به منظور به دست آوردن مناطق حراست‌شده با نرم افزار Clustal omega هم‌دیف گردیدند. سپس پیشگویی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T برای ۶ پروتئین ایمنوژن شامل پروتئین غشای خارجی (Outer Membrane protein, OMP6)، پروتئین پوشش سلولی (Opacity Associated Protein A, OapA)، پروتئین باند شونده به ترانسفرین (Transferrin Binding Protein, TbpA)، پروتئین D (PD) و D15 با استفاده از سرورهای مختلف ایمنوآنفورماتیک صورت گرفت. اپی‌توپ‌های مشترک دارای امتیاز بالاتر با لینکرهای مناسب به یکدیگر متصل گردیدند. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختاری مدل نهایی با سرورهای مربوطه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: ۶ اپی‌توپ سلول CD4⁺T و ۳ اپی‌توپ سلول B از ۶ پروتئین ایمنوژن برای طراحی سازه نهایی انتخاب شدند. ارزیابی‌های ایمنوآنفورماتیک نشان داد که پپتید پلی‌اپی‌توپی طراحی شده یک پادگن بی خطر، محلول، هیدروفیل و پایدار در دماهای مختلف است که می‌تواند یک واکسن بالقوه باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: سازه پلی‌اپی‌توپی طراحی شده با ابزارهای ایمنوآنفورماتیک می‌تواند به عنوان کاندید واکسن ضد هموفیلوس مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: هموفیلوس آنفلوانزا، هموفیلوس سومنوس، پلی‌اپی‌توپی، ایمنوآنفورماتیک، واکسن

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: امیر هوشنگ الوندی، مرکز تحقیقات تکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

پست الکترونیکی: ah_alvandi@kums.ac.ir

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b (Hib) از عوامل شایع مننژیت در سراسر جهان است. همچنین سویه‌های بدون کپسول (NTHi) این باکتری با اوتیت حاد در کودکان و تشدید بیماری مزمن انسدادی ریه در بزرگسالان مرتبط هستند (۳۶،۴۵). به گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO) هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b باعث حداقل ۳ میلیون مورد بیماری جدی و تقریباً ۴۰۰۰۰۰ مرگ سالانه به علت مننژیت یا پنومونی در کودکان سراسر جهان است (۱۱،۴۱). به علاوه در صنعت دامپروری نیز برخی سویه‌ها نظیر هموفیلوس سومنوس سبب مننگوانسفالیت ترومبوتیک، میوکاردیت، پنومونی، سقط، عفونت‌های دستگاه تناسلی و ورم پستان در گاوها و تحمیل زبان اقتصادی قابل توجهی می‌شود (۳۱).

رایج‌ترین نوع واکسیناسیون استفاده از واکسن‌های ترکیبی شامل کونژوگه کپسول هموفیلوس، توکسوئید کزاز، دیفتری، سیاه سرفه و آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B است. از محدودیت‌های این واکسن‌های ترکیبی می‌توان به پاسخ آنتی‌بادی ضعیف ضد کپسول به دلیل وجود اپی‌توپ‌های سرکوب کننده در پروتئین‌های حامل اشاره کرد. به علاوه با وجود موفقیت نسبی واکسن‌های کونژوگه در برابر بیماری‌های ناشی از Hib به دلیل عدم کارایی این واکسن‌ها در برابر سویه‌های NTHi عفونت‌های ناشی از آنها شیوع یافته است (۱۲،۳۴). لذا با توجه به بار بیماری‌های ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا و مشکلات درمان و پیشگیری از این عفونت‌ها مانند مقاومت‌های میکروبی در حال گسترش، عدم کارایی ۱۰۰ درصدی واکسن‌های موجود، مؤثر نبودن واکسن‌های موجود ضد همه سویه‌های هموفیلوس آنفلوانزا و قیمت بالای تولید واکسن‌های موجود و از طرف دیگر اهمیت بیماری‌های ناشی از هموفیلوس سومنوس در گله‌های گاو و نیاز به دوره طولانی مدت آنتی‌بیوتیک تراپی، طراحی واکسن‌های مؤثرتر ضروری به نظر می‌رسد (۱۱،۳۱،۴۱).

در این زمینه طراحی واکسن‌هایی حاوی چندین فاکتور ویروالانس که در گونه‌های بیماری‌زای هموفیلوس محافظت شده باشد جهت پیشگیری از عفونت در انسان و حیوان بیشتر مورد توجه است. فاکتور اساسی در پاتوژنز سویه‌های هموفیلوس چسبیدن به مخاط دستگاه تنفس می‌باشد. به علاوه غلبه بر مکانیسم‌های کلیرانس میزبان همانند سیستم موکوسیلیاری و ایمنی موضعی سبب تهاجم باکتری به سلول‌های اپیتلیوم و ورود

به سایر قسمت‌های بدن می‌گردد. از جمله این فاکتورها که حاوی اسیدآمین‌های حراست شده می‌باشند و دارای همولوژی بالایی در بین سوش‌های هموفیلوس آنفلوانزا و هموفیلوس سومنوس هستند، می‌توان به پروتئین غشای خارجی (Outer Membrane protein, OMP6)، پروتئین پوشش سلولی (Opacity Associated Protein A, OapA)، پروتئین باند شونده به ترانسفرین (Transferrin Binding Protein A, TbpA)، پروتئین D (PD) و D15 اشاره کرد (۱،۲۴).

پروتئین IgA1 protease که در سویه‌های کپسول‌دار و بدون کپسول هموفیلوس آنفلوانزا وجود دارد با غلبه بر مکانیسم‌های ایمنی موضعی از جمله حضور IgA1 ترش‌چی در ایجاد مننژیت و تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال تنفسی نقش دارد. از آنجا که مطالعات مختلف تولید آنتی‌بادی ضد IgA1 proteases را نشان داده‌اند؛ لذا این پروتئین یک کاندید مناسب واکسن ضد سویه‌های Hib و NTHi است (۲۳،۵۴). همچنین پروتئین حفاظت شده غشای خارجی OMP6 در گونه‌های هموفیلوس با توجه به وجود اپی‌توپ‌هایی که منجر به فعال‌سازی سلول‌های B و تولید آنتی‌بادی باکتری‌سیدال می‌شوند و نقش ایمونومدولاتوری که دارد به عنوان کاندید مهمی در تولید واکسن مطرح است (۶،۳۵). به علاوه پروتئین ۱۷/۵ کیلودالتونی در OMP هموفیلوس سومنوس یک لیپوپروتئین مرتبط با پپتید و گلیکان محافظت شده و مشابه OMP6 در هموفیلوس آنفلوانزا می‌باشد که هدف ارزشمندی در تهیه واکسن محسوب می‌شود (۵۱). مطالعات پیشین پروتئین شدیداً محافظت‌شده در میان سویه‌های هموفیلوس آنفلوانزا به نام OapA مسئول ایجاد فنوتیپ کلونی شفاف و کلونیزاسیون باکتری هموفیلوس آنفلوانزا به سلول‌های اپی‌تلیال را به عنوان یک پروتئین ایمونوژن در طراحی واکسن ضد باکتری هموفیلوس مطرح کرده‌اند (۴۲،۴۴). پروتئین TbpA نیز پروتئینی غشایی است که جهت استفاده از هم (Heme) و همچنین برای حدت باکتری ضروری است (۵،۱۹). پروتئین PD با اختلال در عملکرد سیستم سیلیاری نقش مهمی در پاتوژنز داشته و دارای ویژگی‌هایی همانند درجات بالایی از حراست‌شدگی در سویه‌های کپسول‌دار و بدون کپسول، لوکالیزاسیون سطحی و توزیع گسترده است (۴،۴۳). پروتئین D15 با وزن مولکولی تقریبی ۸۰ کیلودالتون که در سویه‌های Hib، NTHi و

IgA1 Protease و TbpA با استفاده از جستجو در پایگاه داده NCBI's Conserved Domains Database (CDD) بر اساس همردیفی توالی‌ها و با کمک منابع داده خارجی Pfam, SMART, COG, PRK و TIGRFAMs (حد آستانه 1e-05) انجام شد.

پیشگویی ساختار سوم پروتئین‌ها: مدل‌سازی

ساختار سه بعدی پروتئین‌ها توسط سرور I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) انجام شد (۵۶). بهترین مدل‌های ساخته شده بر اساس امتیاز C (C-score) حاصل از سرور I-TASSER برای پروتئین‌های OapA, PD, D15, IgA1 protease و OMP6 انتخاب شدند.

