

Original article

Computational Design of a VLP-based Multi-Epitope Peptide Vaccine Candidate against Breast Cancer

Nasim Hajighahramani^{*1}, Fatemeh Ghasempour^{1, 2}

1. Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2. Students Research Committee, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

** Corresponding author.* Tel: +984533522437, Fax +984533522197, E-mail: n.hajighahramani@arums.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Jul 1, 2025

Accepted: Aug 21, 2025

Keywords:

Breast Cancer

Epitope

Immunoinformatics

Vaccine

Virus-like Particles

ABSTRACT

Background: Breast cancer is a leading cause of cancer-related mortality in women, and finding effective treatments is essential. Among different cancer immunotherapy strategies, vaccines play a prominent role. This study aimed to design a multi-epitope peptide vaccine based on Virus-Like Particles (VLP) against breast cancer using computational methods.

Methods: Antigen sequences of HER2, MUC1, Alpha lactalbumin, Mammaglobin-A and the MS2 adjuvant were retrieved. T-helper (HTL) and cytotoxic T lymphocyte (CTL) inducing epitopes were identified using servers such as IEDB, and their antigenicity and allergenicity were analyzed. Molecular docking was performed using HPEPDOCK between selected epitopes and corresponding MHC molecules. The best selected epitopes and adjuvants were connected by linkers. The designed vaccine's properties, including allergenicity, antigenicity, solubility, and physicochemical properties were assessed. B-cells and IFN- γ inducing epitopes were identified. Finally, the vaccine's 3D structure was modeled, refined, and validated.

Results: Epitopes from HER2, MUC1, Alpha lactalbumin, and Mammaglobin-A were identified through immunoinformatics analyses and selection of common HLAs in Iran. The 3D structure of the vaccine was designed, optimized, and validated, showing good stability, solubility, and antigenicity.

Conclusion: This study designed a VLP-based subunit vaccine with adjuvant properties that can enhance antigen presentation and induce robust B and T lymphocyte responses. The vaccine is a promising candidate for preventive or therapeutic use against breast cancer, though experimental and clinical studies are necessary to confirm its efficacy.

How to cite this article: Hajighahramani N, Ghasempour F. Computational Design of a VLP-based Multi-Epitope Peptide Vaccine Candidate against Breast Cancer. J Ardabil Univ Med Sci. 2025;25(2):181-209.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

Extended Abstract

Background: Breast cancer is among the most common and deadly cancers affecting women worldwide, with over 2.3 million new cases documented in 2022, representing roughly 11.6% of all cancer diagnoses globally. It is a molecularly heterogeneous disease, primarily characterized by the expression of key tumor markers, including estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). These markers allow classification into three major subtypes: hormone receptor-positive (HR+), HER2-positive, and triple-negative breast cancer (TNBC). HR+ tumors, expressing ER and PR, constitute 60–75% of cases, HER2-positive tumors 20–25%, and TNBC approximately 15%, the latter being highly aggressive and often more responsive to chemotherapy.

Overexpression of membrane-associated receptors such as HER2, HER3, EGFR, c-MET, and MUC1 is strongly associated with tumor aggressiveness, proliferation, and metastatic potential. Among these, MUC1 is highly expressed in around 90% of breast cancers, particularly in ER-positive tumors, and plays a pivotal role in tumor growth, invasion, and progression. Additionally, secretory proteins such as mammaglobin-A and alpha-lactalbumin, overexpressed in many breast tumors, have been proposed as immunotherapeutic targets, with prior studies showing that immunization strategies targeting these antigens can inhibit tumor growth effectively. Lymph node involvement further serves as a crucial prognostic factor, guiding clinical decision-making.

Despite advances in conventional therapies, including surgery, chemotherapy, radiotherapy, and targeted therapies, breast cancer remains a major global health challenge, highlighting the urgent need for innovative interventions such as cancer vaccines. Peptide-based vaccines, derived from tumor-associated antigens, are capable of stimulating both CD4+ helper T

lymphocytes (HTLs) and CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) via MHC class II and MHC class I presentation, respectively. However, the limited length of peptides and their susceptibility to enzymatic degradation often reduce immunogenicity. To overcome these limitations, multi-epitope constructs combined with potent adjuvants, such as virus-like particles (VLPs), have been explored to enhance immune responses. VLPs are composed of self-assembling viral structural proteins that lack viral genetic material, providing a repetitive surface capable of strong B-cell activation and improved antigen presentation. Moreover, VLPs facilitate both MHC-I and MHC-II pathways, making them ideal carriers for therapeutic cancer vaccines. Among various VLP systems, bacteriophage MS2, with a single-stranded RNA genome and icosahedral structure, has emerged as a reliable and effective platform for vaccine delivery.

Methods: In this study, four breast cancer-associated antigens—HER2, MUC1, alpha-lactalbumin, and mammaglobin-A—along with the MS2 bacteriophage capsid protein as a VLP adjuvant, were retrieved from UniProt. Extracellular sequences were used for HER2 and MUC1, while full sequences were used for secretory proteins alpha-lactalbumin, and mammaglobin-A. Common HLA alleles in the Iranian population (HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-DRB1*04/11/15) were selected using the Allele Frequency Net Database.

CTL and HTL epitopes were predicted using IEDB and NetMHCIIpan-4.0, respectively, and evaluated for antigenicity (VaxiJen v2.0, ANTIGENpro) and allergenicity (AllerTOP v2.0). 3D structures of epitopes were modeled via PEP-FOLD3, while HLA molecules were obtained from PDB and prepared for docking. Molecular docking of epitopes with HLA alleles was performed using HPEPDOCK, and IFN- γ -inducing HTL epitopes were predicted using IFNepitope.

Selected epitopes were linked via GPMPG linkers, fused to SpyTag-SpyCatcher

sequences, and combined with MS2 capsid protein to construct a VLP-based vaccine. Physicochemical properties were analyzed using ProtParam, solubility via Protein-Sol and SOLpro, and B-cell epitopes were predicted using BCPred and CBTOPE. The vaccine's 3D structure was modeled with Phyre2, refined using locPREFMD, and validated using ProSA-web and PSVS to ensure structural integrity and immunogenic potential.

This integrative immunoinformatics workflow ensured a rational design of a VLP-based multi-epitope vaccine with predicted stability, solubility, and capacity to elicit both humoral and cellular immunity.

Results: The vaccine constructs demonstrated strong antigenicity, non-allergenicity, and favorable physicochemical properties, with a predicted molecular weight of approximately 42 kDa and theoretical pI around 6.8. Epitope mapping confirmed the presence of multiple CTL and HTL epitopes, ensuring broad T-cell activation. Molecular docking analyses with HLA-A02, HLA-A24, and HLA-DRB1*04 validated stable binding and effective antigen presentation potential, with docking scores ranging from -180 to -250 kcal/mol.

B-cell epitope prediction identified several linear and conformational epitopes capable of eliciting humoral responses, while IFN- γ -inducing epitopes suggested potential for robust Th1-type cellular immunity. The 3D structure was refined, and Ramachandran plot analysis indicated that over 90% of residues were located in favored regions, demonstrating favorable folding and structural stability. Solubility predictions confirmed suitability for experimental production and administration. Overall, the multi-epitope VLP-based vaccine design indicated strong potential to activate both

innate and adaptive immunity, covering multiple breast cancer subtypes.

Discussion: This study highlights the advantages of integrating multiple tumor-associated antigens into a single VLP-based vaccine construct. By incorporating HER2, MUC1, alpha-lactalbumin, and mammaglobin-A, the vaccine aims to address tumor heterogeneity and broaden immune coverage across diverse breast cancer subtypes. The use of MS2 as an adjuvant enhances antigen presentation and provides repetitive antigenic surfaces that stimulate robust B-cell responses, supporting both humoral and cellular immunity. The combination of epitope prediction, molecular docking, and structural modeling ensured that the selected epitopes could effectively bind prevalent HLA alleles, maximizing population coverage and immune responsiveness. Physicochemical, solubility, and structural analyses further indicate that the vaccine construct is stable and suitable for production, storage, and administration. Altogether, these findings indicate that the proposed vaccine construct has favorable immunogenic and structural characteristics that justify further investigation.

Conclusion: In conclusion, this immunoinformatics-driven strategy presents a novel multi-epitope peptide vaccine with promising immunogenicity, structural stability, and favorable physicochemical properties. Its capacity to elicit both B- and T-cell responses positions it as a potential candidate for preventive and therapeutic applications, complementing existing treatment strategies. Nevertheless, in vitro immunogenicity and in vivo preclinical studies are essential to confirm safety, efficacy, and protective potential before clinical use, to improve outcomes for patients across diverse breast cancer subtypes.

طراحی محاسباتی واکسن پپتیدی چنداپی‌توپی مبتنی بر ذرات شبه‌ویروسی (VLP) به‌عنوان واکسن کاندید علیه سرطان سینه

نسیم حاجی قهرمانی^{۱*}، فاطمه قاسم پور^۲

۱. گروه فارماسیوتیکس و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۲۲۴۳۷ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۲۲۱۹۷ پست الکترونیک: n.hajighahramani@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه یکی از علل مهم مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است و یافتن درمان های موثر برای آن ضروری می باشد. در میان استراتژی های مختلف در ایمنی درمانی سرطان، واکسن ها نقش برجسته ای دارند. هدف این مطالعه طراحی واکسن پپتیدی چنداپی‌توپی مبتنی بر ذرات شبه‌ویروسی (VLP، Virus-Like Particles) علیه سرطان سینه با استفاده از روش های محاسباتی بود.

روش کار: توالی آنتی ژن های HER2، MUC1، Alpha lactalbumin و Mammaglobin-A و ادجوانت MS2 بازیابی شد. اپی‌توپ های القاکننده سلول های T (CTL و HTL) با استفاده از سرورهای مثلIEDB شناسایی و ویژگی های آنتی ژنیسیته و آلرژنیسیته آن ها بررسی شد. کنش مولکولی بین اپی‌توپ های انتخاب شده با MHC مربوطه توسط HPEPDOCK انجام شد. بهترین اپی‌توپ ها و ادجوانت توسط لینکر بهم متصل شدند. خواص واکسن طراحی شده از جمله آلرژنیسیته، آنتی ژنیسیته، حلالیت و خصوصیات فیزیکوشیمیایی بررسی شد. اپی‌توپ های القا کننده IFN- γ و لنفوسیت های B شناسایی شدند. در نهایت، ساختار سه بعدی واکسن طراحی، تصحیح و اعتبارسنجی شد.

یافته ها: اپی‌توپ های پروتئین های HER2، MUC1، Alpha lactalbumin و Mammaglobin-A با استفاده از آنالیزهای ایمونوآنفورماتیک و انتخاب HLA های رایج در ایران شناسایی شدند. ساختار سه بعدی واکسن طراحی، بهینه سازی و اعتبارسنجی شد که از پایداری، محلولیت و آنتی ژنیسیته مناسبی برخوردار بود.

نتیجه گیری: در این تحقیق، یک واکسن زیرواحدی ادجوانت دار مبتنی بر ذرات شبه‌ویروسی طراحی شد. که با بهبود ارائه آنتی ژن و القای پاسخ قوی لنفوسیت های B و T، می تواند اثربخشی بالاتری داشته باشد. این واکسن کاندید بالقوه ای برای استفاده پیشگیرانه یا درمانی سرطان سینه است، اما انجام مطالعات آزمایشگاهی و بالینی. برای تعیین اثربخشی واقعی ضروری است.

واژه های کلیدی: سرطان سینه، اپی‌توپ، ایمونوآنفورماتیک، واکسن، ذرات شبه ویروسی

دریافت: ۱۴۰۴/۴/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۳۰

مقدمه

سرطان سینه به عنوان شایع‌ترین سرطان در میان زنان، در سال ۲۰۲۲ با حدود ۲/۳ میلیون مورد جدید، معادل ۱۱/۶ درصد از کل موارد ابتلای به سرطان در جهان را شامل شد [۱]. سرطان سینه به طور کلی به عنوان یک بیماری مولکولی ناهمگون^۱ شناخته شده است. برای طبقه‌بندی مولکولی سرطان سینه، سه گیرنده ویژه نقش کلیدی به عنوان نشانگرهای توموری ایفا می‌کنند: گیرنده استروژن^۲ (ER)، گیرنده پروژسترون^۳ (PR) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی^۴ (HER2). بر اساس این گیرنده‌ها سه زیرگروه مهم سرطان سینه شامل: (الف) گیرنده هورمونی مثبت، (ب) HER2 مثبت، و (ج) سرطان‌های سه‌گانه منفی در نظر گرفته شده است. تومورهایی که گیرنده‌های ER و PR را بیان می‌کنند، گیرنده هورمونی مثبت نامیده می‌شوند و حدود ۶۰ تا ۷۵ درصد از کل موارد سرطان سینه را شامل می‌شوند. سرطان سینه HER2 مثبت حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد موارد را در بر می‌گیرد و رشد آن‌ها به بیان ژن HER2 بستگی دارد. در نهایت، تومورهای فاقد ER، PR، و/یا HER2 سه‌گانه منفی نامیده می‌شوند و حدود ۱۵ درصد از سرطان‌های مهاجم سینه را تشکیل می‌دهند و معمولاً رشد سریع‌تر و حساسیت بیشتری به شیمی درمانی دارند. این سه گیرنده نقش مهمی در تصمیم‌گیری‌های درمانی ایفا می‌کنند [۲]. ویژگی‌های تهاجمی سرطان سینه عمدتاً ناشی از بیان بیش از حد گیرنده‌های مهم تراغشایی^۵ با میل ترکیبی بالا مانند HER2، HER3، EGFR^۶، c-MET و پروتئین اپیتلیال غشایی به نام موسین-۱ (MUC1) است. MUC1 در حدود ۹۰ درصد از

بیماران مبتلا به سرطان سینه به میزان زیادی بیان می‌شود و نقش مهمی در رشد تومور، افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی و متاستاز خصوصاً در سلول‌های ER مثبت دارد [۳]. در سرطان سینه، وجود بیماری در غدد لنفاوی زیر بغل^۷ (ALN) یک عامل مهم پیش‌آگهی است و تصمیم‌گیری درمانی را هدایت می‌کند. Mammaglobin-A به عنوان یک هدف سطح سلولی تایید شده است که در نمونه‌های بیماران ALN مثبت بیان می‌شود اما در غدد لنفاوی طبیعی وجود ندارد [۴]. این پروتئین ترشحی ۹۳ اسید آمینه‌ای در ۴۰ تا ۸۰ درصد از زیرگروه‌های اصلی سرطان سینه بیش از حد بیان می‌شود [۵].

