



Chimeric Vaccine Design against Dengue Virus Using Immunoinformatics and Docking Approaches

A. Asadzadeh (PhD)^{*1} , K. Dastan (PhD)² , N. Ghorbani (PhD)² 

1. Department of Biology, Faculty of Science, Nour Danesh Institute of Higher Education, Isfahan, I.R.Iran.

2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R.Iran.

*Corresponding Author: A. Asadzadeh (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Nour Danesh Institute of Higher Education, Isfahan, I.R.Iran.

Tel: +98 (31) 45427602. E-mail: az.asadzadeh@nourdanesh.ac.ir

Article Type ABSTRACT

Research Paper

Background and Objective: Over the past five years, transmission of the dengue virus to humans by infected Aedes mosquitoes has increased significantly. Preventive methods such as developing an effective vaccine are the best option to combat dengue infection. The aim of this study is to develop chimeric vaccines against dengue viruses using immunoinformatics and molecular docking approaches.

Methods: In this in silico analysis, the genomic protein of dengue viruses was used to develop a recombinant multivalent epitope vaccine. 5 B cell lymphocyte (BCL) epitopes, 5 cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes, and 5 helper T lymphocyte (HTL) epitopes, suitable adjuvant, and linkers were chosen in the structure of the final multi-epitope vaccine. The construct was analyzed computationally to predict antigenic, allergenic, and physicochemical properties as well as two- and three-dimensional structures. Finally, another analytical study was carried out by docking and in silico cloning.

Findings: Based on our findings, the designed vaccine with 320 residues has suitable antigenicity and physicochemical properties. Molecular docking simulations between the engineered vaccine construct and five Toll-like receptors (TLRs) revealed that the vaccine displays the strongest binding affinity and optimal docking conformation with TLR3 and TLR9. Furthermore, codon optimization analysis identified Escherichia coli strain K12 as a suitable host for improved linear DNA sequences.

Conclusion: Based on the results of this study, the final vaccine construct comprises 15 epitopes (5 B-cell epitopes, 5 CTL epitopes, and 5 HTL epitopes) along with an adjuvant. It is potentially antigenic and non-allergenic.

Keywords: Vaccines, Dengue, Computer Simulation, Immunoinformatics, Fever, Docking.

Received:

Nov 25th 2024

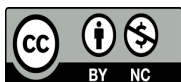
Revised:

Feb 18th 2025

Accepted:

May 5th 2025

Cite this article: Asadzadeh A, Dastan K, Ghorbani N. Chimeric Vaccine Design against Dengue Virus Using Immunoinformatics and Docking Approaches. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2026; 28: e15.





طراحی واکسن کایمیریک علیه ویروس دنگی با استفاده از روش‌های ایمونوانفورماتیک و داکینگ

عزیزه اسدزاده (PhD)^{۱*}، کتابون داستان (PhD)^۲، نفیسه قربانی (PhD)^۲

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی نور دانش، اصفهان، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

نوع مقاله	چکیده
مقاله پژوهشی	<p>سابقه و هدف: طی پنج سال گذشته، انتقال ویروس دنگی به انسان توسط پشه‌های آئدس آلوده به طور قابل توجهی افزایش یافته است. روش‌های پیشگیرانه مانند ساخت واکسن موثر بهترین گزینه برای مبارزه با عفونت دنگی است. هدف از این مطالعه توسعه واکسن کایمیریک علیه ویروس دنگی با استفاده از روش‌های ایمونوانفورماتیک و داکینگ مولکولی می‌باشد.</p> <p>مواد و روش‌ها: در این آنالیز <i>in silico</i>، پروتئین ژنومی ویروس دنگی برای ساخت واکسن نو ترکیب استفاده شد. ۵ اپی توپ لنفوسیت سلول B، 5 اپی توپ لنفوسیت T سیتوتوکسیک (CTL) و ۵ اپی توپ لنفوسیت T کمکی (HTL)، ادجوانت مناسب و پیوند دهنده‌ها در ساختار واکسن نهایی چند اپی توپی انتخاب شدند. سازه برای پیش بینی خواص آنتی ژنی، آلرژی زایی، و فیزیوکوشیمیایی و همچنین ساختارهای دو و سه بعدی به صورت محاسباتی مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفت. در نهایت، مطالعات تحلیلی دیگر با داکینگ مولکولی و کلونینگ <i>in silico</i> انجام شد.</p> <p>یافته‌ها: بر اساس یافته‌های ما، واکسن طراحی شده با ۳۲۰ باقیمانده دارای خواص آنتی ژنی و فیزیوکوشیمیایی مناسبی است. مطالعات اتصال مولکولی بین واکسن توسعه یافته و پنج TLR نشان داد که واکسن بهترین میل و اتصال را با TLR3 و TLR9 دارد. بهینه سازی کدون نشان می‌دهد که <i>E. coli str. K12</i> میزبان مناسبی برای توالی DNA خطی بهینه یافته می‌باشد.</p> <p>نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه واکسن نهایی طراحی شده که بر اساس ۱۵ اپی توپ (۵ اپی توپ سلول B، 5 اپی توپ CTL و ۵ اپی توپ HTL) و ادجوانت می‌باشد، به طور بالقوه دارای خاصیت آنتی ژنی می‌باشد و غیر حساسیت زاست.</p> <p>واژه‌های کلیدی: واکسن، دنگی، محاسبات کامپیوتری، ایمونوانفورماتیک، تب، داکینگ.</p>
دریافت:	
۱۴۰۳/۹/۵	
اصلاح:	
۱۴۰۳/۱۱/۳۰	
پذیرش:	
۱۴۰۴/۲/۱۵	