پیشگویی اپی‌توپ‌های سلول B: به منظور

پیشگویی بهترین اپی‌توپ‌های سلول B از پنج سرور مختلف استفاده شد و با مقایسه نتایج حاصل از سرورهای گوناگون اپی‌توپ‌های خطی مشترک در تمامی سرورها انتخاب گردیدند. در سرور BCPreds (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>) از دو روش AAP و BCPred با استفاده از ویژگی‌های هیدروفیلیسیته، دسترسی سطحی و انعطاف پذیری بر پایه الگوریتم‌های amino subsequence kernel based SVM و acide pair antigenicity scale استفاده شد (۷۱۰). در سرور BepiPred-1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) بر پایه روش‌های hidden Markov model و propensity scale، با مشخصه (حد آستانه ۰/۳۵) پیشگویی اپی‌توپ‌های خطی صورت گرفت (۲۵). از طرف دیگر سرور BcePred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred>) با استفاده از ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی و آستانه‌های پیش‌فرض (۳ تا -۳)، اپی‌توپ‌های خطی سلول B را مشخص می‌کند (۴۶). همچنین سرور ABCpred (http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) با الگوریتم شبکه عصبی مصنوعی (حد آستانه ۰/۵۱) جهت پیشگویی اپی‌توپ‌های خطی مورد استفاده قرار گرفت (۴۸). برای پیشگویی اپی‌توپ‌های فضایی براساس توالی اولیه پروتئین‌ها سرور CBTOPE (<http://www.imtech.res.in/raghava/cbtope>) به کار رفت (۲). استفاده از سرورهای مختلف صحت اپی‌توپ‌های خطی انتخابی را افزایش می‌دهد.

هموفیلوس سومنوس شدیداً محافظت شده است، اهداف مهم آنتی-بادی‌های باکتری‌سیدال بوده و یک جزء مهم واکنش تحت واحد محسوب می‌شود (۲۹،۵۲).

امروزه با وجود اطلاعات فراوان و در دسترس در زمینه پروتئوم طراحی واکنش مبتنی بر رهیافت‌های نرم افزاری در حال پیشرفت است و ایمونوفورماتیک نقش مهمی در انتخاب اپی‌توپ‌های ایمونودامیننت و حراست شده دارد. لذا طراحی واکنش‌های پلی‌اپی‌تویی بر پایه روش‌های *in silico* با تمرکز بر پروتئین‌های ایمونوژن در مقایسه با سایر روش‌های تولید واکنش، مؤثرتر و مقرون به صرفه است (۳۹).

هدف مطالعه حاضر طراحی ایمونوفورماتیک واکنش پلی‌اپی‌تویی مؤثر ضد سویه‌های بیماری‌زای هموفیلوس *آنفلوانزا* و هموفیلوس سومنوس با استفاده از آنتی‌ژن‌های ایمونوژن و حراست شده OapA, PD, OMP6, D15, IgA1 Protease و TbpA بود.

مواد و روش کار

بازبایی توالی آمینواسیدی پروتئین‌ها و بررسی

همولوژی: درگام نخست توالی کامل پروتئین‌های OapA (شماره دسترسی: P44415)، Omp6 (شماره دسترسی: P10324)، IgA1 protease (شماره دسترسی: P45386)، D15 (شماره دسترسی: P46024)، PD (شماره دسترسی: Q06282) و TbpA (شماره دسترسی: P44970) از باکتری هموفیلوس *آنفلوانزا* و OapA (شماره دسترسی: Q0I4U6)، Omp6 (شماره دسترسی: Q0I1N0)، D15 (شماره دسترسی: Q0I385)، PD (شماره دسترسی: Q0I242) و TbpA (شماره دسترسی: Q0I2A4) از باکتری هموفیلوس سومنوس از پایگاه داده UniprotKB (<http://www.uniprot.org>) بازبایی شد. برای تعیین شباهت میان پروتئین‌ها در سویه‌های مختلف باکتری هموفیلوس *آنفلوانزا* و هموفیلوس سومنوس توالی آن‌ها بلاست (BLAST) شد. هم چنین جهت شناسایی نواحی مشترک بین پروتئین‌های هموفیلوس *آنفلوانزا* و هموفیلوس سومنوس، با استفاده از ابزار Clustal omega (<http://www.genome.jp/tools/clustalomega/>) همردیفی صورت گرفت.

تعیین دومین‌های حفاظت شده: دومین‌های

حفاظت شده پروتئین‌های OapA, PD, OMP6, D15.

آمار بی‌زی استفاده شد. همچنین مدل‌سازی واکسن پلی‌آبی‌تویی بر اساس توالی سازه پروتئینی با استفاده از سرور I- (<https://zhanglab.ccm.b.med.umich.edu/I-TASSER/>) TASSER انجام شد (۵۶).

بهینه‌سازی و ارزیابی اعتبار و پایداری ساختار

پیشگویی شده سازه پلی‌آبی‌تویی: بهینه‌سازی مدل سه بعدی به دست آمده برای واکسن پلی‌آبی‌تویی در یک فرایند دو مرحله‌ای با استفاده از سرورهای ModRefiner (<https://zhanglab.ccm.b.med.umich.edu/ModRefiner/>) و GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) انجام شد. بهینه‌سازی ساختارهای پروتئینی توسط سرور ModRefiner بر اساس به حداقل رساندن انرژی در مرحله اتمی انجام می‌شود که منجر به بهبود هر دو ساختارهای local و global با موقعیت‌های زنجیره جانبی دقیق‌تر، شبکه‌های اتصال به هیدروژن بهتر و همپوشانی اتمی کمتری می‌شوند (۵۵). از طرف دیگر سرور GalaxyRefine در ابتدا زنجیره‌های جانبی را مجدداً بازسازی می‌کند و دوباره بسته بندی زنجیره‌ای را انجام داده و متعاقباً از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای دستیابی به ساختار کلی استفاده می‌نماید (۱۸). به منظور ارزیابی پایداری ساختار و کیفیت نتایج استریوشیمی ساختار بهینه‌شده سازه واکسن، از نقشه رامچاندرا در نرم‌افزارهای PROCHECK (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/>) و RAMPAGE (<http://mordred.software/PROCHECK>) استفاده شد. نقشه حاصل از Ramachandran روشی برای تجسم انرژی زاویه‌های مجاز و غیرمجاز ψ (psi) و ϕ (phi) یک اسیدآمین است و بر اساس شعاع و اندروالز زنجیره جانبی محاسبه می‌شود. نتایج حاصل از RAMPAGE شامل درصد اسیدآمین‌ها در مناطق مجاز و غیرمجاز است که کیفیت ساختار مدل سه بعدی را تعیین می‌کنند. سرور RAMPAGE برای اعتبارسنجی ساختار سوم پروتئین از نقشه Ramachandran و نقشه‌های مربوط به اسیدآمین‌های گلیسین و پرولین استفاده می‌کند (۲۶،۳۰).

تجزیه و تحلیل پارامترهای فیزیکوشیمیایی:

پارامترهای فیزیکوشیمیایی سازه واکسن با استفاده از ابزار ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) مورد ارزیابی قرار گرفتند. پارامترهای محاسبه شده شامل

پیشگویی آبی‌توپ‌های سلول T: پیشگویی

آبی‌توپ‌های متصل‌شونده به مولکول‌های MHC-II انسانی (HLA) بر اساس آلل‌های شایع در پایگاه Allele frequencies با بیشترین پوشش جمعیتی صورت گرفت و از آنجا که تاکنون هیچ سروری آلل‌های MHC-II گاوی را جهت پیشگویی آبی‌توپ‌های ایمونی‌زای سلول T ارائه نکرده است؛ بر طبق نتایج حاصل از پژوهش Ghorbanpour و همکاران در سال ۲۰۱۸ آلل‌های MHC انسانی مشابه با آلل‌های MHC گاوی موجود در جمعیت هلستاین ایران، به عنوان آلل‌های معادل برای پیشگویی آبی‌توپ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (۱۴). پیشگویی آبی‌توپ‌های نونامری متصل‌شونده به MHC کلاس II با استفاده از سه سرور TEPIPOPEpan، ProPred و HLApred انجام گرفت و تا حد امکان سعی شد که آبی‌توپ‌های مشترک با امتیاز بالاتر در بیشتر سرورها جهت طراحی سازه نهایی انتخاب شوند. با استفاده از سرور TEPIPOPEpan (<http://datamining-iiip.fudan.edu.cn/service/>) پپتیدهای متصل‌شونده به مولکول‌های MHC-II بر پایه ماتریس امتیاز براساس موقعیت (PSSM) پیشگویی شدند (۳۷). سرورهای HLApred (<http://crdd.osdd.net/raghava/hlapred/team.html>) و ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>) با اجرای ماتریس‌های کمی (حد آستانه ۳ درصد) جهت پیشگویی آبی‌توپ‌های متصل‌شونده به MHC کلاس II به کار رفتند (۴۹،۵۰). همچنین سرور TEPIPOPEpan جهت پیشگویی آبی‌توپ‌های متصل‌شونده به آلل‌های MHC انسانی (HLA) معادل با آلل‌های MHC گاوی، استفاده گردید.

