

УДК 578.2

КОНСТРУИРОВАНИЕ *in silico* НОВОЙ МУЛЬТИЭПИТОПНОЙ КАНДИДАТНОЙ ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ Q-ЛИХОРАДКИ¹

© 2022 г. S. Jabarzadeh^a, A. Samiminemati^a, M. Zeinoddini^a, *^aFaculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

*e-mail: zeinoddini52@mut.ac.ir

Поступила в редакцию 06.12.2020 г.

После доработки 07.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

С появлением новых патогенов возникает необходимость в новых вакцинах. Эффективную вакцину отличает высокая иммуногенностью и безопасность, и этим критериям могут удовлетворять вакцины на основе эпитопов. Среди зоонозных инфекций особое место занимает Q-лихорадка, вызываемая бактерией *Coxiella burnetii*. Из-за многочисленных вспышек и пандемического потенциала это заболевание находится под пристальным вниманием эпидемиологов и клиницистов. Мы представляем синтетическую мультиэпитопную вакцину против *Coxiella burnetii*. Эта вакцина разработана с использованием иммуноинформатики. Изучены антигенные белки этого патогена и отобрано пять эпитопов Т-клеток. Антигенность, аллергенность и токсичность выбранных эпитопов оценивали с использованием серверов VaxiJen 2.0, AllerTOP и ToxinPred соответственно. Выбранные эпитопы объединили в пептидную последовательность с субъединицей В холерного токсина (СТХВ) в качестве адьюванта. Сродство предложенной вакцины к молекулам главного комплекса гистосовместимости (МНС) классов I и II оценивали с использованием технологии молекулярного докинга. Полученный препарат характеризуется высокой иммуногенностью, стабильностью и периодом полувыведения, сопоставимым с используемым в программах вакцинации. Валидированную последовательность эпитопов можно рассматривать в качестве потенциальной вакцины для защиты от возбудителя Q-лихорадки.

Ключевые слова: Q-лихорадка, *Coxiella burnetii*, пептидная вакцина, иммуноинформатика, эпитоп

DOI: 10.31857/S0026898422010037

Q-лихорадка – широко распространенное зоонозное заболевание, которое вызвано *Coxiella burnetii*, грамотрицательной облигатной внутриклеточной бактерией, открытой в 1935 году Harold Cox и MacFarlane Burnet (см. обзоры [1, 2]). Эта бактерия принадлежит к семейству Coxiellaceae, способному к внутриклеточной интравacuлярной персистенции как у беспозвоночных, так и у позвоночных хозяев.

C. burnetii хорошо переносит различные среды, в том числе кислые условия до pH примерно 4.5, высокие температуры до 62°C в течение 30 мин, УФ-облучение и давление до 300000 кПа [3, 4]. Домашние животные, такие как крупный рогатый скот, овцы и козы, представляют собой основные источники *C. burnetii*. Эту инфекцию могут передавать человеку инфицированные насекомые, такие как клещи и комары, ей можно заразиться при прямом контакте с инфицированными животными, а также при употреблении их мяса, молока и других продуктов питания [3, 5].

Симптомы Q-лихорадки у людей изначально похожи на симптомы гриппа, но впоследствии они могут привести к вторичным хроническим состояниям, таким как гепатит, острый эндокардит, васкулит, лимфаденит и др. [6].

К настоящему времени этот бактериальный зооноз вызвал три крупные вспышки. В 1955 году первые случаи Q-лихорадки зарегистрировали в девяти африканских странах. В период с 2007 по 2010 гг. Нидерланды столкнулись с большой волной инфекций, вызванных ею. Самая крупная зоонозная вспышка Q-лихорадки произошла в Кайенне – столице Французской Гвианы [6, 7].