Alpha lactalbumin پروتئین ترشحی مرتبط با شیردهی، در ۵۵ تا ۶۰ درصد تومورهای سینه بیان می‌شود و مطالعات نشان داده‌اند که ایمن‌سازی علیه آن می‌تواند رشد تومورهای سینه را مهار کند [۶]. با وجود روش‌های درمانی متعدد، سرطان سینه همچنان مشکل جدی بهداشتی است و توسعه راهکارهای نوین از جمله واکسن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. واکسن‌های پپتیدی، که از آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور مشتق شده‌اند، قادر به تحریک پاسخ سلولی T در حضور مولکول‌های MHC کلاس I یا II هستند و می‌توانند پاسخ CD4⁺ و CD8⁺ را به طور موثر القا کنند. بنابراین، شناسایی پپتیدهای مناسب سازگار با تغییرات طبیعی آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی^۸ (HLA) مهم است [۳]. واکسن‌های پپتیدی به دلیل طول کوتاه زنجیره پپتید و حساسیت به تخریب، دارای ایمنی زایی نسبتاً ضعیفی هستند. ترکیب پپتیدهای مختلف تحت عنوان واکسن‌های چنداپی‌توپی همراه با ادجوانت، یک راهکار مهم برای بهبود ایمنی‌زایی و کارآیی این واکسن‌ها است [۷]. انواع مختلفی از ادجوانت‌ها با مکانیسم عمل متفاوت وجود دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به ذرات شبه

^۱ Heterogeneous^۲ Estrogen Receptor^۳ Progesterone Receptor^۴ Human Epidermal Growth Factor Receptor 2^۵ Transmembrane^۶ Epidermal Growth Factor Receptor^۷ Axillary Lymph Nodes^۸ Human Leukocyte Antigen

ویروسی^۱ (VLPs) اشاره کرد. VLPها ساختارهایی در مقیاس نانو هستند که از مجموعه‌ای از پروتئین‌های ویروسی تشکیل شده‌اند. این ذرات فاقد مواد ژنتیکی ویروسی بوده و بنابراین غیر عفونی هستند [۸، ۹]. این ذرات ساختار سطحی تکراری و سختی دارند که باعث فعال شدن قوی سلول‌های B می‌شوند. اپی‌توپ‌هایی که به صورت سفت و سخت روی VLP نمایش داده می‌شوند، ایمنی‌زایی بالاتری نسبت به اپی‌توپ‌های نمایش داده شده روی پلیمرهای انعطاف‌پذیر دارند [۹]. واکسن‌های مبتنی بر VLP عمدتاً پاسخ‌های آنتی‌بادی قوی را به همراه فعال‌سازی سلول‌های کمکی T و ارائه آنتی‌ژن بر روی MHC-II القا می‌کنند، اما قادر به ارائه روی MHC-I و تحریک سلول‌های CD8+ نیز هستند که مزیت مهمی برای طراحی واکسن‌های درمانی سرطان است [۹]. باکتریوفاز MS2، با ژنوم RNA تک رشته‌ای و ساختار ایکوزاهدال، به عنوان یک سیستم مناسب دارورسانی و حامل واکسن شناخته شده است [۱۰]. در این پژوهش، چهار آنتی‌ژن هدف مرتبط با تومور شامل HER2، MUC1، Alpha lactalbumin و Mammaglobin-A انتخاب شدند. اپی‌توپ‌های القاکننده HTL و CTL شناسایی و در ادامه آنتی‌ژنیسته و آلرژنیسته آنها بررسی شد. پس از برهم کنش مولکولی با MHC، بهترین اپی‌توپ‌ها به همراه ادجوانت MS2 توسط لینکر GPGP به یکدیگر متصل شدند تا ساختار اولیه واکسن تشکیل شود. در مرحله بعد، آلرژنیسته، آنتی‌ژنیسته، حلالیت و خصوصیات فیزیکوشیمیایی واکسن طراحی شده مورد بررسی قرار گرفت. اپی‌توپ‌های القاکننده IFN- γ و لنفوسیت‌های B شناسایی شدند. در نهایت، طراحی ساختار سه بعدی، تصحیح و اعتبارسنجی ساختار واکسن طراحی شده توسط سرورهای مختلفی انجام شد.

¹ Virus Like Particles

با وجود مطالعات متعدد در زمینه واکسن‌های چنداپی‌تویی علیه سرطان سینه، این تحقیق به دلیل انتخاب ترکیبی از چند آنتی‌ژن کلیدی (HER2، MUC1، Alpha lactalbumin و Mammaglobin-A) که پوشش وسیع‌تری از زیرگروه‌های مولکولی سرطان سینه ارائه می‌دهد، متمایز است [۱۱، ۱۲]. همچنین استفاده از ذرات شبه‌ویروسی MS2 به عنوان ادجوانت، که قادر به بهبود ارائه آنتی‌ژن و تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی است، رویکرد نوینی محسوب می‌شود [۱۳، ۱۴]. فرایند جامع و چندمرحله‌ای شناسایی اپی‌توپ‌ها با ارزیابی دقیق آنتی‌ژنیسته، آلرژنیسته و برهم کنش با MHC باعث بهینه‌سازی ساختار واکسن و افزایش اثربخشی آن می‌شود [۱۵]. در نهایت، ادغام چند آنتی‌ژن مرتبط با تومور و سیستم حامل VLP، رویکردی چندمنظوره و کارآمد برای توسعه واکسن‌های پیشگیرانه یا درمانی ارائه می‌دهد که نیازمند ارزیابی‌های آزمایشگاهی و بالینی بیشتر است.

روش کار

انتخاب آنتی‌ژن‌های هدف و بازایی توالی‌ها

در ابتدا، توالی‌های مربوط به ۴ آنتی‌ژن مدنظر برای طراحی واکسن شامل HER2 (P04626)، MUC1 (P15941)، Alpha lactalbumin (P00709)، Mammaglobin-A (Q13296) و همچنین توالی مربوط به کپسید پروتئین باکتریوفاز MS2 (P03612) که VLP واکسن بود، با فرمت FASTA از پایگاه اطلاعاتی UniProt^۱ به نشانی <https://www.uniprot.org> استخراج شدند [۱۶]. فقط آمینواسیدهای مربوط به توالی خارج سلولی پروتئین‌های HER2 و MUC1 مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به این‌که پروتئین‌های Alpha lactalbumin و Mammaglobin-A تماماً ترشحی بودند، از کل ساختار آنها استفاده شد. منحنی‌های

مربوط به سیگنال پپتید هر ۴ پروتئین با سرور SignalP 5.0 به نشانی

<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>

بررسی شد. نسخه ۵ این سرور، یک روش مبتنی بر شبکه عصبی عمیق همراه با طبقه‌بندی میدان تصادفی شرطی و یادگیری انتقال بهینه برای پیش‌بینی بهبود یافته سیگنال پپتید می‌باشد [۱۷].

انتخاب HLA

از پایگاه اطلاعاتی Allele frequency net data base (AFND) به نشانی

<http://www.allelefreqencies.net/hla6006a.asp> جهت انتخاب HLA^۱ مناسب برای بررسی کنش با اپی-توپ‌های حاصل از ۴ آنتی‌ژن انتخابی استفاده شد. جمعیتی که برای بررسی و انتخاب HLA در نظر گرفته شد، بانک خونی جمعیت ایران رویان گرد بود. AFND مخزنی رایگان برای ذخیره داده‌های فرکانسی (آل‌ها، ژن‌ها، هاپلوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌ها) مربوط به HLA، گیرنده‌های شبه ایمونوگلوبولین سلول کشنده، کمپلکس سازگاری نسجی عمده ژن‌های مرتبط با زنجیره کلاس I و تعدادی پلی مورفیسم ژن سیتوکین در جمعیت‌های جهان را به جامعه علمی ارائه می‌دهد [۱۸].

آنالیزهای ایمونوآنفورماتیک

شناسایی اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-I

برای شناسایی اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-I از سرور IEDB — به نشانی <http://tools.iedb.org/mhci> استفاده شد. به صورت پیش فرض، پپتیدهایی با رتبه درصدی $\geq 1\%$ به عنوان اتصال‌دهنده قوی و پپتیدهایی با رتبه درصدی $\geq 2\%$ به عنوان اتصال‌دهنده ضعیف در نظر گرفته شدند. این مرحله برای هر ۴ آنتی‌ژن - با استفاده از HLA‌های انسانی A02 و A24 انجام شد. بصورت پیش فرض، اپی‌توپ‌های ۹ آمینواسیدی با رتبه‌های

^۱ Human Leukocyte Antigen

مختلف توسط سرور ارائه داده شد. پایگاه داده اپی‌توپ ایمنی^۲ (IEDB) یک منبع در دسترس رایگان است که توسط موسسه ملی آلرژی و بیماری‌های عفونی^۳ (NIAID) تأمین می‌شود. روش پیشنهادی IEDB از یک روش اجماع مبتنی بر شبکه عصبی مصنوعی^۴ (ANN)، روش امتیازدهی مبتنی بر ماتریس^۵ (SMM) و کتابخانه‌های پپتیدی ترکیبی^۶ (CombLib) استفاده می‌کند [۱۹].

شناسایی اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-II

شناسایی اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-II توسط سرور NetMHCIIpan-4.0 به نشانی <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCIIpan-4.0> و با آستانه پیش فرض با رتبه ۱٪ (قوی) و ۵٪ (ضعیف) پیش‌بینی شدند. این مرحله برای هر ۴ آنتی‌ژن با استفاده از HLA‌های انسانی DRB1*04، DRB1*11 و DRB1*15 انجام شد. بصورت پیش فرض، اپی‌توپ‌های ۱۵ آمینواسیدی با رتبه‌های مختلف، توسط سرور ارائه داده شد. سرور-NetMHCIIpan-4.0 اتصال پپتید را با استفاده از روش ANN به هر مولکول MHC-II با توالی شناخته شده، پیش‌بینی می‌کند. این سرور، شامل مجموعه داده گسترده‌ای از بیش از ۵۰۰۰۰۰ اندازه‌گیری از میل ترکیبی و طیف نسجی جرمی است که سه ایزوتیپ انسانی MHC-II شامل HLA-DR، HLA-DQ، HLA-DP و همچنین مولکول‌های موش (H-2) را دربرمی‌گیرد. خروجی مدل، یک امتیاز پیش‌بینی برای احتمال ارائه یک پپتید به طور طبیعی توسط گیرنده انتخابی MHC-II و همچنین شامل درصد امتیاز رتبه است [۲۰].

^۲ Immune Epitope Database

^۳ National Institute of Allergy and Infectious Diseases

^۴ Artificial Neural Network

^۵ Scoring Matrix-based Method

^۶ Combinatorial Peptide Libraries

ارزیابی خواص اپی‌توپ‌ها (آنتی‌ژنیسیته و آلرژنیسیته)

ارزیابی آنتی‌ژنیسیته اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-I و MHC-II با استفاده از سرور VaxiJen [VaxiJen v2.0 به نشانی

<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>

انجام گرفت. اساس این سرور، مبتنی بر تبدیل کوواریانس متقاطع خودکار^۱ (ACC) می‌باشد. دقت سرور براساس ارگانیسم‌های هدف از ۷۰ تا ۸۹ درصد متغیر است [۲۱]. اپی‌توپ‌هایی با آستانه بالاتر از ۰.۵ به عنوان آنتی‌ژن و اپی‌توپ‌هایی با آستانه پایین‌تر از ۰.۵ به عنوان غیر آنتی‌ژن معرفی شدند. ارزیابی آلرژنیسیته اپی‌توپ‌ها با استفاده از سرور AllerTOP v2.0 به نشانی

<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/index.html>

انجام گرفت. مزیت این سرور، استفاده از روش ACC است که توالی پروتئین را به بردارهای یکنواخت با طول مساوی تبدیل می‌کند و همچنین با بسیاری از آلرژن‌ها و غیر آلرژن‌های ارائه شده از گونه‌های مختلف آموزش دیده است [۲۲].