طراحی سازه پلی‌آبی‌تویی: سازه پلی‌آبی‌تویی با اتصال

آبی‌توپ‌های انتخابی سلول‌های T و B طراحی گردید. آبی‌توپ‌های سلول T به کمک لینکر GPGPG و آبی‌توپ‌های سلول B به کمک توالی GGGGSS به همدیگر متصل گردیدند. لینکر GPSL جهت اتصال آبی‌توپ‌های سلول‌های T و B به همدیگر استفاده گردید (۲۲).

پیشگویی ساختار دوم و سوم سازه پلی‌آبی‌تویی:

جهت پیشگویی ساختار دوم سازه واکسن از سرور GOR4 (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/GOR/GOR.php>) و GORIV با الگوریتم مبتنی بر تئوری اطلاعات در ترکیب با

TbpA و IgA1 protease بدون توالی سیگنال پپتید جهت انتخاب اپی‌توپ‌های سلول‌های T و B با کمک روش‌های ایمونوفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج بلاست توالی کامل اسیدآمینه‌ای پروتئین‌های OapA، OMP6، PD، D15، TbpA و IgA1 protease به ترتیب ۹۸/۹، ۹۸/۶، ۹۴/۱ و ۶۷/۳ همولوژی را بین NTHi و Hib نشان داد. همچنین نتایج بلاست توالی کامل اسیدآمینه‌ای پروتئین‌های OapA، OMP6، PD، D15، TbpA به ترتیب ۷۵/۲، ۷۷/۳، ۶۲/۹ و ۴۰/۸ همولوژی را بین هموفیلوس آنفلوانزا و هموفیلوس سومنوس آشکار کرد. بر اساس نتایج حاصل از هم‌ردیفی با کمک ابزار Clustal omega نواحی مشترک میان پروتئین‌های هموفیلوس آنفلوانزا و هموفیلوس سومنوس جهت انتخاب اپی‌توپ‌های سلول‌های T و B تعیین گردیدند.

دومین‌های حفاظت‌شده: نتایج جستجو در پایگاه داده NCBI's- CDD بر اساس الگوریتم RPS-BLAST فهرستی از دومین‌ها با فواصل مشخص و امتیاز E (حد آستانه ۰۵-۱e) می‌باشد. لذا بر اساس امتیاز E، مناطق حفاظت‌شده پروتئین‌ها جهت انتخاب اپی‌توپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

ساختار سوم پروتئین‌ها: بهترین مدل‌های پیشگویی شده برای ساختار سوم بر اساس نتایج سرور I-TASSER برای پروتئین‌های OapA، PD، D15، TbpA، IgA1 protease و OMP6 به ترتیب با بالاترین C-score برابر با ۰/۴۵، -۰/۲۴، +۱/۲۱، -۰/۷۹، -۲/۴۱ و -۰/۸۱ انتخاب شدند.

اپی‌توپ‌های سلول B: نتایج پیش‌بینی اپی‌توپ‌های مشترک سلول B در جدول ۱ آورده شده است. در این مطالعه از بین تمامی اپی‌توپ‌های خطی پیشگویی شده بر اساس الگوریتم‌های مختلف در سرورهای ABCpred، BcePred، BepiPred و BCPred اپی‌توپ‌های مشترک با امتیاز بالاتر انتخاب شدند. سرور CBTOPE اسیدآمینه‌هایی که امتیاز ۴ به بالا دارند را اپی‌توپ فضایی در نظر می‌گیرد که برای پروتئین OapA توالی LNISDVNAM در ۷ مکان، OMP6 توالی LGHDEAAYSKNRRAYLAY در ۱۵ مکان، PD توالی TKDGKQAQVYPN در ۶ مکان، D15 توالی LVFSYAKPI و GGRVTIPGSDNK در ۴ و یک مکان، TbpA توالی IRGMDRNRV در یک مکان و IgA1 protease توالی WLFLGSYDF در ۴ مکان اسیدآمینه‌ها به ترتیب با بیشترین نمره ۴، ۵ و ۶ به عنوان اپی‌توپ فضایی سلول B پیش‌بینی شدند. در نهایت اپی‌توپ‌های خطی که در سطح

وزن مولکولی، نیمه عمر، نقطه ایزوالکتریک، شاخص آلیفاتیک و مقدار Grand average of (GRAVY) hydrophaticity می‌باشند. حلالیت سازه با نرم افزار Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) بر اساس ویژگی‌های توالی پروتئین پیشگویی گردید (۱۷).

بررسی تغییرات پس از ترجمه: برای بررسی تغییرات پس از ترجمه سازه پلی اپی‌تویی از نرم‌افزارهای آنلاین NetNGlyc1.0 و (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) استفاده شد. سرور NetOGlyc4.0 با استفاده از الگوریتم شبکه عصبی مکان‌های O-گلیکوزیلاسیون را پیشگویی می‌کند. سرور NetNGlyc1.0 بر پایه الگوریتم شبکه عصبی توالی (Asn-Xaa-Ser/Thr) را برای پیشگویی مکان‌های N-گلیکوزیلاسیون بررسی می‌کند.

ترجمه معکوس و بهینه‌سازی کدون: ترجمه معکوس سازه پلی اپی‌تویی به توالی نوکلئوتیدی و اپتیمایز نمودن کدون‌های ژنی برای بیان در میزبان *Escherichia coli* به ترتیب توسط نرم‌افزارهای آنلاین Backtranseq (http://www.ebi.ac.uk/tools/st/emboss_backtra) و JCat (<http://www.jcat.de>) انجام شد (۱۵، ۲۷).

ارزیابی آلرژن‌سنجی و آنتی‌ژن‌سنجی: آلرژن‌سنجی سازه استفاده از سرور AlgPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/>) بررسی گردید. سرور AlgPred، آلرژن‌سنجی را بر اساس شباهت اپی‌توپ‌های شناخته شده با هر ناحیه از پروتئین مورد نظر پیشگویی می‌نماید. این سرور شش رهیافت پیشگویی دارد که در مطالعه حاضر از رهیافت هیبرید (SVMc+Ige epitope+ARPs) استفاده شد (۴۷). همچنین پیشگویی آنتی‌ژن‌سنجی سازه واکسن با استفاده از سرور VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/>) بدون انجام هم‌ردیفی و بر اساس ویژگی‌های مختلف فیزیولوژیکی پروتئین با رهیافت ACC output (حد آستانه ۰/۴) صورت گرفت (۹).

نتایج

بررسی اولیه توالی پروتئین‌ها: در مطالعه حاضر توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین‌های OapA، OMP6، PD، D15

VGPGGMVYLQTFDFGPSLGGRVTIPGSDNKGKGG
GGSSLGHDEAAYSKNRRRAVLAYGGGGSS

TKDGGKQAQVYPN

ساختار دوم و سوم پیش‌بینی شده سازه واکسن: نتایج

پیشگویی ساختار دوم نشان داد که درصد رندوم کوپل (۶۶/۴۲) بیشتر از استرنده بتا (۲۵/۵۵) و آلفا هلیکس (۸/۰۳) می‌باشد. از آنجا که قسمت‌های کوپل انعطاف‌پذیری بیشتری دارند، به لحاظ آنتی‌ژن‌سنجی مناطق مناسب‌تری برای اپی‌توپ‌ها هستند. ساختار ۳ بعدی پپتید پلی‌اپی‌تویی با استفاده از سرور I-TASSER پیش‌بینی شدند. سرور I-TASSER، ۵ مدل را با امتیاز C مختلف پیشگویی می‌کند. بازه C-score برابر با (۲ تا -۵) است که امتیاز بالاتر بیان‌کننده مدل با کیفیت بهتر می‌باشد؛ لذا در مطالعه حاضر بهترین مدل با بالاترین C-score برابر با ۲/۴۴ - را انتخاب شد. با استفاده از نرم افزار کایمر UCSF ساختار سه بعدی و موقعیت اپی‌توپ‌ها بررسی شد (تصویر ۱).

ساختار ۳ بعدی پروتئین‌های کاندید و سازه واکسن قرار داشتند، جهت طراحی سازه واکسن استفاده شدند.

اپی‌توپ‌های سلول T: بر اساس مقایسه نتایج سه سرور

HLAPred, ProPred و TEPITOPpan اپی‌توپ‌های سلول T⁺CD4⁺ که میان شایع‌ترین آل‌های موجود در جمعیت انسانی و همچنین برای آل‌های انسانی با بیشترین شباهت به آل‌های گاوی (HLA-DRB1*13:11, HLA-DRB1*14:82, HLA-DRB1*14:14, HLA-DRB1*14:51, DRB1*11:89) در حد آستانه ۳ درصد مشترک بودند، انتخاب شدند (جدول ۲).

طراحی سازه واکسن: جهت طراحی سازه نهایی، ۶

اپی‌توپ سلول T⁺CD4⁺ و ۳ اپی‌توپ سلول B از ۶ پروتئین کاندید به کمک لینکرهای مناسب به یکدیگر متصل شدند. توالی اسیدآمینهای سازه پلی‌اپی‌تویی به شرح ذیل است:

LGHDEAAAYSGPGPGLVFSYAKPIGPGPGLNI
SDVNAMGPGPWFLGSDYDFGPGPGIRGMDRNR

جدول ۱. اپی‌توپ‌های مشترک پیشگویی شده سلول B.