استناد: عزیزه اسدزاده، کتابون داستان، نفیسه قربانی. طراحی واکسن کایمیریک علیه ویروس دنگی با استفاده از روش‌های ایمونوانفورماتیک و داکینگ. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۵؛ ۲۸: ۱۵. e15.

مقدمه

ویروس دنگی با RNA کوچک، کروی، تک رشته‌ای (طول ۱۱ کیلوبایت)، و پوششی با تقارن بیست وجهی، متعلق به خانواده Flaviviridae است (۱۲). ویروس دنگی دارای ۴ سروتیپ آنتی ژنی متمایز از DENV-1 تا DENV-4 است و همه سروتیپ‌ها می‌توانند باعث عفونت انسان شوند (۳). ویروس دنگی فقط در داخل میزبان تکثیر می‌شود. مراحل مختلف درگیر در چرخه زندگی ویروس دنگی شامل اتصال به سطح سلول میزبان، آزادسازی نوکلئوکسپید، تکثیر ویروس، سنتز و پردازش پروتئین، تشکیل نوکلئوکسپید، تجمع ویروس و انتشار ذرات بالغ ویروس می‌باشند. در نتیجه ترجمه RNA ویروسی، یک پلی پپتید منفرد ایجاد می‌شود. ۱۰ نوع پروتئین (۳ پروتئین ساختاری و ۷ پروتئین غیر ساختاری (NS)) نقش مهمی در ساختار و عملکرد ویروس دنگی دارند. این پروتئین‌های کلیدی شامل پروتئین کسپید (CP)، پروتئین پوششی (EP)، پروتئین غشایی (MP)، NS1، NS2A، NS2B، NS3، NS4A، NS4B و NS5 می‌شوند. پروتئین‌های ساختاری در درجه اول مسئول تجمع ویروس‌ها هستند، در حالی که ورود ویروس، تکثیر، ترجمه، تنظیم فرآیندهای حیاتی و پاتوژنز ویروس به عملکرد پروتئین‌های غیر ساختاری بستگی دارد (۴-۱).

تب دنگی در میان بیماری‌های آربوویروسی سرعت انتقال بالایی دارد و از طریق نیش پشه آندس آلوده به افراد منتقل می‌شود (۳). در فصل بارندگی با گسترش ناقل تعداد عفونت‌ها افزایش می‌یابد. سالانه چند صد میلیون نفر به این ویروس مبتلا می‌شوند. ایران به دلیل موقعیت جغرافیایی و هم مرز بودن با کشورهای بومی همواره در معرض ابتلا به این ویروس است (۵). بیشتر عفونت‌های ناشی از ویروس دنگی بدون علامت هستند و تنها ۲۵٪ منجر به علائم بالینی واضح می‌شوند (۷ و ۶). علائم بر اساس سروتیپ‌ها، تغییرات ژنتیکی و حدت ویروسی، از جمله تب بالا، سردرد شدید، اسپاسم شدید عضلانی، تهوع و استفراغ متفاوت است (۹ و ۸). با توجه به گسترش جهانی این ویروس و عواقب کشنده آن در موارد شدید و تعداد فزاینده‌ای از بیماری‌های عفونی مرتبط با تب دنگی، در سال‌های اخیر این بیماری به یک معضل رو به رشد بهداشت عمومی در سراسر جهان تبدیل شده است (۱۱ و ۱۰).

CYD-TDV اولین واکسن دنگی بود که مجوز دریافت کرد. مطالعات نشان می‌دهد که این واکسن ممکن است خطر ابتلا به بیماری شدیدتر را در افراد دارای سرم منفی افزایش دهد (۱۲). در مورد واکسن TAK-003، اثربخشی به مرور زمان کاهش می‌یابد (۱۳). علاوه بر این، مشکلات دیگری با واکسن دنگی از جمله عوارض جانبی (بثورات خفیف)، ایمن سازی ضعیف و وابستگی به سن گزارش شده است (۱۳ و ۱۲).