Как упомянуто ранее, Q-лихорадка может передаваться людям или другим животным при прямом контакте или через инфицированные продукты. Однако о горизонтальной передаче этого заболевания (от человека человеку) сообщений нет [1]. Учитывая зоонозный потенциал Q-лихорадки на основании зарегистрированных крупных вспышек, встала задача предотвратить распространение этой инфекции, а значит приступить к разработке вакцин. До сих пор доступна

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

```

MIKLLKFGVFFIVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEDHNTQIHTLNDKIFSUTESLAGKREMAIITFKNGATFQV
EVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANPAPAPASEQITLQTAЕК
VGLNVAKKKTPTFVIGNKALTKFGFKKGNVTLVEFFDYKKVPGYRNASSKRFFVAPKKRFDLSLMLNYPNS
ADRYPAPAPAMIKLLKFGVFFIVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEDHNTQIHTLNDKIFSUTESLAGKREMAIIT
FKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN
    
```

Рис. 1. Последовательность разработанного иммуногена включает аминокислотные последовательности эпитопов *Coxiella burnetii* (штамм RSA 493), адьюванта и линкеров. Последовательности эпитопов показаны черным, адьюванта – синим, линкеров КК (соединяют эпитопы) – зеленым, линкеров PAPAP (соединяют последовательности адьюванта с эпитопами) – красным цветом.

только одна вакцина против Q-лихорадки, Q-VAX, – в виде инактивированного формалином цельноклеточного препарата штамма Heinzerling *C. burnetii* фазы 1 [8].

Последние достижения в области геномного секвенирования улучшили наше понимание биологии микроорганизмов [9, 10] и привели к созданию баз данных по специфичным для организма белкам, нуклеотидным последовательностям, а также к доступности серверов для предсказания эпитопов [11, 12]. Предсказание эпитопов В- и Т-клеток выполняют раздельно [13, 14].

В представленном исследовании, проведенном методом обратной вакцинологии, для разработки иммуноактивной пептидной/белковой вакцины против *C. burnetii* использовано несколько баз данных и серверов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сбор данных по эпитомам. В этом разделе предложены эпитопы исследовали в базе данных IEDB (<https://www.iedb.org/>) и выбирали некоторые поверхностные эпитопы. Отметим, что фильтры корректировали на основе использования вакцины против *Coxiella burnetii* (штамм RSA 493) со всеми линейными и структурными эпитопами. Результат этого поиска – около 62 эпитопов и эпитопов поверхностных белков, которые отобрали из предложенных. Аминокислотная последовательность токсина *Vibrio cholerae* (субъединица В) получена из банка NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) с регистрационным номером AAV67882.1. Кроме того, из банка данных PDB (<https://www.rcsb.org/>) была извлечена трехмерная структура молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и МНС класса II с идентификационными номерами 4UQ3 и 1DLH соответственно.

Множественное выравнивание последовательностей и выбор антигена. Полная последовательность целевого поверхностного белка получена из базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) в формате FASTA [15]. На следующем этапе с ис-

пользованием базы NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) эту последовательность выравнивали с таковыми для белков человека и подтвердили, что между ними нет сходства.

Антигенность предсказанных эпитопов. Антигенность как В-клеточных, так и Т-клеточных эпитопов предсказана с использованием сервера VaxiJen 2.0 с точностью предсказания от 70 до 89% (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/>) [16].

Прогнозирование аллергенности и токсичности. Аллергенность и токсичность эпитопов имеют решающее значение для вакцин на основе пептидов, поскольку некоторые предполагаемые эпитопы могут проявлять эти свойства и тем самым вызывать нежелательные перекрестные реакции иммунной системы. Выбранные в качестве эпитопов пептиды проверяли на аллергенность с помощью сервера AllerTOP (<https://www.ddgpharmfac.net/AllerTOP/>) [17]. Токсичность эпитопов анализировали с использованием базы данных (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/algo.php>).

Создание пептидов для химерного белка. На этом этапе эпитопы-кандидаты размещали в пептидной последовательности и соединяли вместе через жесткий линкер LysLys (KK), как показано на рис. 1. На следующем этапе аминокислотную последовательность адьюванта (AAV67882.1) – субъединицы В токсина *Vibrio cholerae* – вводили в начало и конец полиэпитопной последовательности – для повышения иммуногенности конструктора. Для присоединения адьювантных последовательностей к полиэпитопной использовали линкер PAPAP.