امتیاز	سرور	مکان اپی‌توپ	توالی اپی‌توپ	پروتئین
۱	AAPpred	۳۷۷-۳۹۶	NAMSKATGAGNVLSFFKSGD	OapA
۰/۶۹	ABCpred	۳۷۷-۳۹۶	NAMSKATGAGNVLSFFKSGD	
>۰/۳۵	BepiPred	۳۷۷-۳۹۶	NAMSKATGAGNVLSFFKSGD	
>۲	(Hydrophilicity)BcePred	۳۸۰-۳۹۹	SKATGAGNVLSFFKSGDKVT	OMP6
۰/۷۹۵	BCPred	۱۳۶-۱۵۳	LGHDEAAYSKNRRRAVLAY	
۰/۸۶	ABCpred	۱۳۳-۱۵۰	PAVLGHDEAAYSKNRRRAV	
>۰/۳۵	BepiPred	۱۳۶-۱۵۲	LGHDEAAYSKNRRRAVLA	IgA1 Protease
>۲	(Accessibility)BcePred	۱۲۹-۱۵۱	DEAAYSKNRRRAVL	
۱	BCPred	۱۱۱۵-۱۱۲۶	KNEQEATEPTPQ	
۰/۷۶	ABCpred	۱۱۱۴-۱۱۲۶	KNEQEATEPTP	D15
>۰/۳۵	BepiPred	۱۱۱۵-۱۱۲۶	KNEQEATEPTPQ	
>۲	(Accessibility)BcePred	۱۱۱۵-۱۱۲۶	KNEQEATEPTPQ	
۰/۹۹۵	BCPred	۵۸۸-۵۹۹	GGRVTIPGSDNK	PD
>۱/۹	(Flexibility) BcePred	۵۹۱-۵۹۹	VTIPGSDNK	
>۲	(Hydrophilicity)BcePred	۵۹۴-۶۰۰	PGSDNKY	
>۲	(Accessibility) BcePred	۵۹۳-۶۰۶	IPGSDNKYYKLSAD	TbpA
>۰/۳۵	BepiPred	۵۸۸-۵۹۹, ۵۹۱-۶۰۰	GGRVTIPGSDNK, VTIPGSDNKY	
۰/۶۹	ABCpred	۵۸۵-۵۹۶	ASLGGRVTIPGS	
۰/۸۵	ABCpred	۱۲۷-۱۳۸	TKDGGKQAQVYPN	TbpA
۰/۹۹۹	BCPred	۱۲۷-۱۴۲	TKDGGKQAQVYPNRFPL	
>۲	(Accessibility)BcePred	۱۱۴-۱۴۴	KEIQSLEMTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWK	
>۲	(Hydrophilicity)BcePred	۱۲۳-۱۳۵	ENFETKDGKQAQV	TbpA
>۰/۳۵	BepiPred	۱۲۷-۱۳۸	TKDGGKQAQVYPN	
۰/۸۹۴	BCPred	۹۸-۱۰۹	ISVVEQGRGASS	
۰/۷۴	ABCpred	۹۵-۱۰۶	DPGISVVEQGRG	TbpA
>۱/۹	(Flexibility)BcePred	۱۰۰-۱۰۸	VVEQGRGAS	
>۰/۳۵	BepiPred	۹۸-۱۰۹	ISVVEQGRGASS	

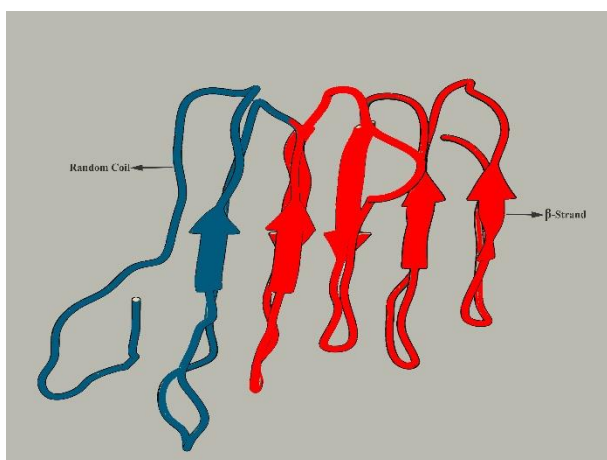
جدول ۲. اپی توپ‌های مشترک پیشگویی شده آل‌های *MHC II با استفاده از سرورهای TEPITOPEpan, HLA-Pred و ProPred.

ردیف	پروتئین	توالی اپی توپ	مکان اپی توپ
۱	OapA	LNISDVNAM	۳۷۱-۳۷۹
۲	OMP6	LGHDEAAYS	۱۳۶-۱۴۴
۳	IgA1 Protease	WLFLGSYDF	۳۱۳-۳۲۱
۴	D15	LVFSYAKPI	۷۷۰-۷۸۸
۵	PD	MVYLQTFDF	۲۰۸-۲۱۶
۶	TbpA	IRGMDRNRV	۱۱۲-۱۲۰

* HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*08:02, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*12:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB3*01:01, HLA-RB3*02:02, HLA-DRB4*01:01, HLA-DRB5*01:01, HLA-DRB1*11:89, HLA-DRB1*13:11, HLA-DRB1*14:1, HLA-DRB1*14:51, HLA-DRB1*14:82.

برای این سازه ۵۸/۴۵ است. شاخص آلیفاتیک بالاتر پایداری پپتید در دماهای مختلف را بیان می‌کند. نیمه عمر تخمین زده شده این توالی در یاخته پستاندار یک ساعت، در مخمر ۳۰ دقیقه و در *E. coli* بیشتر از ۱۰ ساعت می‌باشد. سرور SolPro با استفاده از داده‌های موجود برای حلالیت پروتئین *E. coli* در یک سیستم بیان بدون سلول (حد آستانه ۰/۴۵) حلالیت این توالی را برابر با ۰/۵۷۴ پیشگویی نمود.

بررسی تغییرات پس از ترجمه: نتایج سرور NetNGlyc بیانگر یک N-گلیکوزیلاسیون در اسیدآمینو اسپارژین (NISD) بود. اما در سرور NetOGlyc هیچ جایگاهی برای احتمال O-گلیکوزیلاسیون پیشگویی نشد. نتایج نشان داد که سازه واکسن عاری از تغییرات پس از ترجمه‌ای است که می‌تواند ایمنونژنسیته را تحت تأثیر قرار دهد.



تصویر ۱. ساختار سوم سازه پلی اپی توپی - اپی توپ‌های سلول B (توالی‌های آبی رنگ)، اپی توپ‌های سلول T (توالی‌های قرمز رنگ).

بهینه‌سازی و ارزیابی اعتبار و پایداری ساختار سوم

پیشگویی شده سازه واکسن: بهینه‌سازی مدل سه بعدی واکسن با سرور ModRefiner و پس از آن بهینه‌سازی بیشتر با سرور GalaxyRefine. پنج مدل را به همراه داشت. براساس نمرات کیفیت مدل برای همه مدل‌های بهینه‌شده، مدل ۱ بر اساس ویژگی‌های مختلف از جمله RMSD, GDT-HA و MolProbity به ترتیب برابر با ۰/۹۶۴۸، ۰/۳۶۶ و ۲/۵۰۹ بهترین مدل را نشان داد و Clash score برابر با ۰/۱۷۴، Poor rotamers برابر با ۱ و Rama favored برابر با ۷۷/۹ درصد بود. این مدل به عنوان مدل واکسن نهایی برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شد. ارزیابی نهایی اعتبار مدل پیش‌بینی شده با استفاده از نقشه رامچاندردان در نرم‌افزارهای PROCHECK و Rampage انجام شد. بررسی نقشه رامچاندردان قبل و بعد از بهینه‌سازی صورت گرفت. بعد از بهینه‌سازی ۱۰۰ درصد اسیدآمینوها در نواحی مطلوب و مجاز (مطلوب‌ترین، مجاز فرعی، مجاز سخاوتمندانه) سرور PROCHECK ۹۷/۸ درصد اسیدآمینوها در نواحی مطلوب و مجاز سرور Rampage بودند. نتایج در تصویر ۲ آورده شده است.