در حال حاضر، هیچ داروی ضد ویروسی موثری در برابر ویروس دنگی وجود ندارد و داروهای تجویز شده برای تسکین علائم بیماری در نظر گرفته شده است (۱۴). از سوی دیگر، تولید دارو همیشه فرآیندی بسیار چالش برانگیز، زمان بر و پرهزینه بوده است (۱۵). بنابراین ساخت واکسن مناسب علیه ویروس‌ها یکی از موثرترین راه‌ها برای پیشگیری از این گونه عفونت‌هاست (۱۶). تکنیک تثبیت شده و سریعی که در این زمینه مفید است، ساخت واکسن چند اپی توپی بر اساس تحقیقات مبتنی بر بیوانفورماتیک و رویکرد واکسینومیک است. در این روش قطعات پروتئینی اصلی و کلیدی ویروس برای فیلتر کردن اپی توپ‌های ایمونوژنیک، غیر حساسیت زا و غیر سمی با پتانسیل بالا انتخاب می‌شود. واکسن‌های چند اپی توپی یکپارچه با افزودن ادجوانت‌ها و پیوند دهنده‌ها ساخته شده و در نهایت می‌توان، با روش‌های *in silico*، توانایی و اثربخشی این واکسن‌های طراحی شده را با بررسی خواص فیزیکیوشیمیایی و برهمکنش‌های مولکولی با گیرنده‌های ایمونولوژیک مورد تجزیه و تحلیل قرار داد (۱۸ و ۱۷).

با توجه به اهمیت پیشگیری از ویروس، هدف از این مطالعه طراحی واکسن کایمریک علیه ویروس‌های دنگی با استفاده از روش‌های ایمونو انفورماتیک و داکینگ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر اساس روش تجزیه و تحلیل *in silico* انجام شده است. اولین مرحله در طراحی یک واکسن چند اپی توپی، انتخاب پروتئین هدف است. برای به دست آوردن توالی اسید آمینه پروتئین مورد نظر در فرمت FASTA، از پایگاه داده UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>) که یک منبع رایگان برای توالی‌های پروتئینی است، استفاده شد. بخش مهمی از ناحیه آنتی ژن که به آنتی بادی یا ایمونوگلوبولین متصل می‌شود به عنوان اپی توپ سلول B شناخته می‌شود. از این رو، در این مطالعه، اپی توپ‌های سلول B مناسب با امتیاز ۰/۹۰ با استفاده از سرور ABCpred انتخاب شدند. برای پیش‌بینی اپی توپ‌های CTL بر اساس ۱۱ سوپرتیپ (A1، A2، A3، A24، A26، B7، B8، B27، B29، B44، B58)، نواحی اتصال دهنده توسط سرورهای NetCTL در <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetL> تعیین شدند. تجزیه و تحلیل بیشتر بر روی اپی توپ‌های CTL برای به دست آوردن آل‌های IEDB بر اساس $IC_{50} < 500$ نانومولار با استفاده از پایگاه داده اپی توپ ایمنی (IEDB) انجام شد. در نهایت، اپی توپ‌های لئفوسیت (HTL) T Helper توسط IEDB پیش بینی شد. فرآیند فیلترینگ پس از انتخاب مجموعه مرجع کامل HLA انجام شد.

اپی توپ‌های با مقادیر آنتی ژنی بالقوه به عنوان توالی‌های مناسب برای طراحی نهایی واکسن انتخاب شدند. از طرف دیگر، اپی توپ‌ها باید غیر آلرژیک و غیر سمی باشند. برای مطالعه سمیت، خاصیت آنتی ژنی و آلرژی زایی، از سرور VaxiJen با آستانه ۰/۴، سرور AllerTOP v.2.0 با حساسیت ۹۴٪ و سرور آنالین ToxinPred استفاده شد. سپس، برای ساخت توالی واکسن از لینکرهای خاص جهت پیوستن توالی‌های پپتیدی غربال شده به یکدیگر استفاده شد. پیوند دهنده‌های AAY، KK و GPGPG به ترتیب برای اتصال اپی توپ‌های سلول B، CTL و HTL به یکدیگر استفاده شدند. علاوه بر این، یک ادجوانت انتهایی N سازه اضافه شد تا ایمنی زایی واکسن طراحی شده نهایی را افزایش دهد. به همین دلیل، پروتئین defensin-like (UniProt ID: P81534) با ۶۷ باقی مانده توسط پیوند دهنده EAAAK اضافه شد.

با استفاده از مقدار آستانه ۰/۴، از ابزار VaxiJen v2.0 برای پیش بینی خاصیت آنتی ژنی واکسن طراحی شده استفاده شد. میزان حساسیت زایی واکسن با استفاده از AllerTOP نسخه ۲/۰ ارزیابی شد. سرور ProtParam برای به دست آوردن خواص فیزیکی و شیمیایی ساختمان مانند جرم مولکولی، تعداد اسیدهای آمینه، نقطه ایزوالکتریک (pI)، شاخص ناپایداری، میانگین کل هیدروپاتیکی (GRAVY) و شاخص آلیفاتیک استفاده شد.

برای به دست آوردن میزان ماریچ آلفا، ماریچ ۳۰، ماریچ پی، پل بتا، رشته‌های گسترده، چرخش بتا، پیچ‌های تصادفی و حالت‌های بی نظم از روش پیش‌بینی خود بهینه‌سازی ساختار ثانویه (SOPMA) استفاده شد. برای پیش بینی ساختارهای سه بعدی واکسن طراحی شده از وب سرور I-TASSER استفاده شد. نمودار Ramachandran نیز توسط سرور Ram Plot Analysis ترسیم شد.