طراحی شکل سه بعدی اپی‌توپ‌ها

در این مرحله، با کمک سرور PEP-FOLD 3.5 که در آدرس

<https://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>

در دسترس است، شکل سه بعدی اپی‌توپ‌های انتخاب شده از مراحل قبل، طراحی و در فرمت PDB ذخیره شد. PEP-FOLD3 یک چارچوب کلی برای توصیف ساختار پپتیدها در محلول یا در تعامل با یک پروتئین فراهم می‌کند. این سرور با موتور پیشرفته‌تر و سریع‌تر مدل‌سازی جدید ساختار پپتید ارائه می‌شود، که امکان باز کردن سرویس را برای طیف گسترده‌ای از اندازه‌های پپتید، از ۵ تا ۵۰ اسید آمینه فراهم می‌کند. برای پپتیدها به صورت مجزا،

PEP-FOLD3 در عرض چند دقیقه اطلاعات مفیدی را در پنج مدل برتر برای ۸۰ درصد موارد در اختیار می‌گذارد [۲۳].

استخراج و بهینه سازی ساختار سه بعدی HLAها

استخراج ساختار سه بعدی HLAهای مدنظر از پایگاه داده پروتئین^۲ (PDB) [۲۴،۲۵] به نشانی <https://www.rcsb.org> (pdb:5C0D) HLA-A02، (pdb:5C0D) HLA-A24، (pdb:4F7M) و (pdb:5LAX) HLA-DRB1*04 از پایگاه PDB استخراج شد. در ادامه، زنجیره‌های اصلی مربوط به HLAها شناسایی شد و با حذف لیگاندها و مولکول‌های اضافی متصل به این ساختارها با کمک نرم‌افزار Notepad⁺⁺، ساختار نهایی HLAها به دست آمد.

بررسی کنش مولکولی

برای بررسی کنش مولکولی^۳ بین اپی‌توپ‌های انتخابی و HLAهای هدف، از سرور HPEPDOCK که در نشانی

<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock> در دسترس است، استفاده شد. HPEPDOCK یک وب سرور جدید برای Blind Docking پروتئین-پپتید از طریق یک الگوریتم سلسله مراتبی است. بهترین اتصال برای هر پپتید در این سرور در رتبه یک و با منفی‌ترین رتبه داکینگ مشخص می‌گردد [۲۶].

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های القاکننده IFN-γ

برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های القاکننده اینترفرون گاما^۴ (IFN-γ) با استفاده از اپی‌توپ‌های متصل‌شونده به MHC-II، از سرور IFNepitope به نشانی

<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/>

استفاده شد. این وب سرور دارای سه واحد اصلی به نام‌های پیش‌بینی، طراحی و اسکن است. واحد پیش‌بینی به کاربران اجازه می‌دهد تا کتابخانه پپتیدی را برای پیش‌بینی بهترین اپی‌توپ‌های القاکننده IFN-γ غربال

² Protein Data Bank

³ Molecular Docking

⁴ Interferon-gamma

¹ Automatic Cross-Covariance

کنند. برای کار با این سرور، از واحد پیش بینی استفاده شد. اپی توپ‌هایی که توانایی القای IFN- γ را داشتند با عبارت مثبت و اپی توپ‌هایی که فاقد این توانایی بودند، با عبارت منفی نمایش داده شدند [۲۷].

انتخاب لینکر و اتصال اپی توپ‌ها

برای اتصال اپی توپ‌ها به یکدیگر از لینکر گلیسین-پرولین-گلیسین (GPGPG) استفاده شد. لینکرها توالی اسیدهای آمینه کوتاهی هستند که در طبیعت برای جداسازی چندین دومین در یک پروتئین واحد ایجاد می‌شوند. بسیاری از آن‌ها سخت و سخت هستند و برای جلوگیری از تعاملات ناخواسته بین دومین‌های گسسته عمل می‌کنند. لینکرهای غنی از گلیسین انعطاف پذیر هستند و دومین‌های مختلف را در یک پروتئین واحد بدون تداخل در عملکرد هر دومین به هم متصل می‌کنند [۲۸].

طراحی ساختار اولیه واکسن

در این مرحله به ترتیب توالی‌های Spy Tag-Spy Catcher و کپسید پروتئین باکتریوفاژ MS2 (که به عنوان VLP واکسن حضور داشت)، به انتهای توالی اپی توپ‌ها متصل شد. بدین صورت که به انتهای توالی اپی توپ‌هایی که در مرحله قبل توسط لینکر به هم متصل شده بودند، توالی Spy Tag و به انتهای آن، توالی Spy Catcher اضافه گردید. در مرحله بعدی به انتهای Spy Catcher توالی مربوط به کپسید پروتئین باکتریوفاژ MS2 افزوده شد. سیستم Spy Tag-Spy Catcher، یک فناوری برای ترکیب غیرقابل برگشت پروتئین‌های نوترکیب است. Spy Tag به Spy Catcher متصل می‌شود و سپس به سرعت یک پیوند آمیدی ایجاد می‌کند و در نتیجه این دو به هم قفل می‌شوند. هر دو Spy Tag و Spy Catcher در مجموع از ۲۰ اسید آمینه معمولی مشترک برای همه موجودات تشکیل شده اند؛ بنابراین، آن‌ها را می‌توان به طور ژنتیکی با هر پروتئین مورد علاقه ترکیب کرد و در ارگانیسم‌های مختلف بیان کرد [۲۹].

Spy Tag-Spy Catcher تحت شرایط مختلف، مانند pH ۵-۱۰ و دمای ۳۷-۴ درجه سانتی‌گراد، در حضور یا عدم حضور عامل کاهنده، می‌توانند واکنش دهند [۳۰].

ارزیابی ویژگی‌های واکسن

ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی

خواص فیزیکوشیمیایی ساختار اولیه واکسن با استفاده از سرور ProtParam که در نشانی <https://web.expasy.org/protparam> در دسترس است، ارزیابی شد. ProtParam ابزاری است که امکان محاسبه پارامترهای مختلف را برای یک پروتئین معین ذخیره شده در Swiss-Prot یا TrEMBL یا برای یک دنباله پروتئینی وارد شده توسط کاربر را می‌دهد. این پارامترهای شامل: وزن مولکولی، pI نظری^۱، ترکیب اسید آمینه، فرمول اتمی، ضریب خاموشی، نیمه عمر تخمینی، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک و میانگین کل هیدروپاتیکی است [۳۱].

ارزیابی آنتی ژنیسیته و آلرژنیسیته

آنتی ژنیسیته واکسن با دو سرور VaxiJen v2.0 و Antigen pro در نشانی <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu> در دسترس می‌باشد بررسی شد. این سرور یک پیش بینی کننده مستقل مبتنی بر توالی، بدون تراز و پاتوژن است که آنتی ژنیسیته را براساس نتایج به دست آمده با تجزیه و تحلیل داده‌های ریز آرایه پروتئینی پیش بینی می‌کند [۳۲]. آلرژنیسیته واکسن با سرور AllerTOP v2.0 بررسی شد.

ارزیابی حلالیت

حلالیت واکسن با دو سرور Protein sol و Sol pro بررسی شد. Protein-Sol که در نشانی <https://protein-sol.manchester.ac.uk> قابل دسترس است. این سرور توالی اسیدهای آمینه را پردازش می‌کند و حلالیت پیش بینی شده و سایر خواص را که در قالب گرافیکی و به عنوان فایل متنی

¹ Theoretical Isoelectric Point

استفاده شد. Phyre2 مجموعه‌ای از ابزارهای موجود در وب برای پیش‌بینی و تجزیه و تحلیل ساختار، عملکرد و جهش‌های پروتئین است. این سرور از هم‌ترازی مدل‌های پنهان مارکوف از طریق HHsearch1 استفاده می‌کند تا به طور قابل‌توجهی دقت هم‌ترازی و سرعت تشخیص را بهبود بخشد [۳۹].

تصحیح ساختار سه بعدی واکسن

برای تصحیح ساختار سه بعدی واکسن از سرور $locPREFMD^3$ استفاده شد که در نشانی <http://feig.bch.msu.edu/locprefmd> در دسترس است. سرور $locPREFMD$ روشی برای اصلاح موضعی ساختارهای پروتئینی است که بهبود در استرئوشیمی محل را هدف قرار می‌دهد و در عین حال چینش کلی را حفظ می‌کند. این روش از کمینه‌سازی و نمونه‌برداری مبتنی بر میدان نیرو^۴ از طریق شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی با میدان نیروی اصلاح‌شده برای آوردن پیوندها، زوایا و زوایای پیچش در محدوده قابل قبولی برای ساختارهای پروتئینی با وضوح بالا استفاده می‌کند [۴۰].

اعتبارسنجی ساختار سه بعدی واکسن

یکی از مشکلات مهم در زیست‌شناسی ساختاری، شناسایی اشتباهاتی است که در مدل تجربی و تئوری پروتئین‌ها وجود دارد. ProSA-web یک رابط کاربری آسان در نشانی

<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php> در دسترس است. این سرور یک نمره کلی کیفیت برای یک ساختار ورودی خاص را محاسبه می‌کند که اگر این نمره خارج از یک دامنه مشخص برای پروتئین‌های بومی باشد، احتمالاً ساختار حاوی خطاهایی است. یک قسمت از نمرات کیفیت محلی به بخش‌های مشکل‌ساز مدل اشاره می‌کند. نمره Z به طور کلی کیفیت مدل را نشان داده و انحراف کل

بارگذاری می‌شوند را محاسبه می‌کند. با استفاده از داده‌های موجود برای حلالیت پروتئین/شریشیاکلی یک سیستم بیانی بدون سلول^۱، ۳۵ ویژگی مبتنی بر توالی محاسبه می‌شود. برای هر پروتئین عددی تحت عنوان مقیاس حلالیت تعریف می‌شود. میانگین این مقیاس در *شریشیاکلی* ۰.۴۵ است. هر مقدار حلالیت مقیاس‌بندی شده بیشتر از این عدد باشد، یعنی پروتئین حلالیت بیشتری نسبت به میانگین حلالیت *شریشیاکلی* دارد [۳۳]. سرور Sol pro در نشانی <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu> موجود است. این سرور حلالیت پروتئین واکسن را در حالت افزایش بیان در میزبان *شریشیاکلی* پیش‌بینی کرده و از روش دو مرحله‌ای بر پایه‌ی ماشین حامل پشتیبان^۲ (SVM)، استفاده می‌کند. صحت نرم افزار در حدود ۷۴ درصد تخمین زده شده است [۳۴].

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B خطی و فضایی

برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B خطی از روی ساختار اول واکسن، از سرور BCPred با نشانی <http://ailab-projects1.ist.psu.edu:8080/bcpred/predict.html> و آستانه اختصاصیت پیش فرض ۷۵٪ استفاده شد. اجرای فعلی BCPred به کاربران اجازه می‌دهد تا روشی را برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B از میان سه روش پیش‌بینی توسعه یافته (روش AAP، BCPred و FBCPred) انتخاب کنند [۳۷-۳۵]. روش‌های مختلفی برای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B فضایی وجود دارد. سرور CBTOPE به آدرس <http://crdd.osdd.net/raghava/cbtope/submit.php> و آستانه پیش فرض ۰.۳ - استفاده شد [۳۸].

طراحی ساختار سه بعدی واکسن

برای طراحی ساختار سه بعدی واکسن از سرور Phyre2 به نشانی <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>

³ Local Protein Structure Refinement via Molecular Dynamics

⁴ Force Field-based

¹ Cell-free Expression System

² Support Vector Machine

انرژی ساختار را با توجه به توزیع انرژی برگرفته شده از ترکیبات تصادفی مشخص می‌کند [۴۱]. سرور دوم، PSVS^۱ در نشانی اینترنتی

<https://montelionelab.chem.rpi.edu/PSVS/PSVS>

^۱ Protein Structure Validation Software

قابل دسترس است. این سرور از ابزارهای بسیاری مانند RPF، PROCHECK، MoLProbity و Verify3D جهت بازرینی ساختار استفاده می‌کند [۴۲]. کل مراحل طراحی واکسن پپتیدی چند اپی‌توپی، به صورت خلاصه در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. مراحل کلی طراحی واکسن

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل اولیه توالی‌های منتخب

در پژوهش حاضر، ابتدا توالی‌های آمینواسیدی انتخاب شدند. توالی‌های مربوط به سیگنال پپتید هر ۴ پروتئین در ابتدا حذف شدند. بخش خارج سلولی مربوط به پروتئین HER2 آمینواسیدهای ۲۳ تا ۶۵۲ و برای پروتئین MUC1 آمینواسیدهای ۲۴ تا ۱۱۵۸ را شامل می‌شد که برای مطالعه انتخاب شدند. از کل توالی پروتئین‌های lactalbumin و Alpha و Mammaglobin-A استفاده شد. همچنین توالی کپسید باکتریوفاژ MS2 آمینواسیدهای ۲ تا ۱۳۰ را شامل می‌شد که به عنوان VLP واکسن انتخاب شد.