تجزیه و تحلیل پارامترهای فیزیکی شیمیایی: برحسب نتایج سرور PratParam، وزن مولکولی پپتید پلی اپی توپی ۱۴۲۹۷/۸۶ دالتون است. نقطه ایزوالکتریک (PI) پپتید پلی اپی توپی ۸/۲۵ محاسبه شد، بنابراین سازه پلی اپی توپی قلیایی است. با توجه به شاخص ناپایداری (Ii) محاسبه شده توسط سرور (۳۲/۶۹) این پپتید جزء پایدارها طبقه بندی می‌شود. مقدار GRAVY این پپتید ۰/۴۲۳- می‌باشد. مقدار منفی GRAVY نشان دهنده هیدروفیلیسیته پپتید و واکنش بهتر با مولکول‌های آب اطراف است. شاخص آلیفاتیک محاسبه شده

آلرژن‌سنجی و آنتی‌ژن‌سنجی: بر اساس نتایج سرور AlgPred، رهیافت هیبرید این پپتید را غیر آلرژن معرفی کرد و همچنین در روش SVM بر پایه توالی اسید آمینه‌ای امتیاز این سازه برابر با ۰/۸۹۸۴۱۶۶۸- است، لذا غیر آلرژن می‌باشد. سایر روش‌ها همچون اپی‌توپ Ige، BLAST و MAST نیز این پپتید را غیر آلرژن شناختند. سرور Vaxijen با حد آستانه ۰/۴ برای مدل‌های باکتریایی، آنتی‌ژن‌سنجی این سازه را برابر با ۱/۱۹۹۷ پیشگویی کرد؛ لذا با احتمال بالا این پپتید یک آنتی‌ژن می‌باشد.

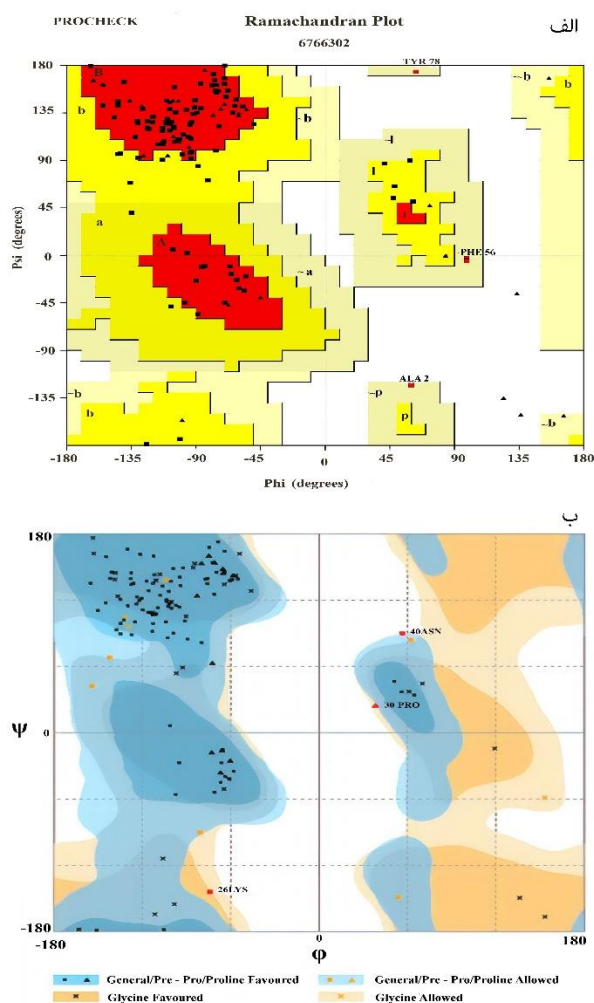
بحث

امروزه بروز مقاومت و یا کاهش حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در بسیاری از سویه‌های هموفیلوس مشاهده می‌شود (۲۰). اگر چه واکسن‌های کونژوگه کنونی تا حدودی منجر به کاهش بار بیماری‌های ناشی از سویه‌های هموفیلوس شده است، اما به دلیل پوشش پایین، کارایی کم و قیمت بالای تولید این نوع واکسن‌ها به خصوص در کشورهای در حال توسعه توجه به طراحی واکسن‌های جدید با پوشش بیشتر، هزینه و زمان تولید کمتر ضروری است (۱۶،۳۳).

واکسن‌های پپتیدی به دلیل امکان استفاده از اپی‌توپ‌های ایمونودامیننت حراست شده میان سرووارها می‌تواند منجر به ایمنی در برابر طیف وسیع‌تری از سرووارها و سویه‌ها شود. از این حیث واکسن‌های پپتیدی مولتی والان می‌توانند واکسن‌هایی مطمئن و مقرون به صرفه‌ای باشند (۲۸). به همین دلیل طراحی واکسن‌ها بر پایه پپتیدهای ایمونوژن سنتتیک برای تولید پاسخ‌های ایمنی اختصاصی در سال‌های اخیر افزایش یافته است. به طوری که استفاده از واکسن‌های پپتیدی ضد ایدز، هپاتیت، آنتراکس و تب برفکی در مراحل مختلف تکامل هستند (۲۸). به علاوه واکسن‌های مولتی اپی‌توبی با کمک رهیافت‌های بیوانفورماتیک ضد سرووارهای مختلف سالمونلا و شیگلا طراحی شده‌اند (۳۸،۵۳). اما در زمینه طراحی واکسن پلی‌اپی‌توبی مؤثر ضد هموفیلوس این خلاء هنوز وجود دارد.

عفونت با هموفیلوس عمدتاً منجر به تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی توسط سلول B می‌شود. از آنجا که سلول‌های T در هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولی نقش دارند؛ لذا برای افزایش ایمنی لازم است که اپی‌توپ‌های سلول B با اپی‌توپ‌های سلول

بهینه‌سازی کدون: یکی از روش‌های افزایش بیان پروتئین‌های خارجی، اپتیمایز نمودن کدون‌های ژنی می‌باشد. ترجمه معکوس توالی آمینواسیدی پپتید پلی‌اپی‌توبی و بهینه‌سازی کدونی به ترتیب با نرم‌افزارهای آنلاین Backtranseq و JCat انجام شد. درصد محتوای CG و شاخص ارجحیت کدون ژن (CAI) به ترتیب برابر با ۵۶ درصد و ۱ محاسبه گردید. محدوده درصد مطلوب محتوای GC باید بین ۳۰ تا ۷۰ درصد باشد.



تصویر ۲. نقشه رامچاندرا سازه پلی‌اپی‌توبی - هر نقطه قرمز رنگ در هر دو تصویر بیانگر یک اسید آمینه با زاویه غیر مجاز phi و psi است. الف) سرور PROCHECK درصد اسید آمینه‌ها در نواحی مطلوب‌ترین (ناحیه رنگی قرمز)، مجاز اضافی (ناحیه رنگی زرد)، مجاز سخاوتمندانه (ناحیه رنگی کرم) و غیرمجاز (ناحیه رنگی سفید) به ترتیب برابر با ۷۹/۸، ۱۷، ۳/۲ و ۰ گزارش گردید. ب) سرور RAMPAGE درصد اسید آمینه‌ها در نواحی مطلوب (ناحیه رنگی تیره)، مجاز (ناحیه رنگی روشن) و خارج از محدوده (ناحیه رنگی سفید) به ترتیب برابر با ۹۱/۴، ۶/۴ و ۲/۱ بودند.

HLAPred, ProPred, TEPITOPpan و الگوریتم‌های مختلف استفاده شد. در مقایسه نتایج، اپی‌توپ‌هایی که در هر سه سرور و در بین تمامی ۲۰ آل با فراوانی بالا مشترک بودند، انتخاب شدند. با مقایسه نتایج معلوم شد که برخی از اپی‌توپ‌ها محرک هر دو سلول B و T می‌باشند. اعتبار ابزارهای ایمونوفورماتیکی مبتنی بر ارزیابی‌های *in vivo* و *in vitro* اپی‌توپ‌های پیشگویی شده می‌باشد. مطالعات گذشته نشان داده است که اپی‌توپ‌های سلول-های B و T حاصل از پیشگویی سرورهای ABCpred, TEPITOPpan, BcePred, ProPred و BepiPred در ارزیابی‌های آزمایشگاهی سبب تولید آنتی بادی و افزایش سطح سایتوکاین‌ها می‌گردند (۱۳،۳۸،۵۷). با توجه به نتایج موفق بدست آمده از مطالعات مذکور، در مطالعه حاضر نیز جهت پیشگویی اپی-توپ‌ها از همان سرورها استفاده شد.