یک روش *in silico* برای مطالعه اثربخشی واکسن توسعه یافته در اتصال به گیرنده‌های شبه Toll (TLRs) شبیه‌سازی اتصال مولکولی است. گیرنده‌های TLR3 (PDB ID: 1ziw)، TLR4 (PDB ID: 2z66)، TLR7 (PDB ID: 7CYN)، TLR8 (PDB ID: 3w3g)، TLR-9 (PDB ID: 3WPF) از سایت PDB بازیابی شدند. سرور HDock برای مطالعه تعاملات و امتیازات اتصال آن‌ها استفاده شد. به منظور تسهیل فرآیند پردازش، مولکول‌های آب و مولکول‌های اضافی از گیرنده‌ها حذف شدند. پس از انجام داکینگ، کمپلکس‌های گیرنده - واکسن بر اساس کمترین سطح انرژی انتخاب شدند. در نهایت، Discovery Studio 2024 Client برای تجسم و تجزیه و تحلیل تعاملات بین واکسن طراحی شده و ۵ گیرنده استفاده شد. بهینه سازی کدون به طور قابل توجهی بر بیان پروتئین تأثیر می‌گذارد. BCCM/GeneCorner برای ساخت توالی DNA خطی واکسن استفاده شد و در نهایت، بهینه سازی کدون با استفاده از ابزار Java Codon Matching Tool (JCat) انجام شد.

یافته ها

توالی‌های آمینواسید پروتئین ژنوم ویروس دنگی با ۳۳۹۱ اسید آمینه در طول و شماره دسترسی: Q9WDA6 با فرمت FASTA دانلود شد. این پروتئین حاوی پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری است.

پس از استفاده از سرور ABCpred، NetCTL و IEDB، سه نوع اپی توپ B-cell، CTL و HTL انتخاب شدند. سپس از بین آن‌ها توالی‌های غیر آلرژیک و غیر سمی با سطوح آنتی ژنی مناسب برای ساخت واکسن چند اپی توپ فیلتر شدند. انتخاب نهایی از سه نوع اپی توپ در جدول ۱ فهرست شده است.

جدول ۱. لیست توالی‌های پپتیدی نهایی از سه نوع اپی توپ

B-cell epitopes					
Peptide Sequence	Start position	Score	Antigenicity	ALLergenicity	Toxicity
MVMVGATMTDDIGMGV	1184	0.96	1.0789	NA	NT
IGVIITWIGMNSRSTS	739	0.94	1.3065	NA	NT
YGTVTMECSPRTGLDF	458	0.94	1.0978	NA	NT
KGKRIEPSWADVKKDL	36	0.95	1.2132	NA	NT
RRLTIMDLHPGAGKTK	161	0.94	1.5056	NA	NT
CTL epitopes					
Peptide Sequence	Start position	NetCTL alleles	IEDB alleles (IC50<500 nM)	Antigenicity	ALLergenicity and Toxicity
LMMRTTWAL	2425	A2,A24,B8,B39,B58,B62	HLA-A*02:01 HLA-A*02:06	1.1235	NA/NT

			HLA-B*08:01 HLA-A*02:03 HLA-A*32:01 HLA-B*15:01 HLA-B*35:01		
FRKRRLTIM	1658	B8,B27	HLA-B*08:01	1.1135	NA/NT
ETACLGKSY	3241	A1, B26,B62	HLA-A*26:01	0.8757	NA/NT
GSAKLRWFV	2549	A1	HLA-A*68:02 HLA-A*02:06 HLA-A*30:01	0.6448	NA/NT
QEHETSWHY	2777	A1,B44,B62	HLA-B*44:03 HLA-B*44:02	0.9286	NA/NT
Peptide Sequence	Start position	HTL epitopes IEDB ALLELE	Antigenicity	ALLergenicity	Toxicity
GMGVTYLALLAAFK	1195	HLA-DRB1*01:01 HLA-DRB5*01:01 HLA-DRB1*04:05 HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*11:01 HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01 HLA-DRB1*09:01 HLA-DRB1*04:01 HLA-DRB1*07:01 HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01 HLA-DRB4*01:01 HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01 HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01 HLA-DRB1*08:02	1.1007	NA	NT
LALKEFKEFAAGRKS	2080	HLA-DRB5*01:01 HLA-DRB1*15:01 HLA-DRB1*01:01 HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02 HLA-DRB1*11:01 HLA-DRB1*09:01	0.8187	NA	NT
GAKRMAILGDTAWDF	688	HLA-DRB3*01:01 HLA-DRB1*03:01 HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01 HLA-DRB1*01:01	1.1193	NA	NT
GKIVQPENLEYTVVI	407	HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02	0.8959	NA	NT
TGNMSFRDLGRVMVM	1172	HLA-DRB1*11:01 HLA-DRB1*01:01 HLA-DRB5*01:01 HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02 HLA-DRB1*08:02 HLA-DRB1*07:01 HLA-DRB4*01:01 HLA-DRB1*13:02 HLA-DRB1*15:01	1.1141	NA	NT

*NA: Non-Allergic; NT: Non-Toxic

واکسن نهایی چند اپی توپی توسط پروتئین defensin-like به عنوان ادجوانت، ۵ اپی توپ سلول B، 5 اپی توپ CTL، و ۵ اپی توپ HTL، پیوند دهنده EAAAK، پیوند KK، پیوند دهنده AAY، و پیوند دهنده GPG ساخته شد. ساختار واکسن نهایی چند اپی توپی در شکل ۱ نشان داده شده است.