انتخاب HLA

در این مرحله برای بررسی درصد پراکندگی آلل‌ها در ایران، ابتدا در سایت AFND، بانک خونی جمعیت ایران رویان‌گرد انتخاب شد که تعداد نمونه بررسی شده نسبتاً زیادی را شامل می‌شد (۱۵۶۰۰ نمونه). این جستجو ۷۰ نتیجه را ارائه داد که از بین آن‌ها ۱۸ نوع HLA که درصد فراوانی آن‌ها بیشتر از ۱۰ درصد بود، مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). در این بررسی پراکندگی آلل‌ها در سایر نقاط جهان نیز در نظر گرفته شد. در نهایت ۵ آلل انتخاب شد: ۲ آلل A*02 و A*24 جهت کنش با MHC-I و سه آلل DRB1*04، DRB1*11 و DRB1*15 جهت کنش با MHC-II.

جدول ۱. آللهایی با فراوانی بالای ۱۰ درصد از جمعیت ایران رویان گرد

درصد فراوانی آلل در ایران	نوع HLA	ردیف
۲۱/۹	A*01	۱
۳۱/۳	A*02	۲
۲۰/۵	A*03	۳
۱۷/۳	A*11	۴
۲۵	A*24	۵
۱۱	A*26	۶
۱۰/۲	A*30	۷
۱۰/۹	A*32	۸
۲۸/۸	B*35	۹
۱۰/۷	B*50	۱۰
۲۲/۷	B*51	۱۱
۱۰/۵	B*52	۱۲
۱۶/۲	DRB1*03	۱۳
۱۹/۷	DRB1*04	۱۴
۱۶/۹	DRB1*07	۱۵
۳۲/۴	DRB1*11	۱۶
۱۸/۵	DRB1*13	۱۷
۲۰/۴	DRB1*15	۱۸

آنالیزهای ایمونوآفورماتیک

شناسایی اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-I

در این مرحله جستجو برای پروتئین‌ها، در سرور IEDB جهت شناسایی اپی‌توپ‌های متصل شونده به آللهای MHC-I (A*02, A*24)، انجام شد. از بین اپی‌توپ‌های پیشنهاد شده توسط سرور، اپی‌توپ‌هایی

که رتبه^۱ بالاتر یا رتبه درصدی پایین‌تری^۲ داشتند، انتخاب شدند.

شناسایی اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-II

در این مرحله نیز برای هر پروتئین در سرور NetMHCIIpan، جستجو جهت شناسایی اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-II (DRB1*04, DRB1*15, DRB1*11)، انجام شد. از بین اپی‌توپ‌های پیشنهاد شده توسط سرور، اپی‌توپ‌هایی که رتبه بالاتر یا رتبه درصدی پایین‌تری داشتند، انتخاب شدند.

ارزیابی خواص اپی‌توپ‌ها (آنتی‌ژنیسیته و آلرژنیسیته)

آنتی‌ژنیسیته و آلرژنیسیته تمام اپی‌توپ‌های منتخب از مرحله قبل به ترتیب توسط دو سرور VaxiJen و AllerTOP بررسی شد. در این مرحله اپی‌توپ‌هایی برگزیده شدند که آنتی‌ژن بوده و توانایی شناسایی توسط سیستم ایمنی را دارا می‌باشند و در عین حال غیر آلرژن بوده و حساسیت‌زا نباشند. ۵۲ اپی‌توپ منتخب دارای این ویژگی‌ها بودند.

طراحی شکل سه‌بعدی اپی‌توپ‌ها

اپی‌توپ‌های منتخب، با کمک سرور، مدل سه‌بعدی شدند. توالی این اپی‌توپ‌های منتخب در جدول ۲ آورده شده است.

¹ Score² Percentile Rank

جدول ۲. اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن و غیر آلرژن منتخب

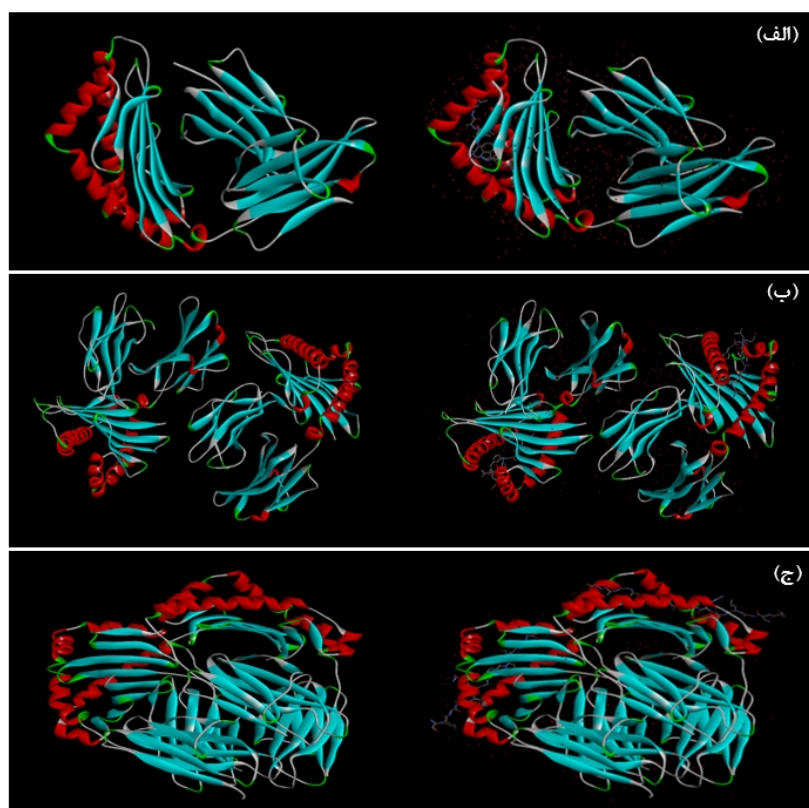
نام پروتئین	نوع HLA	توالی‌ها
Alpha lactalbumin	A*02	HTSGYDTQA, SGYDTQAIV, SQVPQSRNI
Alpha lactalbumin	A*24	TKCELSQLL, SQVPQSRNI
HER2	A*02	IAHNQVRQV, LGMEHLREV, PLQPEQLQV, QVFETLEEI, SVFQNLQVI, ILHNGAYSL, SLRELGSGL, QLFRNPHQA, LQGLPREYV, GVKPDLSPY
HER2	A*24	THLDMLRHL, CYGLGMEHL, VTSANIQEF, AWPDSLPLD, DSLPDLSPV, ILHNGAYSL, HTVPWDQLF, LFRNPHQAL, TQCVNCSQF, EYVNARHCL, LSYMPIWKF
HER2	DRB1*04	WKDIFHKNNQLALTL, TYNTDTFESMPNPEG, QPEQLQVFETLEEIT, TGYLYISAWPDSLPLD, LSYMPIWKFPDEEGA

Mamma globin-A	A*02	NVISKITNP, ISKTNPQV, TINPQVSKT, FLNQTDETL, SNVEVFMQL
Mamma globin-A	A*24	VSKTEYKEL, FLNQTDETL, SNVEVFMQL
Mamma globin-A	DRB1*04	LENVISKITNPQVSK, ENVISKITNPQVSKT, ISKTNPQVSKTEYK, SKTNPQVSKTEYKE, KTNPQVSKTEYKEL
MUC1	A*02	TLAPATEPA, SVSDVPFPF
MUC1	A*24	SAPDNRPAL, HHSDTP TTL, AFREGTINV, SVSDVPFPF
MUC1	DRB1*04	EGTINVHDVETQFNQ, VETQFNQYKTEAASR

استخراج و بهینه‌سازی ساختار سه بعدی HLAها

در این مرحله ساختار HLAهای A*02، A*24، DRB1*04، DRB1*15 و DRB1*11 در سایت PDB جستجو شد و ساختار برای HLA-A*02، HLA-A*24 و HLA-DRB1*04 یافت شد. چون ساختار اختصاصی برای HLA DRB1*15 و HLA DRB1*11 پیدا نشد در نتیجه این آلل‌ها از جستجو

حذف گردیدند. لیگاندهای اضافی ساختارهایی که برای HLAها ارائه شده بودند، حذف شده و ساختار HLAها بهینه گردید. در شکل ۲ تصویری از HLAها قبل و بعد از حذف مولکول‌ها و لیگاندهای اضافی آورده شده است. این تصاویر در فضای نرم افزار Discovery studio 2016 گرفته شده است.



شکل ۲. ساختار HLAهای (الف) A*02، (ب) A*24 و (ج) DRB1*04 قبل (راست) و بعد (چپ) حذف مولکول‌ها و لیگاندهای اضافی

بررسی کنش مولکولی

در این مرحله جهت غربالگری برای انتخاب اپی‌توپ‌های مناسب، کنش مولکولی بین ۵۲ اپی‌توپ

منتخب (که در جدول ۲ آورده شده است) و HLAها انجام شد. اپی‌توپ‌ها از نظر نحوه قرارگیری در شکاف HLA و همچنین سطح انرژی بررسی شدند. طبق

کنش منفی‌تر و به عبارتی در مقایسه با سایر اپیتوپ‌ها سطح انرژی پایداری را در اتصال به HLA داشتند، به صورت جداگانه برای هر پروتئین، انتخاب شدند (جدول ۳).

عملکرد سرور HPEPDOCK، بهترین حالت اتصال پپتید به پروتئین که در رتبه یک برای هر پپتید مشخص می‌گردد و منفی‌ترین امتیاز کنش (پایدارترین سطح انرژی) را داراست، برای هر اپیتوپ انتخاب شد. بعد از اتمام کنش، اپیتوپ‌هایی که رتبه

جدول ۳. اپیتوپ‌های نهایی انتخاب شده از پروتئین‌های *MUC1* و *Mammaglobin-A*، *HER2*، *Alpha lactalbumin* براساس رتبه کنش

رتبه کنش	پایان	شروع	طول اپیتوپ	توالی	نوع HLA	نام پروتئین
-۲۴۷/۱۶۳	۴۰	۳۲	۹	HTSGYDTQA	A*02	Alpha lactalbumin
-۲۳۷/۲۳۶	۴۲	۳۴	۹	SGYDTQAIV		
-۲۳۰/۸۸۰	۷۲	۶۴	۹	SQVPQSRNI		
-۲۴۶/۲۶۵	۷۲	۶۴	۹	IAHNQVRQV	A*02	HER2
-۲۴۳/۲۹۲	۴۲۱	۴۱۳	۹	ILHNGAYSL		HER2
-۲۴۵/۲۸۳	۳۲۸	۳۲۰	۹	CYGLGMEHL	A*24	
-۲۶۳/۴۴۸	۳۴۲	۳۳۴	۹	VTSANIQEF		
-۲۵۴/۰۵۸	۴۰۰	۳۹۲	۹	AWPDSLPLD		
-۲۶۰/۶۰۵	۵۹۴	۵۸۶	۹	LSYMPIWKF		
-۲۸۵/۰۲۲	۱۶۱	۱۴۷	۱۵	WKDIFHKNNQLALTL	DRB1*04	HER2
-۲۴۷/۵۰۳	۲۶۵	۲۵۱	۱۵	TYNTDTFESMPNPEG		
-۳۰۱/۹۲۷	۳۹۹	۳۸۵	۱۵	TGYLYISAWPDSLPLD		
-۲۶۶/۱۷۳	۶۰۰	۵۸۶	۱۵	LSYMPIWKFPDEEGA		
-۲۰۴/۳۵۰	۱۹	۱۱	۹	ISKTINPQV	A*02	Mamma globin-A
-۲۲۴/۲۱۷	۵۶	۴۸	۹	FLNQTDETL		
-۲۱۴/۶۴۱	۶۵	۵۷	۹	SNVEVFMQL		
-۲۵۹/۷۰۰	۲۱	۷	۱۵	LENVISKTINPQVSK	DRB1*04	Mamma globin-A
-۲۴۶/۰۴۳	۲۲	۸	۱۵	ENVISKTINPQVSKT		
-۲۴۱/۶۵۰	۲۵	۱۱	۱۵	ISKTINPQVSKTEYK		
-۲۳۷/۱۸۷	۲۶	۱۲	۱۵	SKTINPQVSKTEYKE		
-۲۳۶/۱۷۴	۲۷	۱۳	۱۵	KTINPQVSKTEYKEL		
-۲۴۲/۸۲۲	۹۸۲	۹۷۴	۹	HHSDTP TTL	A*24	MUC1
-۲۴۶/۱۰۲	۱۱۲۵	۱۱۱۷	۹	SVSDVPFPF		MUC1
-۲۵۰/۶۶۱	۱۱۰۰	۱۰۸۶	۱۵	EGTINVHDVETQFNQ	DRB1*04	
-۲۴۸/۵۰۸	۱۱۰۸	۱۰۹۴	۱۵	VETQFNQYKTEAASR		

تصاویر مربوط به کنش اپیتوپ‌ها با HLA‌های مربوطه در شکل ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود اپیتوپ‌ها کاملاً در شکاف HLA قرار گرفته‌اند.