اپی‌توپ‌های نهایی سلول T برای پروتئین‌های OapA, OMP6, IgA1 Protease, PD, D15 و TbpA به ترتیب نواحی اسیدآمینهای ۳۷۱-۳۷۹ (LNISDVNAM)، ۱۳۶-۱۴۴ (LGHDEAAYS)، ۳۲۱-۳۱۳ (WLFLGSYDF)، ۷۷۰-۷۸۸ (LVFSYAKPI)، ۲۱۶-۲۰۸ (MVYLQTFDF)، ۱۱۲-۱۲۰ (IRGMDRNRV) بودند. سه اپی‌توپ نهایی سلول B شامل ۱۸ اسیدآمین انتهایی بخش C ترمینال OMP6 با توالی LGHDEAAYSKNRRAVLAY در ناحیه اسیدآمینهای ۱۵۲-۱۳۶، توالی GGRVTIPGSDNK ناحیه اسیدآمینهای ۵۹۹-۵۸۸ از پروتئین D15 و توالی TKDGGKQAQVYPN ناحیه اسیدآمینهای ۱۲۷-۱۳۸ از پروتئین D (PD) می‌باشند. در مطالعه‌ای مشابه Hua و همکاران در سال ۲۰۱۶ اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T از OMP6 و PD هموفیلوس *آنفلوانزا* را پیشگویی نمودند. با بررسی تیتراژ آنتی‌بادی علیه اپی‌توپ‌های سنتز شده، آن‌ها را به عنوان کاندیدهای واکسن مطرح نمودند که اپی‌توپ‌های TKDGGKQAQV و DMVYLQTFDF از PD و LGHDEAAYSKNR از OMP6 مشابه اپی‌توپ‌های پیشگویی شده مطالعه حاضر می‌باشند (۲۱). در تحقیقی دیگر Beck-Sickinger و همکاران در سال ۱۹۹۴ اپی‌توپ‌های سلول B از OMP6 هموفیلوس *آنفلوانزا* را تعیین نمودند که اپی‌توپ‌ها در نواحی اسیدآمینهای (۳۱-۴۶)، (۵۹-۷۰) و در بخش C ترمینال OMP6 قرار داشتند؛ در مطالعه حاضر نیز اپی‌توپ انتخاب شده در بخش C ترمینال OMP6 واقع شده است (۳).

T کمکی کونژوگه شوند. بنابراین در این مطالعه پیشگویی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T به صورت توأم انجام شد.

مطالعه حاضر برای شناسایی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T در بین پروتئین‌های مختلفی از باکتری هموفیلوس جهت طراحی واکسن ضد باکتری‌های هموفیلوس *آنفلوانزا* و هموفیلوس سومنوس صورت گرفت. برای طراحی واکسن پلی اپی‌تویی قوی توجه به انتخاب آنتی‌ژن‌های مناسب اهمیت دارد؛ لذا ما به دنبال پروتئین‌های حراست‌شده و ایمونوژن مناسب جهت پیشگویی اپی‌توپ‌ها بودیم که با بررسی مطالعات مختلف از میان پروتئین‌های مختلف هموفیلوس نهایتاً ۶ پروتئین OapA, OMP6, PD, D15, TbpA و IgA1 Protease جهت پیشگویی اپی‌توپ‌ها انتخاب شدند (۵۴،۵۳،۴۴،۴۳،۱۹،۶).

در مطالعه حاضر با کمک سرورهای ABCpred, BcePred, BCPreds و BepiPred اپی‌توپ‌های خطی سلول B برای هر یک از ۶ پروتئین OapA, OMP6, PD, D15, TbpA و IgA1 Protease پیش‌بینی شدند. موقعیت اپی‌توپ‌های فضایی در ساختار سوم پروتئین‌های کاندید ممکن است در ساختار سه بعدی سازه واکسن متفاوت باشد؛ بنابراین برای پیشگویی اپی‌توپ‌های فضایی بر پایه توالی پروتئین از سرور CBTOPE استفاده شد. با مقایسه نتایج سرورهای مختلف اپی‌توپ‌های مشترک در میان همه سرورها انتخاب شدند. از آنجا که نواحی سطحی روی پروتئین شانس بیشتری جهت اپی‌توپ بودن دارند، لذا واکنش بهتری با آنتی بادی خواهند داشت. مشاهده ساختار سه بعدی سازه پلی اپی‌تویی با نرم افزار کایمر نشان داد که سه اپی‌توپ انتخابی سلول B در سطح ساختار سه بعدی سازه قرار دارند و مطابق نتایج سرور BcePred دارای ویژگی‌هایی همچون دسترسی سطحی، انعطاف پذیری و هیدروفیلیسیتی هستند، لذا جهت طراحی سازه واکسن انتخاب شدند.

یکی از عوامل مهم در طراحی واکسن توزیع متفاوت HLA در سراسر جهان است؛ بنابراین اپی‌توپ‌های مشترک سلول T برای آل‌های HLA-II با بیشترین فراوانی و بر پایه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و الگوریتم‌های مختلف پیشگویی شدند. از آنجا که تاکنون هیچ سروری آل‌های MHC-II گاوی را جهت پیشگویی اپی‌توپ‌های ایمنی‌زای سلول T ارائه نکرده است؛ آل‌های انسانی مشابه با ۵ آل فراوان موجود در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران، به عنوان آل‌های معادل برای پیشگویی اپی‌توپ‌ها استفاده شدند. جهت افزایش صحت اپی‌توپ‌های انتخابی ترکیبی از سرورهای

محتوای کلی GC توالی DNA صورت گرفت. حلالیت پروتئین نوترکیب بیان شده در میزبان *E. coli* یکی از ملزومات اساسی بسیاری از تحقیقات بیوشیمیایی و عملکردی است و واکسن پروتئینی ما درصد قابل قبولی از حلالیت را نشان داد.

پس از طراحی واکسن‌های پلی‌ای‌توپ یکی از اهداف تولید انبوه آن‌هاست. بدین منظور سیستم‌های پروکاریوتی مانند *E. coli* به دلیل راحتی در کشت و تولید بالای پروتئین یکی از مهم‌ترین میزبان‌ها است. با این حال فقدان تغییرات پس از ترجمه از مشکلات بیان پروتئین‌ها در میزبان پروکاریوتی است. از آنجا که سازه واکسن در این مطالعه فقط یک جایگاه N-گلیکوزیلاسیون داشته و فاقد جایگاه O-گلیکوزیلاسیون می‌باشد، لذا عدم گلیکوزیلاسیون تأثیری در ساختار پروتئین و تغییر در پلی‌توپ‌های پیش‌بینی شده نخواهد داشت (۸).

لازم به ذکر است از آنجا که روش‌های تشخیص هموفیلوس *آنفلوانزا* بر اساس کشت، الیزا و PCR می‌باشد و تست‌های الیزا جهت تشخیص آنتی‌ژن کپسولی بوده و میزان آنتی‌بادی ضد پروتئین‌های انتخابی این مطالعه را نمی‌سنجند، لذا سازه واکسن طراحی شده تداخلی در تشخیص ایجاد نمی‌کند (۳۲).

به طور خلاصه در این مطالعه با استفاده از ابزارهای گوناگون ایمونوفورماتیک، ۶ پلی‌توپ سلول T و ۳ پلی‌توپ سلول B بر پایه ۶ پروتئین ایمونوژن سویه‌های باکتری هموفیلوس *آنفلوانزا* و هموفیلوس سومنوس دارای امتیاز بالاتر و مشترک میان تمامی سرورها جهت طراحی سازه نهایی واکسن انتخاب شدند. بر اساس ارزیابی‌های ایمونوفورماتیکی واکسن فوق یک پادگن بی‌خطر، محلول، پایدار در دماهای متفاوت و هیدروفیل است. لذا این پپتید پلی‌ای‌تویی می‌تواند کاندیدی جهت ایجاد ایمنی ضد باکتری هموفیلوس باشد. در نهایت کارایی واکسن فوق می‌بایست در مطالعات *in vivo* و *in vitro* ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی طراحی و ارزیابی برون‌تنی ایمنی‌زایی واکسن هموفیلوس مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد پروژه ۹۶۶۴۵ و کد اخلاق IR.KUMS.REC.1396.96 می‌باشد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

اتصال پلی‌توپ‌های انتخابی با لینکرهای GGGGSS و GPGPG توالی‌هایی با حداقل ایمنی‌زایی را در نواحی اتصال تولید می‌کنند، بنابراین در طراحی منطقی یک واکسن پلی‌ای‌تویی قوی مناسب می‌باشند. توالی GPSL جهت اتصال پلی‌توپ‌های سلول‌های T و B به همدیگر استفاده گردید. این نوع لینکرها انعطاف پذیر هستند و پتانسیل تاخوردگی (folding) پلی‌توپ‌های سلول‌های T و B را به طور مستقل فراهم می‌کنند (۲۲). در نهایت سازه پلی‌ای‌تویی متشکل از ۶ پلی‌توپ سلول T و ۳ پلی‌توپ سلول B دارای امتیاز بالاتر و مشترک میان سرورهای گوناگون (جدول ۱،۲) طراحی گردید. آنتی‌ژن‌سیتی و خاصیت آلرژن پروتئین سازه نهایی آن را به یک واکسن بالقوه تبدیل می‌کند. وزن مولکولی پروتئین واکسن ۱۴۲۹۷/۸۶ دالتون محاسبه شد. شاخص PI سازه پپتیدی ۸/۲۵ بود، بنابراین پروتئین واکسن ماهیت بازی داشت. شاخص آلیفاتیک نشان داد که پروتئین با استفاده از زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک اشغال شده است. شاخص ناپایداری سازه واکسن توسط سرور PratParam کمتر از ۴۰ محاسبه شد، لذا سازه پپتیدی جزء پایدارها طبقه بندی می‌شود. مقدار GRAVY واکسن منفی بود، بنابراین پپتید پلی‌ای‌تویی هیدروفیل می‌باشد. همه این پارامترها بیانگر پایداری سازه واکسن در دماهای مختلف است. بررسی ساختار دوم سازه واکسن نشان داد که درصد عمده‌ای از سازه پلی‌ای‌تویی ساختارهای رندوم کوئل هستند و از آنجا که این نواحی انعطاف پذیری بیشتری نسبت به سایر ساختارهای ثانویه دارند، لذا نتایج نشان داد که پلی‌توپ‌ها نسبتاً انعطاف پذیر می‌باشند (۴۰). علاوه بر این، ساختار سه بعدی به دست آمده با استفاده از مدل‌سازی همولوژی توسط سرور I-Tasser شامل اطلاعات کافی در مورد چیدمان فضایی اسیدآمین‌های مهم در پروتئین‌ها می‌باشد که در مطالعه عملکرد پروتئین و واکنش با سایر پروتئین‌ها کمک کننده است. جهت تشخیص خطاها در ساختار مدل سه بعدی واکسن نهایی از ابزارهای اعتبارسنجی ساختار استفاده شد. نقشه رامانچاندران در سرور RAMPAGE نشان داد که درصد اسیدآمین‌ها در نواحی مطلوب، مجاز و خارج از محدوده به ترتیب برابر با ۹۱/۴، ۶/۴ و ۲/۱ و در سرور PROCHECK برای نواحی مطلوب‌ترین، مجاز فرعی، مجاز سخاوتمندانه و غیرمجاز به ترتیب برابر با ۷۹/۸، ۱۷، ۳/۲ و ۰ بودند. لذا کیفیت کلی مدل مناسب می‌باشد.