Физико-химические свойства и стабильность родственного белка. Для анализа химических и физических свойств полученного полипептида, таких как молекулярная масса, чистый заряд и период полураспада, его последовательность исследовали с использованием баз данных PepCalc (<https://pepcalc.com>) [18] и ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). Стабильность белка рассмотрели и смоделировали с использованием программ IUpred 2.0 (<https://iupred2a.elte.hu/>) [19], IsUnstruct (v2.02) ([МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

bioinfo.protres.ru/IsUnstruct/) [20] и сервера FoldUnfold (<http://bioinfo.protres.ru/ogu/>) [21].

Предсказание вторичной и третичной структуры. Вторичная структура сконструированного пептида предсказана по методу GorIV с использованием базы данных PRABI (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html). Трехмерная структура белка спрогнозирована с использованием сервера I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) [22]. Он предсказал трехмерную структуру белка с использованием моделирования *de novo*. I-TASSER – это ранжированный подход к предсказанию структуры и функции белка, основанный на уровне подобия входных и шаблонных структур, доступных в банке данных PDB.

Уточнение модели и оценка качества. Уточнение предсказанной модели выполнено с использованием сервера 3Drefine (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>), чтобы уменьшить возможные структурные ошибки в предсказанной третичной структуре родственной белковой вакцины. Кроме того, структурное качество вакцины проверено на графике Рамачандрана с использованием сервера RAPAGE (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>) и Z-балла сервера ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) [23].

Молекулярный докинг. Процесс молекулярной стыковки выполняли для проверки аффинности связывания разработанной белковой последовательности с молекулами МНС класса I (HLA-A0201; PDB Acc. No. UQ3) и МНС класса II (HLA-DR; PDB Acc. No. 1DLH). Молекулярный докинг проводили с использованием он-

лайн-сервера ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/login.php?redir=/queue.php>) со сложным типом по умолчанию [24–26]. На следующем этапе процесс повторяли с использованием программного обеспечения HEX 6.0. С этой целью выбирали следующие параметры: FFT Mode—3D fast life, диапазоны расстояний, скручивания, рецепторов и лигандов – 40, 360, 180 и 180 соответственно, тип корреляции – только форма, размер сетки – 0.6.

Обратная трансляция пептида и проверка открытой рамки считывания (ORF). На заключительном этапе аминокислотную последовательность полученного полипептида обратно транслировали в нуклеотидную с использованием базы данных (https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Открытую рамку считывания (ORF) связанной последовательности со значением по умолчанию для *Escherichia coli* исследовали в базе данных ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор эпитопов и выравнивание последовательностей

В табл. 1 показаны эпитопы, выбранные на сервере IEDB. Последовательность пептидов (эпитопов) для вакцины *C. burnetii* сконструирована, отображена и проанализирована в программе protein BLAST.

Кроме того, чтобы подтвердить отсутствие сходства между последовательностями сконструированного полипептида и белков человека, полные последовательности из эпитопов-кандидатов, содержащихся в поверхностных белках *C. burnetii*, со-

Таблица 1. Эпитопы, выбранные для исследования

UniProt (Acc. No.)	Белок	Эпитопы
H7C7D7 (CBU_1910)	Com1	DIQSIVHHYLVNHPVL GNVTLVEFFDY KYAFHDALLS SEQITLQTAEKVGLNVA TPTFVIGNKALTKFGF
Q83DK8 (CBU_0718)	Гипотетический ассоциированный с мембраной белок	DDVAKLRGDLSSIIHKLTFSKTEASM
Q83AL4 (CBU_1869)	Гипотетический экспортируемый белок	PITKKQLKTMMSNYEVIK IKLPRNRYRLVFTQQ GKHFDGIKVLKLSQNTI
Q83F71 (CBU_0077)	Гипотетический трансмембранный белок	EVLTLNWNVNYHE
Q83EL2 (CBU_0307)	Наружный белок мембраны	GVAYTYNRANAGLPTNK VPGYRNASSKRFVAP
Q83DT1 (OmpH)	OmpH	QELFVAQNKAMSDFM
Q83CG1 (CBU_1157)	Гипотетический экспортируемый белок	ISLLVFKNSHRVQLWAK RFDLSLMLNYPNSADRY