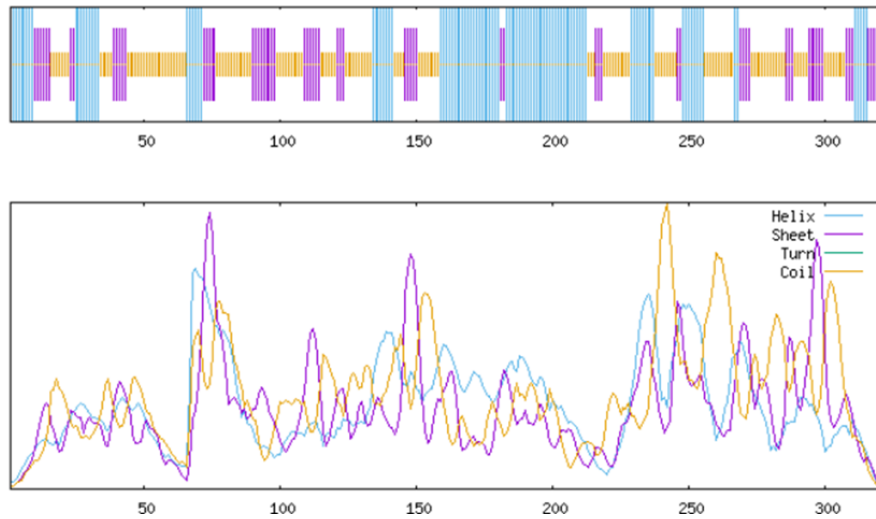


MRIHYLLFALLFLVVPVPGHGGIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRKCCRRK
 KEAAAK
 MVMVGATMTDDIGMGVkkIGVIITWIGMNSRSTSkkYGTVTMECSPRTGLDFkkKGKRIEPSWAD
 VKKDLkk
 RRLTIMDLHPGAGKTKAAYLMMRTTWALAAAYFRKRRLTIMAAAYETACLKSYAAAYGSAKLRW
 FVAAAY
 QEHETSWHYGPGPGIGMGVTYLALLAAFKGPGPGLALKEFKEFAAGRKS GPGPGGAKRMAILGD
 TAWDFGPGPG GKIVQPENLEYTVVIGPGPGTGNMSFRDLGRVMVM

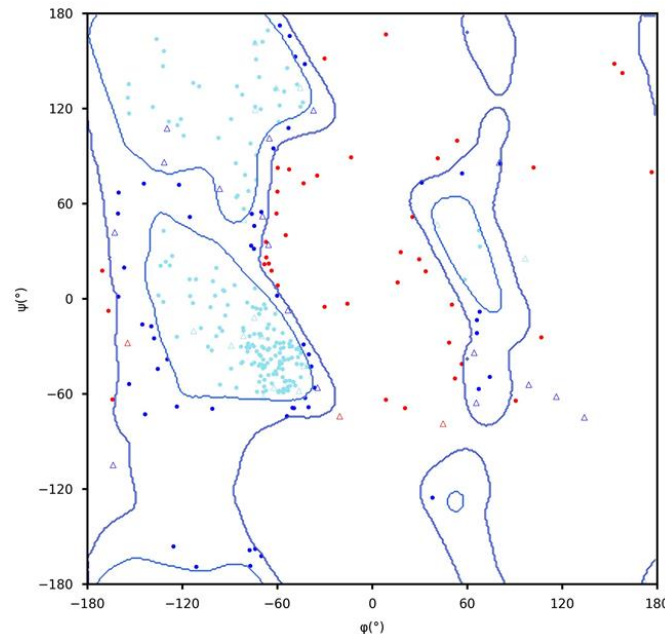
شکل ۱. ساختار واکسن نهایی چند اپی توپی

نتایج سرورهای Vaxijen V2.0 و AllerTOP V2.0 نشان می‌دهد که واکسن طراحی شده حساسیت زا نیست و خاصیت آنتی ژنی آن ۰/۷۸۵۹ می‌باشد. پس از تجزیه و تحلیل بیشتر واکسن طراحی شده توسط سرور ProtParam، جرم مولکولی، تعداد اسیدهای آمینه، نقطه ایزوالکتریک (pI)، شاخص ناپایداری، میانگین کل هیدروپاتیکیک و شاخص آلیفاتیک به ترتیب ۳۵/۰۰۵ کیلو دالتون، ۳۲۰، ۱۰/۰۴، ۳۴/۶۰، ۰/۱۴۴، ۷۵/۹۷ محاسبه شد. بر اساس نتایج سرور SOPMA، طول توالی واکسن طراحی شده ۳۲۰ اسید آمینه است که ۱۰۹ باقیمانده (۳۴/۰۶٪) در تشکیل مارپیچ آلفا، ۶۸ باقیمانده (۲۱/۲۵٪) در ساختار extended strand و ۱۴۳ باقیمانده (۴۴/۶۹٪) در ساختارهای تصادفی مشارکت دارند. از بین ۵ مدل نهایی برتر برای ساختارهای سه بعدی واکسن طراحی شده توسط مدل I-TASSER مدل با $C\text{-score} = -۴/۷۴$ ، $TM\text{-score} = ۰/۲۳ \pm ۰/۰۶$ و $RMSD = ۱۸/۵ \pm ۲$ انتخاب شد. ساختارهای دو بعدی و سه بعدی پیش بینی شده و نمودار رامچاندوران واکسن طراحی شده در شکل های ۲-۴ نشان داده شده است.