پیش‌بینی اپی‌توپ‌های القاکننده IFN- γ

اینترفرون‌های گاما با افزایش بیان MHC-II در سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن، ارائه آنتی‌ژن را افزایش می‌دهند [۴۳]. از این رو حضور اپی‌توپ‌های القاکننده اینترفرون گاما در ساختار واکسن حائز

اهمیت است. همانطور که در جدول ۴ قابل مشاهده است، تنها دو اپی‌توپ از پروتئین HER2، توانایی القای اینترفرون گاما را دارند که با عبارت مثبت نمایش داده شدند.

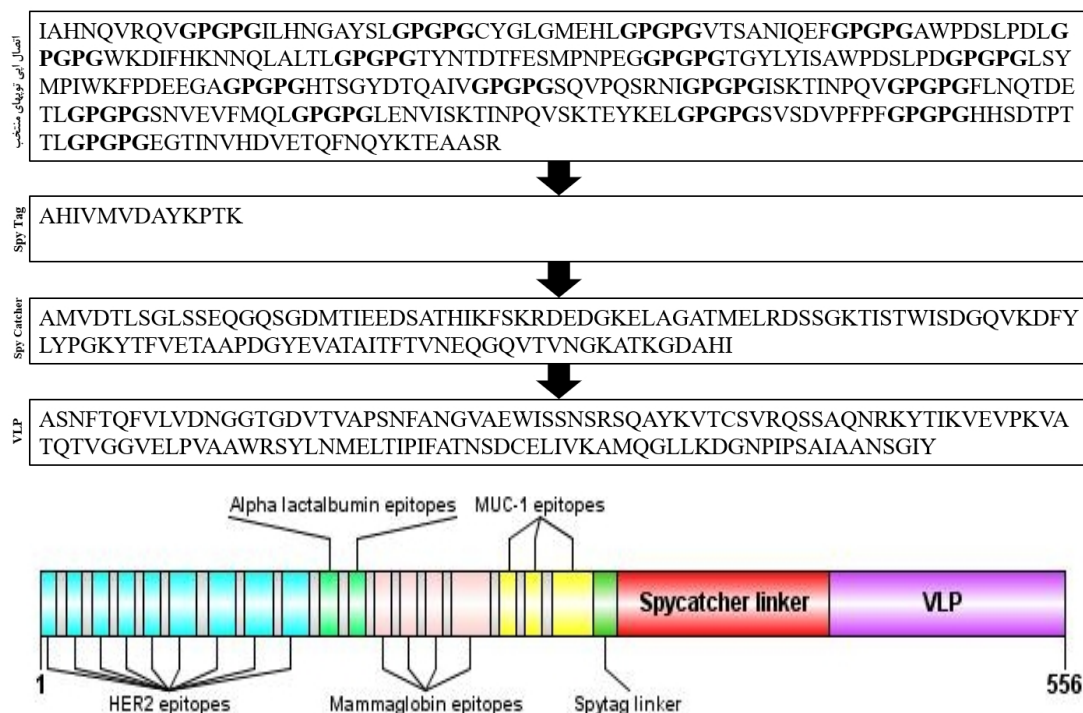
جدول ۴. شناسایی اپی‌توپ‌های القاکننده اینترفرون گاما با استفاده از سرور IFNepitope

نتیجه	روش	امتیاز	پایان	شروع	توالی	پروتئین
NEGATIVE	SVM	-۰/۳۲	۱۶۱	۱۴۷	WKDIFHKNNQLALTL	HER2
NEGATIVE	SVM	-۰/۸۳	۲۶۵	۲۵۱	TYNTDTFESMPNPEG	
POSITIVE	SVM	-۰/۳۷	۳۹۹	۳۸۵	TGYLYISAWPDSLDP	
POSITIVE	SVM	-۰/۲۱	۶۰۰	۵۸۶	LSYMPIWKFPDEEGA	
NEGATIVE	SVM	-۰/۰۵	۲۱	۷	LENVSKTINPQVSK	Mamma globin-A
NEGATIVE	SVM	-۰/۰۶	۲۲	۸	ENVISKTINPQVSKT	
NEGATIVE	MERCI	۱	۲۵	۱۱	ISKTINPQVSKTEYK	
NEGATIVE	MERCI	۱	۲۶	۱۲	SKTINPQVSKTEYKE	
NEGATIVE	MERCI	۱	۲۷	۱۳	KTINPQVSKTEYKEL	
NEGATIVE	SVM	-۱/۳۲	۱۱۰۰	۱۰۸۶	EGTINVHDTVETQFNQ	MUC1
NEGATIVE	SVM	-۱/۱۴	۱۱۰۸	۱۰۹۴	VETQFNQYKTEAASR	

طراحی ساختار اولیه واکسن

در این مرحله برای تشکیل بخش آنتی‌ژنی واکسن، ابتدا اپی‌توپ‌های متصل شونده به MHC-I و MHC-II (مطابق جدول ۳)، توسط لینکر GP GPG به یکدیگر متصل شدند. اتصال این اپی‌توپ‌ها به یکدیگر با ترتیب‌های متفاوتی صورت گرفت تا در نهایت با

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی ساختارها، بهترین آن انتخاب گردید. در مرحله بعد توالی‌های Spy Tag-Spy Catcher به انتهای آنتی‌ژن وصل شدند تا در انتها کپسید پروتئین باکتریوفاژ MS2 که VLP واکسن بود به آن‌ها متصل شود (شکل ۴).



شکل ۴. طرح شماتیک واکسن طراحی شده. در ابتدا اپی توپ‌های متصل شونده به MHC-I و MHC-II مربوط به ۴ پروتئین *Alpha HER2*، *Mammaglobin-A*، *lactalbumin* و *MUC1* توسط لینکر GPGPG به یکدیگر متصل شدند. در مرحله بعد توالی‌های Spy Tag-Spy Catcher به انتهای آنتی ژن وصل شدند. در مرحله آخر، کپسید پروتئین باکتریوفاژ MS2 که VLP واکسن بود به آن‌ها متصل شد. توالی‌های مربوط به Spy Tag، Spy، Catcher و VLP واکسن نشان داده شده است.

نیمه عمرها، ساختارهای ۱ و ۳ از این جدول که نیمه عمر بیشتری داشتند، انتخاب شدند.

ارزیابی آنتی ژنیسیته، آلرژنیسیته و حلالیت

در این مرحله، آنتی ژنیسیته، آلرژنیسیته و حلالیت ۲ ساختار (ساختارهای ۱ و ۳ در مرحله قبل) انتخاب شده، بررسی و مقایسه شد (جدول ۵).

ارزیابی ویژگی‌های واکسن

ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی

با استفاده از سرور ProtParam، ابتدا نیمه عمر ساختارهای مختلف طراحی شده برای واکسن مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (جدول ۵). با مقایسه

جدول ۵. خواص فیزیکوشیمیایی ساختارهای طراحی شده برای واکسن براساس نیمه عمر

شماره ساختار	ترتیب قرارگیری اپی توپ‌های مربوط به هر آنتی ژن	نیمه عمر
۱	HER2- Alpha lactalbumin- Mammaglobin- MUC1	20 HOURS (MAMMALIAN RETICULOCYTES, IN VITRO). 30 MIN (YEAST, IN VIVO). >10 HOURS (ESCHERICHIA COLI, IN VIVO).
۲	Alpha lactalbumin- MUC1- HER2- Mammaglobin	3.5 HOURS (MAMMALIAN RETICULOCYTES, IN VITRO). 10 MIN (YEAST, IN VIVO). >10 HOURS (ESCHERICHIA COLI, IN VIVO).
۳	MHC I binding epitopes (A02, A24)- MHC II binding epitopes (DRB1*04)	20 HOURS (MAMMALIAN RETICULOCYTES, IN VITRO). 30 MIN (YEAST, IN VIVO). >10 HOURS (ESCHERICHIA COLI, IN VIVO).
۴	MHC II binding epitopes (DRB1*04) - MHC I binding epitopes (A02, A24)	5.5 HOURS (MAMMALIAN RETICULOCYTES, IN VITRO). 3 MIN (YEAST, IN VIVO). 2 MIN (ESCHERICHIA COLI, IN VIVO).

جدول ۶. آلرژی‌نیسته، آنتی‌ژنیسته و محلولیت ساختارهای طراحی شده برای واکسن

محلولیت	آنتی‌ژنیسته	آلرژی‌نیسته	ترتیب اپی‌توپ‌ها	شماره ساختار
۰/۵۸۸ (PROTEIN SOL) SOLUBLE ۰/۹۵۶۱۸۰ (SOL PRO)	Probable Antigen ۰/۵۲۰۲ (Vaxijen) ۰/۹۳۶۰۴۵ (Antigen pro)	Probable Non-allergen	HER2- Alpha lactalbumin- Mammaglobin- MUC1	۱
۰/۵۷۷ (PROTEIN SOL) SOLUBLE ۰/۹۵۲۸۲۹ (SOL PRO)	Probable Antigen ۰/۵۱۶۹ (Vaxijen) ۰/۹۳۹۰۴۱ (Antigen pro)	Probable Non-allergen	MHC I binding epitopes (A02, A24)- MHC II binding epitopes (DRB1*04)	۲

مقایسه اعداد مرتبط با آنتی‌ژنیسته برای هر دو ساختار نشان می‌دهد که هر دو توالی آنتی‌ژن بوده و از این لحاظ تفاوت چندانی ندارند. همچنین بررسی آلرژی‌نیسته نشان می‌دهد که توالی‌ها غیر آلرژن هستند. بر اساس سرور Protein sol، حلالیت بالای ۰/۴۵ در هر دو ساختار نشان می‌دهد که پروتئین، حلالیت بیشتری نسبت به میانگین حلالیت در /شریشیا کلائی دارد. این عدد در ساختار اول ۰/۵۸۸ و در ساختار دوم ۰/۵۷۷ است که حلالیت بیشتر در ساختار اول را نشان می‌دهد. عدد سرور Sol pro نیز بیانگر درصد حلالیت پروتئین در /شریشیا کلائی است. بنابراین هرچه این مقدار به عدد ۱ نزدیکتر باشد بهتر است. این عدد برای ساختار اول ۰/۹۵۶ و برای ساختار دوم ۰/۹۵۲ است که بیانگر حلالیت بیشتر ساختار اول می‌باشد. در نهایت با مقایسه ویژگی‌های هر دو توالی، ساختار شماره ۱ به علت حلالیت بیشتر در /شریشیا کلائی، به عنوان ساختار اصلی واکسن در نظر گرفته شد. پارامترهای بررسی شده برای سایر خواص فیزیکوشیمیایی ساختار شماره ۱ شامل: وزن مولکولی (۵۷۹۵۷/۴۲)، pI نظری (۴/۸۵)، ضریب خاموشی (۶۵۴۴۵)، شاخص ناپایداری (۲۶/۴۹)، شاخص آلیفاتیک

(۶۶/۴۶) و میانگین کل هیدروپاتیکی (۰/۳۹۸) است. ضریب خاموشی نشان می‌دهد که پروتئین در یک طول موج مشخص چه مقدار نور جذب می‌کند. شاخص ناپایداری تخمینی از پایداری پروتئین مورد نظر در یک لوله آزمایش ارائه می‌دهد. پروتئینی که شاخص ناپایداری آن کوچکتر از ۴۰ باشد به عنوان پایدار پیش‌بینی می‌شود. شاخص آلیفاتیک یک پروتئین به عنوان حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک تعریف می‌شود. هر چه این شاخص عدد بزرگتری داشته باشد، آن پروتئین در طیف وسیع‌تری از دماها پایدار است. میانگین کل مقدار هیدروپاتی برای یک پپتید یا پروتئین به عنوان مجموع مقادیر هیدروپاتی همه اسیدهای آمینه، تقسیم بر تعداد باقیمانده‌ها در دنباله محاسبه می‌شود. هر چه این عدد منفی‌تر باشد، پروتئین آب‌دوستی بیشتری داشته و کنش بهتری با مولکول‌های آب اطراف دارد.

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول B خطی و فضایی

با کمک سرور BCPREDS، اپی‌توپ‌های سلول B خطی موجود در ساختار واکسن، شناسایی شد (جدول ۷).

جدول ۷. اپی‌توپ‌های سلول B خطی شناسایی شده از ساختار اول واکسن

رتبه	طول	پایان	شروع	توالی اپی‌توپ‌های سلول B خطی	ردیف
۱	۲۰	۱۵۷	۱۳۸	KFPDEEGAGPGPGHTSGYDT	۱
۱	۲۰	۱۱۵	۹۶	TFESMPNPEGPGPGTGYLY	۲
۱	۲۰	۱۹۴	۱۷۵	IGPGPGISKITNPQVGPGPG	۳
۱	۲۰	۵۷	۳۸	GPGPGVTSANIQEFGPGPGA	۴
۱	۲۰	۲۷۶	۲۵۷	FGPGPGHSDTPTTLGPGPG	۵
۱	۲۰	۲۲۲	۲۰۳	LGPGPSNVEVFMQLGPGPG	۶

Υ	VGP GPGILHNGAYS LGPGPG	9	28	2.	1
Λ	NPQVSKTEYKELGPGPGSVS	232	251	2.	1
9	SAWPDSLDPDGPGLSYMPI	117	136	2.	1
10	SSEQGQSGDMTIEEDSATHI	322	341	2.	./999
11	LPDLGPGGWKDIFHKNNQL	62	81	2.	./999
12	TVNEQGQVTVNGKATKGAH	4.7	426	2.	./989
13	VDNGGTGDVTVAPSNFANGV	437	456	2.	./955
14	NVHDVETQFNQYKTEAASRA	281	300	2.	./919
15	QNRKYTIKVEVPKVATQTVG	481	500	2.	./911
16	TMELRDSSGKTISTWISDGQ	357	376	2.	./89

احتمالی بین ۰ تا ۹ مشخص می‌کند. مواردی که
مقیاس ۴ و بالاتر دارند را می‌توان به عنوان اپی‌توپ
سلول B فضایی در نظر گرفت.