برای دستیابی به سطح بالای بیان پروتئین واکسن نوترکیب در *E. coli* بهینه‌سازی کدون برای بهبود رونویسی و ترجمه انجام شد. این کار با تجزیه و تحلیل شاخص سازگاری کدون (CAI) و

References

- Agrawal, A., Murphy, T.F. (2011). *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. *J Clin Microbiol*, 49, 3728–3732. <https://doi.org/10.1128/JCM.05476-11> PMID: 21900515
- Ansari, H.R., Raghava, G.P. (2010). Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res*, 6, 6. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-6> PMID: 20961417
- Beck-Sickingler, A.G., Rotering, H., Wiesmüller, K.H., Dörner, F., Jung, G. (1994). Mapping of antigenic and immunogenic sites of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6 using synthetic lipopeptides. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375, 173–182.
- Behrouzi, A., Bouzari, S., Siadat, S.D., Oloomi, M., Davari, M., Mazaheri, H. (2016). Evaluation of the immunogenic property of NT *H. influenzae* protein D with *Neisseria meningitidis* OMV in BALB/c. *J Infect Dev Ctries*, 10, 1345–1351. <https://doi.org/10.3855/jidc.7513> PMID: 28036315
- Behrouzi, A., Vaziri, F., Rahimi-Jammani, F., Afrough, P., Rahbar, M., Satarian, F., Siadat, S.D. (2017). Vaccine Candidates against Nontypeable *Haemophilus influenzae*: a Review. *Iran biomed j*, 21, 69-76. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijb.21.2.69> PMID: 28088130
- Berenson, C.S., Murphy, T.F., Wrona, C.T., Sethi, S. (2005). Outer membrane protein p6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines. *Infect Immun*, 73, 2728-2735. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2728-2735.2005> PMID: 15845475
- Chen, J., Liu, H., Yang, J., Chou, K. (2007). Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*, 33, 423-428. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0485-9> PMID: 17252308
- Dowling, W., Thompson, E., Badger, C., Mellquist, J.L., Garrison AR, Smith, J.M., Pargas, J., Hogan, R.H., Schmaljohn, C. (2007). Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol*, 8, 1821-1837. <https://doi.org/10.1128/JVI.02098-06> PMID: 17151111
- Doytchinova, I.A., Flower, D.R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinform*, 8, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4> PMID: 1720727
- El-Manzalawy, Y., Dobbs, D., Honavar, V. (2008). Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit*, 21, 243-255. <https://doi.org/10.1002/jmr.893> PMID: 18496882
- Feikin, D.R., Nelson, C.B., Watt, J.P., Mohsni, E., Wenger, J.D., Levine, O.S. (2004). Rapid assessment tool for *Haemophilus influenzae* type b disease in developing countries. *Emerg infect dis*, 10, 1270-1276. <https://doi.org/10.3201/eid1007.030737> PMID: 15324548
- Ferreccio, C., Clemens, J., Avendano, A. (1991). The clinical and immunologic response of Chilean infants to *H. influenzae* type b polysaccharidetetanus protein conjugated vaccine co-administered in the same syringe with diphtheria tetanus toxoid-pertussis vaccine at two, four and six months of age. *Pediatr J Infect Dis*, 10, 764-771.
- Garcia-Angulo, V.A., Kalita, A., Kalita, M., Lozano, L., Torres, A.G. (2014). Comparative genomics and immunoinformatics approach for the identification of vaccine candidates for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, 82, 2016-2026. <https://doi.org/10.1128/IAI.01437-13> PMID: 24595137
- Ghorbanpour, R., Nikbakhat Brujeni, G., Jalali, S. (2019). Immuno-bioinformatics study of autotransporter protein, antigen 43, in enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from calves. *J Vet Res*, 74, 127-141. <https://doi.org/10.22059/jvr.2018.211721.25>
- Grote, A., Hiller, K., Scheer, M., Munch, R., Nortemann, B., Hempel, D.C., Jahn, D. (2005). JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res*, 33, 526-531. <https://doi.org/10.1093/nar/gki376> PMID: 15980527
- Harris, F.W., Janzen, E.D. (1989). The *Haemophilus somnus* disease complex (hemophilosis): a review. *Can Vet J*, 30, 816-822.
- Hebditch, M., Carballo-Amador, M.A., Charonis, S., Curtis, R., Warwicker, J. (2017). Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinform*, 33, 3098-3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx345> PMID: 28575391
- Heo, L., Park, H., Seok, C. (2013). GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic acids res*, 41, W384–W388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458> PMID: 23737448
- Holland, J., Parsons, T.R., Hasan, A.A., Cook, S.M., Stevenson, P., Griffiths, E., Williams, P. (1996). Conservation and antigenic cross-reactivity of the transferrin-binding proteins of *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Neisseria meningitidis*. *Microbiol*, 142, 3505–3513. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-12-3505> PMID: 9004513
- Hotomi, M., Fujihara, K., Sakai, A., Billal, D.S., Shimada, J., Suzumoto, M., Yamanaka, N. (2006). Antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx of Japanese children with acute otitis media. *Acta Otolaryngol*, 126, 240-247. <https://doi.org/10.1080/00016480500312455> PMID: 16428188
- Hua, C.Z., Hu, W.L., Shang, S.Q., Li, J.P., Hong, L.Q., Yan, J. (2016). Serum concentrations of antibodies against outer membrane protein P6, protein D, and T- and B-cell combined antigenic epitopes of nontypeable *Haemophilus influenzae* in children and adults of different ages. *Clin Vaccine Immunol*, 23, 155-161. <https://doi.org/10.1128/0014-8171.00506-15> PMID: 26677200
- Kaumaya, P.T.P., Kobs-Conrad, S., Digeorge, A.M., Stevens, V.C. (1994). Peptides: Design, Synthesis, and Biological Activity. In: "De Novo" Engineering of Peptide Immunogenic and Antigenic Determinants as Potential Vaccines. Basava C., Anantharamaiah, G.M. (eds.). (1st ed.). Birkhäuser Boston. Boston, MA. p. 133-164.
- Kilian, M., Thomsen, B., Petersen, T.E., Blegg, H. (1983). Molecular biology of *Haemophilus influenzae* IgA1 protease. *Mol Immunol*, 20, 1051-1058.
- Kumavath, R., Prasad, S., Devarapalli, P., Barh, D. (2014). In silico identification of novel candidate drug targets in *Haemophilus Influenzae* Rd KW20. *Inter J Genet Genom*, 2, 62-67.
- Larsen, J.E.P., Lund, O., Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*, 2, 2. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2> PMID: 16635264
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1993). Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, 26, 283-291.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res*, 43, W580-W584. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv279> PMID: 25845596
- Li, W., Joshi, M.D., Singhanian, S., Ramsey, K.H., Murthy, A.K. (2014). Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*, 2, 515-536. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030515> PMID: 26344743