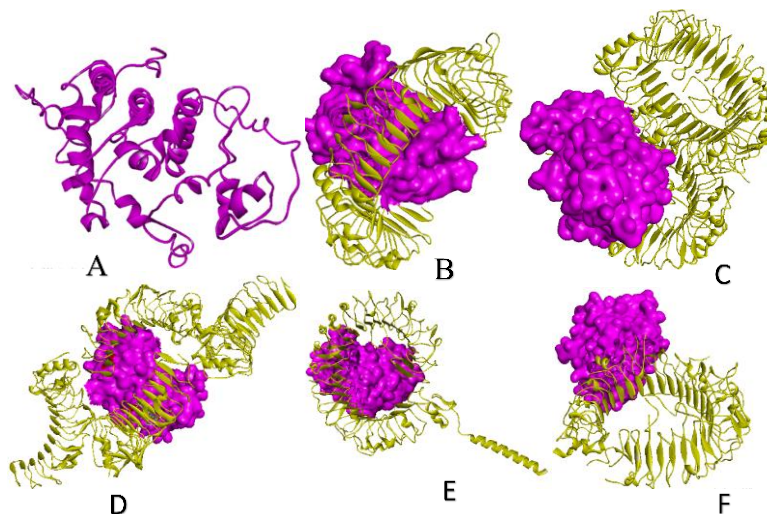
توسط سرور HDock اتصال واکسن طراحی شده و TLRها انجام شد. در بین ۱۰ کمپلکس برای هر گیرنده، کمترین مقدار انرژی در نظر گرفته شد. کمترین مقادیر انرژی برای واکسن-1ziw، واکسن-2z66، واکسن-7cyn، واکسن-3w3g، واکسن-3wpf به ترتیب ۳۴۲/۷۳، ۳۰۵/۶۰ و ۳۲۴/۸۵ محاسبه شدند. نتایج شبیه‌سازی‌های اتصال مولکولی در Discovery Studio 2024 Client مشاهده و تجزیه و تحلیل شد. شکل ۴ بهترین شکل فضایی از مجموعه حاوی واکسن و پنج نوع مختلف گیرنده را نشان می‌دهد.



شکل ۲. ساختار دو بعدی پیش بینی شده برای واکسن طراحی شده



شکل ۳. نمودار دو بعدی رامچاندران. رنگ‌های فیروزه‌ای آبی و قرمز (نقطه‌ها/مثلث‌ها) به ترتیب نمایانگر زوایای چرخشی در مناطق مطلوب، مجاز و غیرمجاز هستند. نقطه‌ها نشان دهنده باقی مانده‌های غیر از گلیسین و مثلث‌ها نمایانگر گلیسین هستند.



شکل ۴. (الف) ساختار سه بعدی واکسن طراحی شده، (ب) بهترین شکل فضایی کمپلکس 1ziw و واکسن، (C) بهترین شکل فضایی کمپلکس 3w3g و واکسن، (د) بهترین شکل فضایی کمپلکس 2z66 و واکسن (E) بهترین شکل فضایی کمپلکس 7CYN و واکسن، بهترین شکل فضایی کمپلکس 3WPF و واکسن

در نهایت، توالی ۳۲۰ اسید آمینه‌ای به یک توالی پایه ۹۶۰ بازی توسط کدون‌های احتمالی ترجمه شدند. بر اساس نتایج سرور آنلاین JCAT، اثرشیاکلی سویه K12 میزبان مناسبی برای توالی DNA خطی بهبود یافته با محتوای سیتوزین- گوانینین ۵۶/۶۷٪ و شاخص سازگاری کدون ۰/۹۴ می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه واکسن نهایی طراحی شده که بر اساس ۱۵ اپی توپ (۵ اپی توپ سلول B، ۵ اپی توپ CTL و ۵ اپی توپ HTL) و ادجوانت می‌باشد، به طور بالقوه دارای خاصیت آنتی ژنی می‌باشد و غیر حساسیت زاست. ساختار ثانویه غالب واکسن طراحی شده از ماریچ آلفا و پیچ‌های تصادفی تشکیل شده است. آنتی ژن‌های ساختاری شامل نواحی پروتئینی باز شده و کویل‌های پیچیده هستند. افزایش در این دو ساختار ممکن است به توانایی شناسایی آنتی بادی‌های تولید شده به دنبال عفونت کمک کند (۱۹). تحقیقات Céspedes و همکاران نشان می‌دهد که ساختارهای coiled-coil آلفا پروتئین در پاتوژن‌ها باعث تحریک تولید آنتی بادی‌های خاص می‌شود (۲۰).