ای توپ‌های سلول B فضایی با سرور CBTPE شناسایی شد که نتیجه در **جدول ۸** قابل مشاهده است. CBTPE برای هر اسید آمینه یک مقیاس

جدول ۸. اپی توپ‌های سلول B فضایی شناسایی شده از ساختار اول واکسن

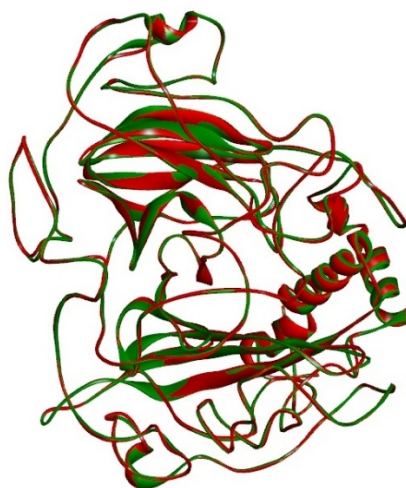
جايگاه اسيد آمينه	اسيد آمينه	مقياس احتمالي
۱-۴	IAHN	۴, ۴, ۴, ۴
۷-۸	RQ	۴, ۴
۱۴	G	۴
۵۲	G	۴
۱۳۳-۱۳۴	YM	۴, ۴
۱۳۶	I	۴
۱۳۸	Q	۴
۱۴۰	P	۴
۱۵۶-۱۶۸	YDTQAI VGPGPGSQ	۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۵, ۴, ۴, ۴, ۴
۱۷۵-۱۷۷	IGP	۴, ۴, ۴
۱۸۰-۱۸۱	GI	۴, ۴
۲۰۴-۲۰۷	GPGP	۴, ۴, ۴, ۴
۲۱۷-۲۱۹	LGP	۴, ۴, ۴
۲۲۷-۲۳۰	ISKT	۴, ۴, ۴, ۴
۲۴۰	Y	۴
۲۸۲-۳۰۰	VHDVETQFNQYKTEAASRA	۴, ۴, ۵, ۵, ۵, ۵, ۴, ۵, ۵, ۵, ۴, ۴, ۴, ۴, ۵, ۵, ۴, ۴
۳۰۲-۳۰۴	IVM	۴, ۴, ۴
۳۱۵-۳۲۵	VDTLGSLSEQ	۴, ۴, ۵, ۵, ۴, ۵, ۵, ۴, ۴, ۵, ۴
۳۲۸-۳۳۵	SGDMTIEE	۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴
۳۶۴	S	۴
۳۷۸-۳۸۰	KDF	۴, ۴, ۴
۳۸۲-۳۸۳	LY	۴, ۴
۴۰۲-۴۰۸	TAITFTV	۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴
۴۱۰-۴۲۴	EQGQVTVNGKATKGD	۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴, ۵, ۴, ۴, ۴, ۴, ۴
۴۳۵	V	۴
۴۴۲	T	۴
۴۴۵-۴۴۸	VTVA	۴, ۴, ۴, ۴

۴, ۴, ۴	RQS	۴۷۶-۴۷۸
۵, ۴, ۴, ۵, ۴, ۴	AQNRKY	۴۸۰-۴۸۵
۴	L	۵۰۴
۴	W	۵۰۹
۴	I	۵۱۹
۴, ۴	AM	۵۳۴-۵۳۵
۴	K	۵۴۰

طراحی و تصحیح ساختار سه بعدی واکسن

ساختار سه بعدی واکسن با سرور Phyre2 طراحی و در فرمت PDB ذخیره شد. در ادامه، ساختار سه بعدی به دست آمده با استفاده از سرور *loc*PREFMD تصحیح شد. مقایسه بین ساختار اولیه

و ساختار پس از تصحیح نشان می‌دهد که ساختار سه بعدی واکسن بعد از تصحیح، تفاوت چندانی با ساختار ابتدایی پیدا نکرده است (شکل ۵).

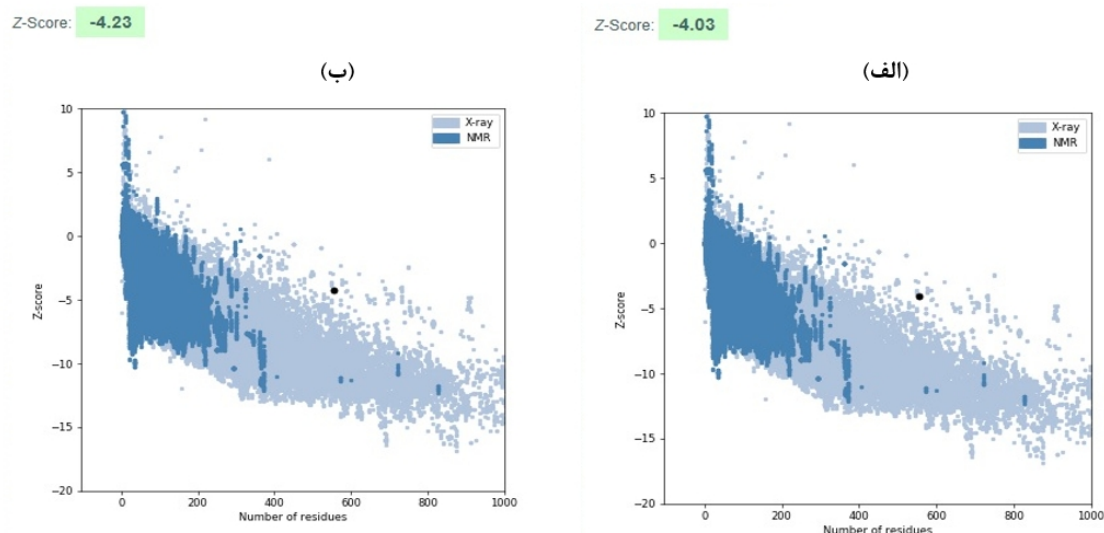


شکل ۵. ساختار سه بعدی واکسن که در دو رنگ مشخص شده است. رنگ قرمز نشان دهنده ساختار اولیه و رنگ سبز نشان دهنده ساختار پس از تصحیح می‌باشد.

اعتبارسنجی ساختار سه بعدی واکسن

در این مرحله، از دو سرور برای اعتبارسنجی ساختار واکسن استفاده شد. ابتدا در سرور ProSA-web مدل اولیه Phyre2 و سپس مدل تصحیح شده *loc*PREFMD بارگذاری شد. همانطوری که در شکل ۶ مشخص است، Z-score مربوط به ساختارهای

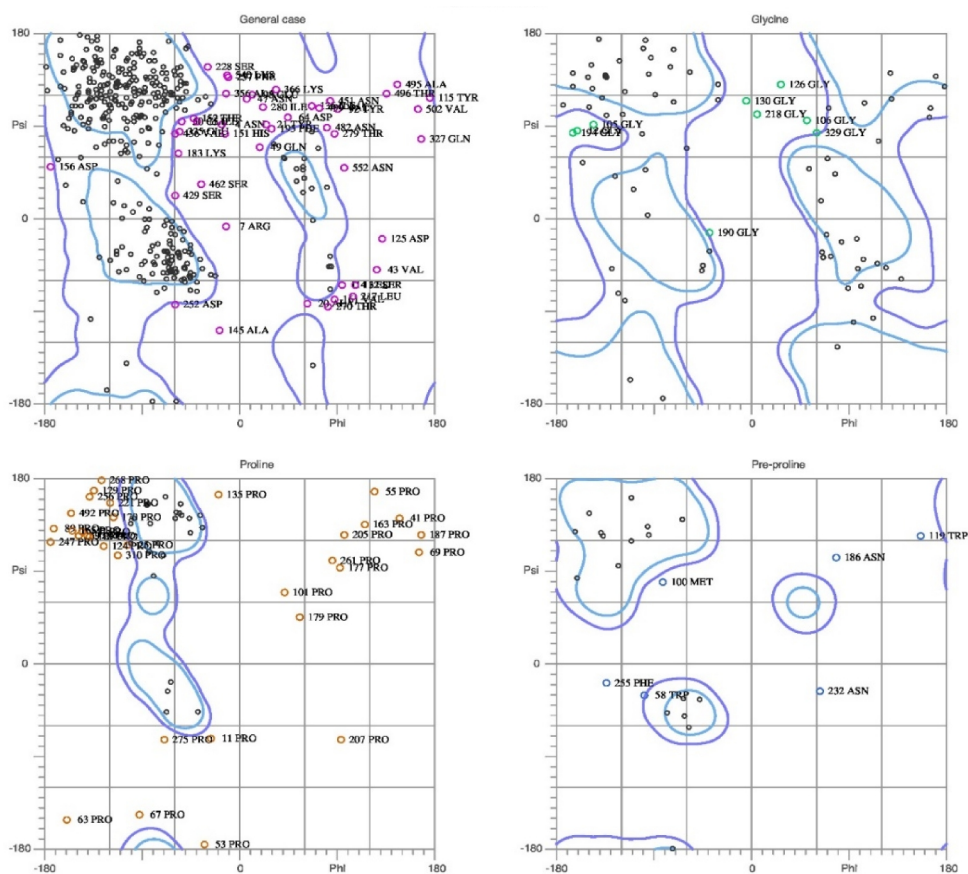
سه بعدی در ابتدا ۰/۳- بوده که بعد از تصحیح ساختار ۴/۲۳- شده است. منفی‌تر شدن Z-score نشان دهنده بهبود جزئی ساختار سه بعدی بعد از تصحیح می‌باشد.



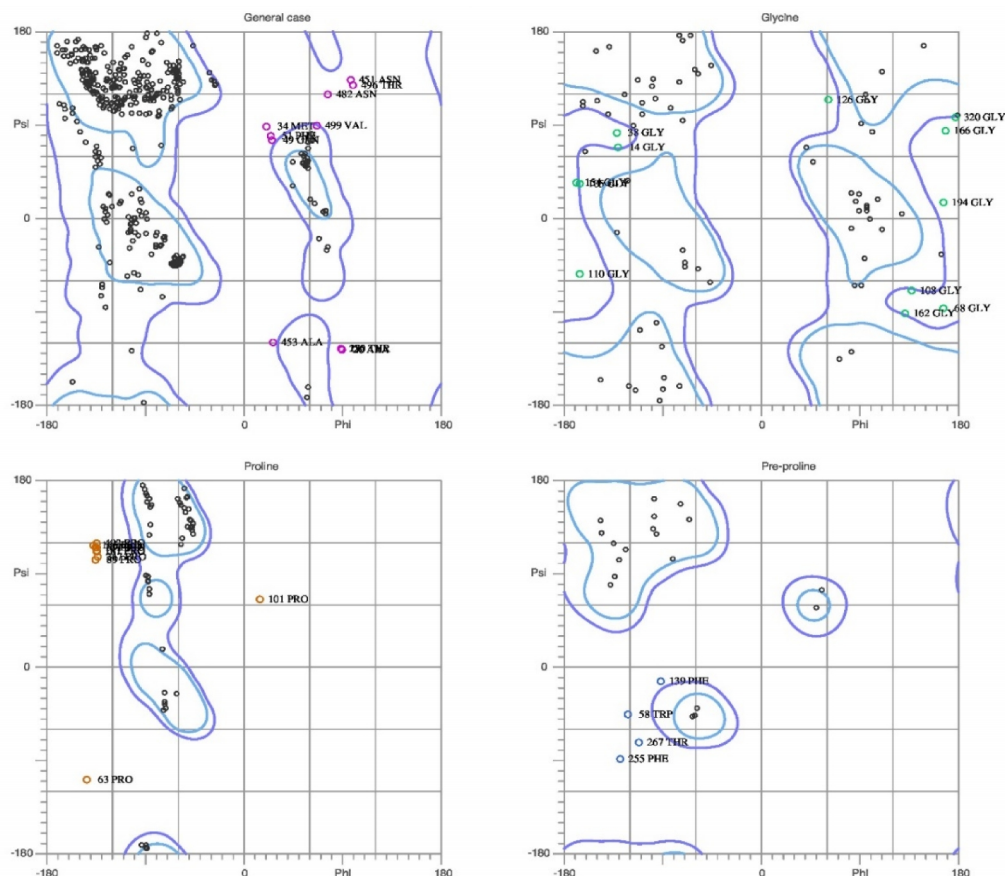
شکل ۶. اعتبارسنجی ساختار سه بعدی واکسن. (الف) اعتبارسنجی مدل اولیه به دست آمده از سرور *Phyre2* با سرور *ProSA-web* $z\text{-score}$ مدل اولیه با عدد $-۴/۰۳$ مشخص شده است. (ب) اعتبارسنجی مدل نهایی به دست آمده از سرور *locPREFMD* با سرور *ProSA-web* $z\text{-score}$ مدل نهایی با عدد $-۴/۲۳$ مشخص شده است. منفی تر شدن $z\text{-score}$ نشان دهنده این است که فرآیند تصحیح ساختار موثر بوده و باعث بهبود ساختار کلی و رفع خطاهای احتمالی ساختار واکسن شده است.