29. Loosmore, S.M., Yang, Y.P., Coleman, D.C., Shortreed, J.M., England, D.M., Klein, M.H. (1997). Outer membrane protein *D15* is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. *Infect Immun*, 65, 3701-3707.
30. Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, D.C. (2003). Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ , ψ and $C\beta$ deviation. *Proteins*, 50, 437-450.
31. Madampage, C.A., Wilson, D., Townsend, H., Crockford, G., Rawlyk, N., Dent, D., Evans, B., Donkersgoed, J.V., Dorin, C., Potter, A. (2016). Cattle immunized with a recombinant subunit vaccine formulation exhibits a trend towards protection against *Histophilus somni* bacterial challenge. *PLoS one*, 11, e0159070.
32. Mariani, M., Luzzi, E., Proietti, D., Mancianti, S., Casini, D., Costantino, P., Gageldonk P.V., Berbers, G. (1998). A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the levels of serum antibody to *Haemophilus influenzae* type b. *Clin diagn lab immunol*, 5, 667-674.
33. Morris, S.K., Moss, W.J., Halsey, N. (2008). *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness. *Lancet Infect Dis*, 8, 435-443. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70152-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70152-X) PMID: 18582836
34. Mulholland, K., Levine, O., Nohynek, H., Greenwood, B.M. (1999). Evaluation of vaccines for the prevention of pneumonia in children in developing countries. *Epidemiol Rev*, 21, 43-55.
35. Munson, R.S., Granoff, D.M. (1985). Purification and partial characterization of outer membrane proteins P5 and P6 from *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun*, 49, 544-549.
36. Murphy, T.F. (2006). The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis*, 19, 225-230. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000224815.89363.15> PMID: 16645482
37. Nielsen, M., Justesen, S., Lund, O., Lundegaard, C., Buus, S. (2010). NetMHCIIpan-2.0 - Improved pan-specific HLA-DR predictions using a novel concurrent alignment and weight optimization training procedure. *Immunome Res*, 6, 9. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-9> PMID: 21073747
38. Pahil, S., Taneja, N., Ansari, H.R., Raghava, G.P.S. (2017). In silico analysis to identify vaccine candidates common to multiple serotypes of *Shigella* and evaluation of their immunogenicity. *PLoS one*, 12, e0180505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180505> PMID: 28767653
39. Patronov, A., Doytchinova, I. (2013). T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol*, 3, 120139. <https://doi.org/10.1098/rsob.120139> PMID: 23303307
40. Pellequer, J.L., Westhof, E., Van Regenmortel, M.H. (1991). Predicting location of continuous epitopes in proteins from their structures. *Meth Enzymol*, 322, 891-901.
41. Peltola, H. (2000). Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev*, 13, 302-317.
42. Prasadarao, N.V., Lysenko, E., Wass, C.A., Kim, K.S., Weiser, J.N. (1999). Opacity associated protein A contributes to the binding of *Haemophilus influenzae* to chag epithelial cells. *Infect Immun*, 67, 4153-4160.
43. Prymula, R., Peeters, P., Chrobok, V., Kriz, P., Novakova, E., Kaliskova, E., Kohl, I., Lommel, P., Poolman, J., Prieels, J.P., Schuerman, L. (2006). Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. *Lancet*, 367, 740-748. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68304-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68304-9) PMID: 16517274
44. Rahimi, P., Hanachi, P., Bouzari, S., Siadat, S.D. (2015). Molecular analysis of oapA gene in *Haemophilus influenzae* strains isolated from Iran: as a domestic vaccine candidate. *qom Univ Med Sci J*, 8, 17-25.
45. Rana, R., Dalal, J., Singh, D., Kumar, N., Hanif, S., Joshi, N., Chhikara, M.K. (2015). Development and characterization of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine prepared using different polysaccharide chain lengths. *Vaccine*, 33, 2646-2654. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.031> PMID: 25907408
46. Saha, S., Raghava, G. (2004). BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. In: *Artificial Immune Systems*. Nicosia, G., Cutello, V., Bentley, P.J., Timmis, J. (eds.). (1st ed.). Springer. Heidelberg, Berlin. p. 197-204.
47. Saha, S., Raghava, G. (2006). AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic acids Res*, 34, 202-209. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl343> PMID: 16844994
48. Saha, S., Raghava, G. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, 65, 40-48. <https://doi.org/10.1002/prot.21078> PMID: 16894596
49. Singh, H., Raghava, G.P.S. (2001). ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinform*, 17, 1236-1237.
50. Sinigaglia, F., Hammer, J. (1994). Defining rules for the peptide-MHC class II interaction. *Curr Opin Immunol*, 6, 52-56.
51. Tagawa, Y., Ishikawa, H., Yuasa, N. (1993). Characterization of an immunoreactive 17.5-kilodalton outer membrane protein of *Haemophilus somnus* by using a monoclonal antibody. *Infect Immun*, 61, 4153-4157.
52. Thomas, W.R., Flack, F.S., Callow, M.G., Chua, K.Y. (1992). A high molecular-weight outer membrane protein that is a potential target for protective immunity to type b and untypeable *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis*, 165, 75-76.
53. Verma, S., Sugadev, R., Kumar, A., Chandna, S., Ganju, L., Bansal, A. (2018). Multi-epitope dnak peptide vaccine against *S.typhi*: An in silico approach. *Vaccine*, 36, 4014-4022. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.106> PMID: 29861180
54. Vitovski, S., Dunkin, K.T., Howard, A.J., Sayers, J.R. (2002). Nontypeable *Haemophilus influenzae* in carriage and disease: a difference in IgA1 protease activity levels. *JAMA*, 287, 1699-1705.
55. Xu, D., Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys j*, 101, 2525-2534. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024> PMID: 22098752
56. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat methods*, 12, 7-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213> PMID: 25549265
57. Yepes-Pérez, Y., López, C., Suárez, C.F., Patarroyo, M.A. (2018). *Plasmodium vivax* Pv12 B-cell epitopes and HLA-DR β 1*-dependent T-cell epitopes *in vitro* antigenicity. *PLoS one*, 13, e0203715.



Designing B and T Cell Multi-Epitope Vaccine for Cross Protection Against *Haemophilus* Strains: An Immunoinformatics Approach

Gholamreza Nikbakht Borojeni¹, Fatemeh Abasabadi¹, Ramin Abiri², Amirhooshang Alvandi³, Farhad Salari⁴

¹ Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Fertility and Sterility Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences and Department of microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³ Medical Technology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences and Department of microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴ Department of Immunology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

doi [10.22059/jvr.2019.271610.2882](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.271610.2882)

Received: 21 October 2020, Accepted: 22 December 2020

Abstract

BACKGROUND: Despite the availability of effective conjugate vaccines, *Haemophilus influenzae* (HI) and *Haemophilus somnus* (HS) still result in enormous global morbidity in both human and cattle. Vaccines failure to protect against different strains can lead to the spread of *Hemophilus* infections. The absence of various epitopes from *Haemophilus* strains in existing vaccines is one of their weaknesses. Therefore, selection of a conserved and common set of proteins in the invasive strains of HI and HS is essential for predicting epitopes as potential vaccine candidate.

OBJECTIVES: The aim of this study was to design an effective polyepitopic vaccine against invasive HI and HS strains using *in silico* approaches.

METHODS: First, the protein sequences were retrieved from the databases and were aligned to determine the conserved areas with the Clustal omega software. Then, B and T cell epitopes identification was done for OapA, OMP6, PD, D15, IgA1 Protease and TbpA proteins using various immunoinformatic servers. The high ranked epitopes were selected from mentioned proteins. The selected epitopes were fused together by appropriate linkers. This designed construct was analyzed for physicochemical and structural characteristics using related servers.

RESULTS: 6 TCD4⁺ and 3 B cell epitopes were selected to design the final construct from 6 common proteins. The immunoinformatics analysis revealed that the designed polyepitopic peptide is a safe, soluble, hydrophilic and thermostable antigen that could be a potential vaccine.

CONCLUSIONS: The polyepitopic construct can be considered as a vaccine candidate against *Haemophilus*.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, Polyepitopic, Immunoinformatics, Vaccine

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: ah_alvandi@kums.ac.ir Tel/Fax: 083-34274618/083-34281566

How to cite this article:

Nikbakht Borojeni, G., Abasabadi, F., Abiri, R., Alvandi, A., Salari, F. (2021). Designing B and T Cell Multi-Epitope Vaccine for Cross Protection Against *Haemophilus* Strains: An Immunoinformatics Approach. J Vet Res, 76(1), 133-145. <https://doi.org/10.22059/jvr.2019.271610.2882>

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The common B cell predicted epitopes.

Table 2. The common T cell predicted epitopes, by using TEPITOPEpan, HLA Pred and ProPred servers.

Figure 1. Tertiary structure of polyepitopic construct- B cell epitopes (Blue color sequences), TCD4⁺ B cell epitopes (Red color sequences).

Figure 2. The Ramachandran plot of polyepitopic construct- Each of the red dots in both plots indicates an amino acid with illegal phi and psi angle (A) PROCHECK server: 79.8 %, 17.0 % and 3.2 %, 0.0 % of residues were located in the most favored (Colored region red), additional allowed (Colored region yellow), generously allowed (Colored region cream) and disallowed regions (Colored region white), respectively. (B) RAMPAGE server: 91.4 %, 6.4 % and 2.1 % of residues were located in the favored (Colored region dark), allowed (Colored regions light) and outlier regions (Colored regions white), respectively.