نقطه ایزوالکتریک و شاخص ناپایداری ساختار نهایی نشان دهنده ماهیت اساسی و میزان پایداری واکسن‌ها است. با توجه به میانگین کل محاسبه شده هیدروپاتیک، واکسن طراحی شده آبدوست است که ممکن است منجر به بهبود تعاملات پروتئین-پروتئین و انحلال در آب آن شود. Tahir Ul Qamar و همکاران، که روی طراحی واکسن پپتید مبتنی بر اپی توپ کار کرده‌اند، گزارش کردند که ناحیه آبدوست پروتئین به طور کلی بر روی سطح آشکار است و نقش مهمی در برانگیختن پاسخ ایمنی دارد (۲۱). علاوه بر این، پاسخ ایمنی سلولی و هومورال در برابر پاتوژن هدف نیازمند اتصال مولکول‌های ساختاری واکسن با گیرنده‌های ایمنی میزبان می‌باشد.

مطالعات داکینگ بین واکسن توسعه‌یافته و TLR ها نشان داد که واکسن به خوبی با هر ۵ نوع گیرنده تعامل دارد و میل ترکیبی برای اتصال به گیرنده‌ها به ترتیب TLR3 (PDB ID: 1ziw) > TLR-9 (PDB ID: 3WPF) > TLR4 (PDB ID: 2z66) > TLR7 (PDB ID: 7CYN) > TLR8 (PDB code: 3w3g) است.

بهترین میل و ترکیب در واکسن TLR3 و واکسن TLR9 مشاهده شد. بخش مهمی از شناسایی پاتوژن و فعال سازی ایمنی ذاتی توسط TLR3 انجام می‌شود (۲۲). اکثر عفونت‌های ویروسی RNA دو رشته‌ای (dsRNA) تولید می‌کنند که TLR3 گیرنده خوبی برای آن‌ها است (۲۶-۲۲). پس از شناسایی الیگونوکلوئوتیدهای dsRNA، TLR3 با فعال کردن IRF3، تولید اینترفرون‌های نوع I را افزایش می‌دهد که بر سلول‌های T تأثیر می‌گذارد (۲۲ و ۲۷).

همه این مسیرها در نهایت منجر به افزایش فعالیت ضد ویروسی در سیستم دفاعی می‌شود. ۱۳ اسید آمینه از TLR3 در تشکیل پیوندهای هیدروژنی با واکسن طراحی شده از جمله ASP280، ASN229، ARG331، LYS335، ASP364، TYR307، SER206، GLU639، HIS39، HIS۱۵۶، LYS330، GLU203 و PHE84 دخیل هستند.

TLR9 در اندوزوم‌ها، لیزوزوم‌ها و شبکه آندوپلاسمی یافت می‌شود (۲۸). این گیرنده با توجه به ویژگی‌هایش فقط با DNA بیگانه تعامل دارد. DNA باکتری و ویروسی اغلب حاوی بخش‌های CpG غیر متیله است که TLR9 می‌تواند آن‌ها را شناسایی کند (۳۰ و ۲۹). ۶ اسید آمینه TLR9 در تشکیل پیوندهای هیدروژنی در برهمکنش واکسن - TLR9 نقش دارند که شامل ASP650، ASN599، PHE569، HIS574، GLY627 و TYR537 می‌باشند. از آنجا که در توسعه واکسن‌ها، اطمینان از بیان واکسن تولید شده در یک سیستم بیانی خاص ضروری است، بهینه‌سازی کدون انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، اثرشیاکلی سویه K12 میزبان مناسبی برای توالی DNA خطی می‌باشد.

در این مطالعه، تکنیک‌های مختلف *in silico* و ایمونو انفورماتیک برای ایجاد یک واکسن کایمریک علیه ویروس دنگی و تأیید خواص آن استفاده شد. با این حال، مطالعات بیشتر مانند آزمایش‌های *in vitro* و *in vivo* در فاز بعدی باید برای بررسی ایمنی و کارایی این سازه مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت و تشویق تمامی اعضای مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان قدردانی می‌گردد.