درصد به $۶/۷$ درصد کاهش یافت. به عبارتی در ساختار اولیه پراکندگی آمینواسیدها در نواحی غیرقابل قبول زیاد است که این پراکندگی در ساختار تصحیح شده در مناطق غیرقابل قبول کاهش یافته و آمینواسیدها در نواحی مطلوب متمرکز شده اند که نشان دهنده بهبود ساختار سه بعدی پروتئین است (شکل های ۷ و ۸).

دومین سروری که برای اعتبار سنجی ساختارهای سه بعدی استفاده شد، PSVS بود. نتایج به دست آمده از این سرور به شکل داده‌هایی از جمله نواحی مطلوب، نواحی قابل قبول و نواحی غیرقابل قبول به نمایش در می‌آید. بدین ترتیب نواحی مطلوب از $۶۶/۶$ درصد در نمونه ابتدایی *Phyre2* به $۸۰/۷$ درصد در نمونه تصحیح شده *locPREFMD* افزایش یافت و همچنین نواحی غیر قابل قبول از ۱۷



شکل ۷. منحنی رامچاندرا قبل از تصحیح ساختار سه بعدی واکسن از نظر زوایای فی (Φ) و سای (Ψ). در منحنی کلی که همه‌ی آمینواسیدها مشخص هستند، علاوه بر ناحیه مطلوب که دارای تراکم مناسبی از آمینواسیدها می باشد، تعداد نسبتاً زیادی از آمینواسیدها در ناحیه غیر قابل قبول مشاهده شده‌اند. آمینواسیدهای گلیسین و پرولین به دلیل ساختار متمایزی که از سایر آمینواسیدها دارند در منحنی‌های مجزایی بررسی شده‌اند. نواحی مطلوب ۶۶/۶ درصد، نواحی قابل قبول ۱۶/۴ درصد و نواحی غیر قابل قبول شامل ۱۷ درصد می باشد.



شکل ۸. منحنی رامچاندردان بعد از تصحیح ساختار سه بعدی واکسن از نظر زوایای فی (Φ) و سای (Ψ). مقایسه این منحنی با منحنی قبل به وضوح نشان دهنده تفاوت قرارگیری آمینواسیدها در نواحی مختلف است. همان گونه که مشخص است از تعداد آمینواسیدهای نواحی غیرقابل قبول کاسته شده و به تراکم آن‌ها در ناحیه مطلوب اضافه شده است. بدین صورت که نواحی مطلوب ۸۰/۷ درصد، نواحی قابل قبول ۱۲/۶ درصد و نواحی غیر قابل قبول ۶/۷ درصد کل نواحی را تشکیل می‌دهند.

بحث

اهمیت و نقش واکسن‌های پپتیدی در درمان سرطان سینه

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در جهان است که با افزایش روزافزون نرخ ابتلا و مرگ‌ومیر ناشی از آن، نیاز به راهکارهای درمانی موثر و نوین بیش از پیش احساس می‌شود. سیستم ایمنی نقش پیچیده‌ای در شناسایی، پیشگیری و کنترل رشد سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند و در سال‌های اخیر مداخلات ایمنی درمانی به عنوان یکی از استراتژی‌های نوین درمان سرطان، مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. واکسن‌های پپتیدی، به دلیل قابلیت هدف‌گیری اختصاصی، سهولت در تولید، ایمنی بالا و نتایج مثبت

در مدل‌های پیش‌بالینی، به عنوان گزینه‌ای امیدوارکننده در درمان سرطان سینه مطرح شده‌اند. مطالعات فاز دوم بالینی بر روی بیماران با سرطان سینه متاستاتیک پیشرفته نشان داده‌اند که این واکسن‌ها توانسته‌اند پاسخ ایمنی مناسبی ایجاد کنند بدون اینکه عوارض جانبی جدی گزارش شود [۴۴-۴۶].

انتخاب آنتی‌ژن‌ها و کاربرد ادجوانت باکتریوفاژ MS2
در این مطالعه از چهار آنتی‌ژن MUC1, HER2, Mammaglobin-A و Alpha lactalbumin استفاده شد. هر کدام از این آنتی‌ژن‌ها با درصد نسبتاً بالایی در مراحل مختلف سرطان سینه بیان می‌شوند تا بتوانند

سطوح مختلف درمان یک بیمار دارای سرطان سینه را پوشش دهند [۳].

یکی از چالش‌های واکسن‌های پپتیدی، قدرت پایین تحریک سیستم ایمنی است که در این مطالعه با به کارگیری ادجوانت باکتریوفاژ MS2 برطرف شده است [۴۷]. از این باکتریوفاژ می‌توان به عنوان یک حامل دارویی بالقوه برای درمان بیماری‌های مختلف مانند سرطان پروستات، کارسینوم سلول‌های کبدی و سایر بیماری‌ها استفاده کرد [۴۸]. واکسن‌هایی که در آن‌ها از باکتریوفاژ استفاده می‌شود، قابلیت برانگیختن سیستم ایمنی میزبان و در نتیجه مبارزه با ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و همچنین مقابله با سرطان را دارد. از آنجایی که این واکسن‌ها از نظر شیمیایی پایدار بوده و دارای مزایایی همچون ذخیره و حمل و نقل آسان، تولید ارزان در مقیاس بزرگ و نیز قادر به القای پاسخ ایمنی هومورال و سلولی میزبان می‌باشند، می‌توانند جایگزین ارزشمندی برای غلبه بر محدودیت‌های واکسن‌های معمولی باشند [۴۹]. واکسن‌های مبتنی بر VLP که از ساختارهایی مانند باکتریوفاژها استفاده می‌کنند، به دلیل اندازه و هندسه سطحی تکراری، پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اختصاصی قوی ایجاد می‌کنند که در مطالعات اخیر به اثربخشی آن‌ها در مقابله با سرطان سینه اشاره شده است [۵۰].

طراحی واکسن چنداپی‌توپی و اهمیت تحریک پاسخ‌های سلولی و هومورال

در طراحی یک واکسن کارآمد علیه سرطان باید در نظر داشت که تحریک هر دو پاسخ CTL و HTL ضروری است. CTLها پپتیدهای آنتی‌ژنی تقسیم بندی شده را که توسط مولکول‌های MHC-I روی سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن ارائه می‌شوند، تشخیص می‌دهند. علاوه بر این، ارائه پپتیدهای آنتی‌ژنی توسط مولکول‌های MHC-II منجر به تحریک پاسخ‌های HTL می‌شود [۵۱]. در این راستا، واکسن پپتیدی چند اپی‌توپی طراحی شده حاوی

اپی‌توپ‌های CTL و HTL است. انتخاب این اپی‌توپ‌ها با استفاده از سرورهای گوناگون صورت گرفت و اپی‌توپ‌های CTL و HTL از هر ۴ آنتی‌ژنی که برای طراحی واکسن در نظر گرفته بودند انتخاب و توسط لینکر GP2PG به یکدیگر متصل شدند. لینکرها نقش مهمی در انعطاف پذیری پروتئین، خمیدگی و جداسازی نواحی عملکردی دارند و به همین جهت موجب پایداری بیشتر ساختار می‌شوند. GP2PG از دو نظر اهمیت دارد؛ اول این که مانع از تشکیل اپی‌توپ‌های پیوندی شده و دوم باعث تسهیل پردازش و ارائه اپی‌توپ‌ها توسط سیستم ایمنی می‌شود. همچنین این لینکر باعث افزایش پاسخ HTLها شده و از این نظر به سیستم ایمنی کمک می‌کند [۵۲]. کاری که منحصرأ در این پژوهش انجام شد، این بود که بعد از انتخاب اپی‌توپ‌ها از روی رتبه درصدی که هر سرور ارائه می‌داد، آلرژنیسته و آنتی‌ژنیسته تک تک آن‌ها بررسی شد تا از همان ابتدای پژوهش، اپی‌توپ‌های مناسبی که توانایی تحریک سیستم ایمنی را دارند و آلرژنیسته نباشند، انتخاب شوند.

توجه به تنوع HLA و پوشش جمعیت هدف

یکی از نکات کلیدی در طراحی واکسن‌های پپتیدی، تطابق اپی‌توپ‌ها با آلل‌های HLA جمعیت هدف است تا واکسن بیشترین اثربخشی را داشته باشد. در انتخاب HLAها، نکته‌ای که مدنظر قرار گرفت این بود که HLAها به گونه‌ای گزینش شوند که واکسن در وهله اول برای جمعیت ایران مناسب باشد. انتخاب جمعیت ایران رویان‌گرد از سایت AFND، با توجه به این که در بین سایر جمعیت‌ها نمونه بیشتری را شامل می‌شد، می‌توانست برای رسیدن به این هدف موثر باشد. برای امیدوار بودن به اثربخشی واکسن به صورت جهانی، در مرحله دوم، پراکندگی آلل‌های انتخاب شده در سایر نقاط جهان نیز بررسی گردید تا در نهایت آلل‌هایی انتخاب شوند که علاوه بر پراکندگی مناسب در ایران، در دیگر نقاط جهان نیز از

پراکندگی مناسبی برخوردار باشند. در مرحله بعدی، طراحی شکل سه بعدی اپی-توپ‌ها و بررسی کنش مولکولی با HLA‌های هدف نیز به عنوان یک روش غربالگری برای انتخاب اپی-توپ‌های مناسب انجام گرفت. در این مرحله دو نکته مدنظر بود؛ اولاً اتصال اپی-توپ به HLA هدف با سطح انرژی مناسبی همراه باشد، دوماً اپی-توپ در شکاف HLA قرار گرفته باشد. براساس تجزیه و تحلیل کریستالوگرافی که در سال ۱۹۸۷ بر روی مولکول HLA انجام گرفت، نشان داد که این مولکول در سطح خارجی خود دارای شیاری است که پپتیدها به این نواحی متصل می‌شوند [۵۳]. بنابراین انجام یک کنش مولکولی برای مشاهده قرارگیری پپتید در شکاف HLA می‌تواند کافی باشد. با توجه به تعداد نسبتاً زیاد اپی-توپ‌های مناسب شناسایی شده از آنتی‌ژن‌ها، چندین نحوه اتصال برای آن‌ها در نظر گرفته شد تا ساختار اولیه واکسن طراحی شود. هر کدام از ساختارها توسط سرور ارزیابی گردید و مشاهده شد که با جابجایی مکان اپی-توپ‌ها، نیمه عمر، آنتی‌ژنیسیته و حلالیت نیز به صورت محسوس تغییر می‌یابد. در نهایت ساختاری انتخاب شد که در مقایسه با بقیه ساختارها نیمه عمر طولانی‌تر و خواص فیزیکوشیمیایی مناسب‌تری داشته باشد. در این مرحله حالت‌های محدودی برای نحوه اتصال اپی-توپ‌ها به یکدیگر در نظر گرفته شد و این امکان وجود دارد که حالت‌های دیگری نیز بررسی شود تا بهترین نتیجه حاصل گردد [۵۱].

ارزیابی اپی-توپ‌های القاکننده پاسخ هومورال و نقش

IFN- γ در تنظیم پاسخ ضد تومور

علاوه بر پاسخ ایمنی سلولی، ایمنی هومورال نیز نقش مهمی در ایمنی درمانی سرطان دارد و باعث فعال شدن CTL‌ها و سلول‌های B می‌شود [۵۱]. در این راستا بعد از طراحی ساختار واکسن، با استفاده از سرور مناسب، اپی-توپ‌های القاکننده پاسخ ایمنی هومورال نیز شناسایی شد و مشاهده گردید که واکسن قابلیت القای ایمنی هومورال را نیز دارد.

اپی-توپ‌های غیرخطی سلول B نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. با این بررسی مشخص شد که پروتئین از نظر تعداد اپی-توپ‌های غیرخطی نیز از شرایط مناسبی بهره‌مند است. اپی-توپ‌های القاکننده IFN- γ نیز در نهایت بررسی شدند تا این اطمینان را به ما بدهند که واکسن طراحی شده توانایی القای تولید یکی از فاکتورهای مهم سیستم ایمنی را دارد. فرآیندی که به عنوان ویرایش ایمنی سرطان^۱ شناخته می‌شود، به بهترین وجه عملکرد IFN- γ را در پاسخ ضد تومور نشان می‌دهد. ویرایش ایمنی سرطان، نشان دهنده تکامل مفهوم قدیمی‌تر و بحث‌برانگیزتر نظارت بر ایمنی سرطان است که در آن سیستم ایمنی اختصاصی نقشی کاملاً محافظتی در کنترل رشد تومور ایفا می‌کند. این فرآیند شامل سه مرحله است: (۱) حذف، که در آن سیستم ایمنی سلول‌های تومور را که آنتی‌ژن‌های جدید قوی را بیان می‌کنند، تشخیص داده و از بین می‌برد. (۲) تعادل، که در آن سیستم ایمنی، سلول‌های باقیمانده سرطانی را در حالت خواب حفظ می‌کند. (۳) فرار، که در آن سیستم ایمنی دیگر نمی‌تواند رشد سلول‌های تومور ویرایش شده را کنترل کند که منجر به رشد تدریجی تومورها و ایجاد یک ریزمحیط تومور سرکوب کننده ایمنی می‌شود. IFN- γ بر تمام مراحل ویرایش ایمنی تومور تأثیر می‌گذارد و با عملکردهای متنوع خود، سرنوشت نهایی تومور را تعیین می‌کند [۵۴].