References

- 1.Khan MB, Yang ZS, Lin CY, Hsu MC, Urbina AN, Assavalapsakul W, et al. Dengue overview: An updated systemic review. *J Infect Public Health*. 2023;16(10):1625-42.
- 2.Kok BH, Lim HT, Lim CP, Lai NS, Leow CY, Leow CH. Dengue virus infection - a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. *Virus Res*. 2023;324:199018.
- 3.Pescador Ruschel MA, Panda PK, Farmer A. Dengue Fever. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430732/>
- 4.Kularatne SA, Dalugama C. Dengue infection: Global importance, immunopathology and management. *Clin Med (Lond)*. 2022;22(1):9-13.
- 5.Heydari M, Metanat M, Rouzbeh-Far MA, Tabatabaei SM, Rakhshani M, Sepehri-Rad N, et al. Dengue Fever as an Emerging Infection in Southeast Iran. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(5):1469-71.
- 6.Swaminathan S, Khanna N. Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios. *Int J Infect Dis*. 2019;84:S80-6.
- 7.Roy MG, Islam MM, Singh A. Prevalence of dengue virus, their infection, diagnosis, and challenges. *J Appl Biol Biotechnol*. 2023;11(3):20-7.
- 8.Unissa R, Jyothirmayi B, Mounica A, Tejaswini L, Latha GA, Nishitha G, et al. Dengue. *Asian J Res Pharm Sci*. 2018;8(4):192-202.
- 9.Sampat PR. A literature review on dengue. *Int J Res Eng Sci Manag*. 2021;4(7):401-5.
- 10.Yang X, Quam MBM, Zhang T, Sang S. Global burden for dengue and the evolving pattern in the past 30 years. *J Travel Med*. 2021;28(8):taab146.
- 11.Wong JM, Adams LE, Durbin AP, Muñoz-Jordán JL, Poehling KA, Sánchez-González LM, et al. Dengue: A Growing Problem With New Interventions. *Pediatrics*. 2022;149(6):e2021055522.
- 12.Zeyaulah M, Muzammil K, AlShahrani AM, Khan N, Ahmad I, Alam MS, et al. Preparedness for the Dengue Epidemic: Vaccine as a Viable Approach. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(11):1940.
- 13.Rivera L, Biswal S, Sáez-Llorens X, Reynales H, López-Medina E, Borja-Tabora C, et al. Three-year Efficacy and Safety of Takeda's Dengue Vaccine Candidate (TAK-003). *Clin Infect Dis*. 2022;75(1):107-17.
- 14.Patel JP, Saiyed F, Hardaswani D. Dengue Fever Accompanied by Neurological Manifestations: Challenges and Treatment. *Cureus*. 2024;16(5):e60961.
- 15.Bano I, Butt UD, Mohsan SAH. New challenges in drug discovery. In: *Novel Platforms for Drug Delivery Applications*. Das S, Thomas S, Das PP, editors. Elsevier; 2022. p. 619-43.
- 16.Saha O, Razzak A, Sarker N, Rahman N, Zahid Ab, Sultana A, et al. In silico design and evaluation of multi-epitope dengue virus vaccines: a promising approach to combat global dengue burden. *Discov Appl Sci*. 2024;6(4):210.
- 17.Shams Moattar F, Asadzadeh A, Heydari M, Zamani M, Esnaashari F, Jeldani F. Designing multi-epitope subunit vaccine candidate for Zika virus utilizing in silico tools. *Res Mol Med*. 2022;10(1):9-18.
- 18.Asadzadeh A, Dastan K, Ghorbani N. Designing a novel multi-epitope chimeric vaccine candidate for human papillomavirus by vaccinomic approach. *Physiol Pharmacol*. 2024;28(1):80-90.
- 19.Long Q, Wei M, Wang Y, Pang F. Design of a multi-epitope vaccine against goatpox virus using an immunoinformatics approach. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;13:1309096.

- 20.Céspedes N, Li Wai Suen CSN, Koepfli C, França CT, Felger I, Nebie I, et al. Natural immune response to Plasmodium vivax alpha-helical coiled coil protein motifs and its association with the risk of P. vivax malaria. PLoS One. 2017;12(6):e0179863.
- 21.Tahir Ul Qamar M, Saleem S, Ashfaq UA, Bari A, Anwar F, et al. Epitope-based peptide vaccine design and target site depiction against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: an immune-informatics study. J Transl Med. 2019;17(1):362.
- 22.Chen Y, Lin J, Zhao Y, Ma X, Yi H. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. J Zhejiang Univ Sci B. 2021;22(8):609-32.
- 23.Sen GC, Sarkar SN. Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16(1):1-14.
- 24.Ha Y-E, So YJ, Im J, Yun C-H, Park J-C, Han SH. TLR3 recognition of viral double-stranded RNA in human dental pulp cells is important for the innate immunity. Int Immunopharmacol. 2023;119:110161.
- 25.McGarry N, Murray CL, Garvey S, Wilkinson A, Tortorelli L, Ryan L, et al. Double stranded RNA drives anti-viral innate immune responses, sickness behavior and cognitive dysfunction dependent on dsRNA length, IFNAR1 expression and age. Brain Behav Immun. 2021;95:413-28.
- 26.Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. Biochem Pharmacol. 2021;183:114316.
- 27.Al Hamrashdi M, Brady G. Regulation of IRF3 activation in human antiviral signaling pathways. Biochem Pharmacol. 2022;200:115026.
- 28.Babdor J, Descamps D, Adiko AC, Tohmé M, Maschalidi S, Evnouchidou I, et al. IRAP⁺ endosomes restrict TLR9 activation and signaling. Nat Immunol. 2017;18(5):509-18.
- 29.Mandal DP, Bhattacharjee S. Nucleic Acid-Mediated Inflammatory Diseases. In: Nucleic Acid Biology and its Application in Human Diseases. Chatterjee S, Chattopadhyay S, editors. Springer; 2023. p. 35-59.
- 30.Di Vincenzo F, Yadid Y, Petito V, Emoli V, Masi L, Gerovska D, et al. Circular and Circulating DNA in Inflammatory Bowel Disease: From Pathogenesis to Potential Molecular Therapies. Cells. 2023;12(15):1953.