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و اعتبارسنجی ساختار

واکسن

پس از طراحی ساختار اولیه، واکسن از نقطه نظر خاصیت آلرژنیسیته، آنتی‌ژنیسیته و حلالیت مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد واکسن طراحی شده خواص ایمنی‌شناسی خوبی داشته و توانایی تحریک سیستم ایمنی را دارد و نیز غیرآلرژن و محلول می‌باشد. با بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

^۱ Cancer Immunoediting

مشخص شد که واکسن موردنظر پایدار بوده و می‌تواند نیمه عمر مناسبی در ارگان‌های مختلف از جمله پستانداران داشته باشد. در مرحله آخر نیز شکل سه بعدی واکسن طراحی، تصحیح و با کمک دو سرور اعتبارسنجی شد. این اعتبارسنجی با مقایسه دو ساختار سه بعدی، قبل و بعد از تصحیح، مشخص کرد که تصحیح انجام شده بر روی ساختار، باعث بهبود وضعیت واکسن و نزدیک‌تر شدن آن به فرم طبیعی شده است.

چالش‌ها و محدودیت‌های طراحی واکسن با کمک روش‌های ایمونوآنفورماتیکی

با وجود مزایای متعدد در طراحی واکسن با استفاده از رویکردهای بیوانفورماتیکی، این روش‌ها همچنان با چالش‌هایی همراه هستند. وابستگی به الگوریتم‌ها و مدل‌های محاسباتی می‌تواند منجر به پیش‌بینی‌های نادرست از نوع مثبت یا منفی کاذب شود. همچنین، کیفیت داده‌های ورودی، به‌ویژه در مواردی که از اپی‌توپ‌های پیش‌بینی‌شده با کیفیت پایین استفاده شده باشد، نقش مهمی در دقت خروجی دارد. برای مقابله با این مشکل، پژوهشگران به طور فزاینده‌ای از پایگاه‌های داده کنترل‌شده و معتبر مانند IEDB استفاده می‌کنند که حاوی اطلاعات اپی‌توپ‌های تاییدشده از طریق آزمایش‌های تجربی است. همچنین، گام‌های پیش‌پردازشی مانند حذف نواحی تراغشایی^۱ و پپتیدهای سیگنالی با استفاده از ابزارهایی نظیر TMHMM و SignalP، به حذف توالی‌های غیرایمنوژنیک کمک می‌کنند. علاوه بر این، اعتبارسنجی نتایج با استفاده از چندین الگوریتم پیش‌بینی متفاوت (نظیر NetCTL، NetMHCIIpan و VaxiJen) می‌تواند اطمینان بیشتری در شناسایی اپی‌توپ‌ها ایجاد کند. اعتبارسنجی ساختاری از طریق مدل‌سازی سه‌بعدی و داکینگ مولکولی نیز از نظر

^۱ Transmembrane

زیستی، قابلیت اعتماد به نتایج پیش‌بینی‌شده را تقویت می‌کند. با این حال، طراحی واکسن *in silico* نیازمند منابع محاسباتی قابل‌توجهی است و همچنان برای تأیید نهایی ایمنی و اثربخشی، اعتبارسنجی تجربی در شرایط آزمایشگاهی و حیوانی برای پرکردن این شکاف و بهبود کاربرد عملی روش‌های طراحی واکسن به کمک بیوانفورماتیک ضروری است [۵۵].

نتیجه‌گیری

هدف اصلی مطالعه حاضر طراحی یک واکسن پپتیدی چند اپی‌توپی جدید برای ایمنی درمانی سرطان سینه با استفاده از یافته‌های *in silico* بود. می‌توان گفت با توجه به این که اپی‌توپ‌های موجود در ساختار واکسن قابلیت تحریک پاسخ سیستم ایمنی همورال و سلولی را دارند، و همچنین به دلیل استفاده از ادجوانت در طراحی واکسن به نظر می‌رسد پاسخ ایمونولوژیکی مناسبی را می‌توان از این واکسن به دست آورد. از طرفی با مقایسه ساختار سه بعدی اولیه و نیز ساختار نهایی که پس از مراحل مختلف به دست آمد، می‌توان گفت که تلاش برای طراحی واکسنی به روش بیوانفورماتیک با ویژگی‌های مدنظر موفقیت‌آمیز بوده است. با این حال، مطالعات آزمایشگاهی و بالینی برای تشخیص کارایی واقعی ساختار طراحی شده و همچنین استفاده از آن به عنوان واکسن سرطان در آینده ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه رساله دکتری عمومی داروسازی خانم فاطمه قاسم پور با کد رهگیری 1005219 و کد اخلاق IR.ARUMS.REC.1399.408 از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده داروسازی استخراج شده است و به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

- 1- World Health Organization (WHO). Breast cancer fact sheet. Geneva: World Health Organization; 2023. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- 2- Parvizpour S, Razmara J, Omid Y. Breast cancer vaccination comes to age: impacts of bioinformatics. *Bioimpacts*. 2018; 8(3):223–35.
- 3- Burke EE, Srinivasan R, Wang J, Czerniecki BJ. Vaccine therapies for breast cancer. *Surg Oncol Clin*. 2019; 28(3):353–67.
- 4- Tafreshi NK, Enkemann SA, Bui MM, Lloyd MC, Abrahams D, Huynh AS, et al. A mammaglobin-A targeting agent for noninvasive detection of breast cancer metastasis in lymph nodes. *Cancer Res*. 2011; 71(3):1050–9.
- 5- Kim SW, Goedegebuure P, Gillanders WE. Mammaglobin-A is a target for breast cancer vaccination. *Oncoimmunology*. 2016; 5(2):e1069940.
- 6- Jaini R, Loya MG, Eng C. Immunotherapeutic target expression on breast tumors can be amplified by hormone receptor antagonism: a novel strategy for enhancing efficacy of targeted immunotherapy. *Oncotarget*. 2017; 8(20):32536–49.
- 7- Bastola R, Noh M, Kwon YJ. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res*. 2017; 40(11):1238–48.
- 8- Nooraei S, Bahrulolum H, Hoseini ZS, Katalani C, Hajizade A, Easton AJ, et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnology*. 2021; 19(1):59.
- 9- Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol*. 2017; 34:123–32.
- 10- Fu Y, Li J. A novel delivery platform based on bacteriophage MS2 virus-like particles. *Virus Res*. 2016; 211:9–16.
- 11- Zhou P, Shi X, Xia J, Hu H. In silico design and in vitro validation of a multi-epitope peptide vaccine targeting triple-negative breast cancer. *Front Oncol*. 2025; 15:1611991.
- 12- Dhanushkumar T, Kamaraj B, Vasudevan K, Gopikrishnan M, Dasegowda KR, Rambabu M. Structural immunoinformatics approach for rational design of a multi-epitope vaccine against triple negative breast cancer. *Int J Biol Macromol*. 2023; 243:125209.
- 13- Ning W, Yan S, Song Y, Xu H, Zhang J, Wang X. Virus-like particle: a nano-platform that delivers cancer antigens to elicit an anti-tumor immune response. *Front Immunol*. 2025; 15:1504124.
- 14- Naskalska A, Heddle JG. Virus-like particles derived from bacteriophage MS2 as antigen scaffolds and RNA protective shells. *Nanomedicine*. 2024; 19(12):1103-15.
- 15- Shuaib M, Singh AK, Gupta S, Alasmari AF, Alqahtani F, Kumar S. Designing of neoepitopes based vaccine against breast cancer using integrated immuno and bioinformatics approach. *J Biomol Struct Dyn*. 2024; 42(16):8624-37.
- 16- UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49(D1):D480–9.
- 17- Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*. 2019; 37(4):420–3.
- 18- Gonzalez-Galarza FF, McCabe A, Santos EJ, Jones J, Takeshita L, Ortega-Rivera ND, et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48(D1):D783–8.
- 19- Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, Tamang D, Wang P, Greenbaum J, et al. Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(W1):W525–30.

- 20- Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand WH, Peters B, Nielsen M. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *J Proteome Res.* 2020; 19(6):2304–15.
- 21- Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8:4.
- 22- Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP--a server for in silico prediction of allergens. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14(Suppl 6):S4.
- 23- Lamiable A, Thévenet P, Rey J, Vavrusa M, Derreumaux P, Tufféry P. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(W1):W449–54.
- 24- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(1):235–42.
- 25- Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, et al. RCSB protein data bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D437–51.
- 26- Zhou P, Jin B, Li H, Huang SY. HPEPDOCK: a web server for blind peptide–protein docking based on a hierarchical algorithm. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1):W443–50.
- 27- Dhanda SK, Vir P, Raghava GPS. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. *Biol Direct.* 2013; 8(1):30.
- 28- Reddy Chichili VP, Kumar V, Sivaraman J. Linkers in the structural biology of protein–protein interactions. *Protein Sci.* 2013; 22(2):153–67.
- 29- Zakeri B, Fierer JO, Celik E, Chittock EC, Schwarz-Linek U, Moy VT, et al. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(12):E690–7.
- 30- Brune KD, Howarth M. New routes and opportunities for modular construction of particulate vaccines: stick, click, and glue. *Front Immunol.* 2018; 9:1432.
- 31- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. *Methods Mol Biol.* 1999; 112:531–52.
- 32- Magnan CN, Baldi P. SSpro/ACCpro 5: almost perfect prediction of protein secondary structure and relative solvent accessibility using profiles, machine learning and structural similarity. *Bioinformatics.* 2014; 30(18):2592–7.
- 33- Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J.. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics.* 2017; 33(19):3098–100.
- 34- Magnan CN, Randall A, Baldi P. SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics.* 2009; 25(17):2200–7.
- 35- Chen J, Liu H, Yang J, Chou KC. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids.* 2007; 33(3):423–8.
- 36- El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit.* 2008; 21(4):243–55.
- 37- El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting flexible length linear B-cell epitopes. *Comput Syst Bioinformatics Conf.* 2008; 7:121–32.
- 38- Ansari HR, Raghava GP. Identification of conformational B-cell epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res.* 2010; 6:6.
- 39- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10(6):845–58.
- 40- Feig M. Local protein structure refinement via molecular dynamics simulations with locPREFMD. *J Chem Inf Model.* 2016; 56(7):1304–12.
- 41- Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(suppl_2):W407–10.
- 42- Bhattacharya A, Tejero R, Montelione GT. Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins.* 2007; 66(4):778–95.
- 43- Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001; 357(9270): 1777–89.

- 44- Tan TJ, Sng JH, Chua CL. What is the role of immunotherapy in breast cancer? *Chin Clin Oncol*. 2018; 7(2):13.
- 45- Toh U, Sakurai S, Saku S, Takao Y, Okabe M, Iwakuma N, et al. Early phase II study of mixed 19-peptide vaccine monotherapy for refractory triple-negative breast cancer. *Cancer Sci*. 2020; 111(8):2760–9.
- 46- Nezafat N, Ghasemi Y, Javadi G, Khoshnoud MJ, Omidinia E. A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: an in silico approach. *J Theor Biol*. 2014; 349:121–34.
- 47- Farafonov VS, Nerukh D. MS2 bacteriophage capsid studied using all-atom molecular dynamics. *Interface Focus*. 2019; 9(3):20180081.
- 48- Hashemi K, Ghahramani Seno MM, Ahmadian MR, Malaekheh-Nikouei B, Bassami MR, Dehghani H, et al. Optimizing the synthesis and purification of MS2 virus-like particles. *Sci Rep*. 2021; 11(1):19851.
- 49- Zalewska-Piatek B, Piatek R. Bacteriophages as potential tools for use in antimicrobial therapy and vaccine development. *Pharmaceuticals*. 2021; 14(4):331.
- 50- Hu H, Steinmetz NF. Development of a virus-like particle-based anti-HER2 breast cancer vaccine. *Cancers*. 2021; 13(12):2907.
- 51- Mahmoodi S, Nezafat N, Barzegar A, Negahdaripour M, Nikanfar A, Zarghami N, et al. Harnessing bioinformatics for designing a novel multiepitope peptide vaccine against breast cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016; 17(12):1100–14.
- 52- Dong R, Chu Z, Yu F, Zha Y. Contriving multi-epitope subunit of vaccine for COVID-19: immunoinformatics approaches. *Front Immunol*. 2020; 11:1784.
- 53- Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 2. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(1):157–62.
- 54- Alspach E, Lussier DM, Schreiber RD. Interferon γ and its important roles in promoting and inhibiting spontaneous and therapeutic cancer immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019; 11(3):a028480.
- 55- Mukherjee R, Verma N, Bhagat A, Verma CK. Immunoinformatics: expanding frontiers and emerging tools in bioinformatics for immunology. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2025:1-8.