Таблица 2. Результаты исследования белков *C. burnetii* с помощью программы protein BLAST и предсказание антигенности

Эпитоп	NCBI Blast			
	Минимальная идентичность, % <i>Homo sapiens</i>	Максимальная идентичность, % <i>Homo sapiens</i>	Минимальная идентичность, % <i>Coxiella burnetii</i>	Максимальная идентичность, % <i>Coxiella burnetii</i>
H7C7D7 (CBU_1910)	35.14	35.90	96.92	100.00
Q83DK8 (CBU_0718)	0	0	98.94	100.00
Q83AL4 (CBU_1869)	0	0	98.62	100.00
Q83F71 (CBU_0077)	0	0	99.24	100.00
Q83EL2 (CBU_0307)	0	0	35.11	100.00
Q83DT1 (ompH)	0	0	99.14	100.00
Q83CG1 CBU_1157	0	0	99.14	100.00

Таблица 3. Прогнозируемые свойства выбранных Т-клеточных эпитопов

Эпитоп	Вероятностный протективный аллерген (Allertop)	Антиген (VaxiJen 2.0)
DIQSIVHHYLVNHPPEVL	Аллерген	Антиген
GNVTLVEFFDY	Аллерген	Антиген
KYYAFHDALLS	Не аллерген	Не антиген
SEQITLQTAEKVGLNVA	Не аллерген	Антиген
TPTFVIGNKALTKFGF	Не аллерген	Антиген
DDVAKLRGDLSSIIHKLTSFSKTEASM	Не аллерген	Не антиген
PITKKQLKTMMSNYEVIK	Не аллерген	Не антиген
IKLPRNRYRLVFTQQ	Не аллерген	Не антиген
GKHFDGIKVLKLSQNTI	Аллерген	Антиген
EVLTLNWNVNYHE	Не аллерген	Не антиген
GVAITYNRANAGLPTNK	Не аллерген	Не антиген
VPGYRNASSKRFVAP	Не аллерген	Антиген
ISLLVFKNSHRVQLWAK	Аллерген	Не антиген
RFDLSLMLNYPNSADRY	Не аллерген	Антиген
QELFVAQNKAMSDFM	Не аллерген	Не антиген

поставляли с белками человека. Результаты protein BLAST показаны в табл. 2.

Прогнозирование и выбор Т-клеточного эпитопа

Внутриклеточная природа заражения *C. burnetii* побудила нас ограничить выбор кандидатных пептидов только Т-клеточными эпитопами. Для предсказания эпитопов Т-клеток проводили трехэтап-

ный скрининг иммуногенных (порог: 0.4) и аллергенных характеристик эпитопов (табл. 3). Все эпитопы по предсказанию были нетоксичными.

Инженерия вакцин и физико-химические свойства

С помощью иммуноинформатического анализа отобрали пять эпитопов Т-клеток. Сконструированная вакцина-кандидат включала 344 ами-

нокислоты, разделенные на следующие сегменты: СТхВ в качестве адьюванта, Т-клеточные эпитопы и соответствующие линкеры. Физические и химические свойства конечной конструкции предсказаны с помощью сервера PepCalc. Результаты подтвердили, что полипептид с молекулярной массой около 38261.89 Да – стабильный растворимый белок с pI 9.92 и расчетным суммарным зарядом около 14.7 (рис. 2а).

Стабильность белка

Стабильность родственного белка оценивали с использованием серверов IUpred 2.0, IsUnstruct (v2: 02) и FoldUnfold (масштаб: ожидаемое число контактов 8 Å, порог: 20.4, рамка усреднения: 11). Рассчитанная стабильность белка подтверждена, как показано соответственно на рис. 2б, 2в и 2г.

С использованием программы ProtParam для аминокислотного состава сконструированного полипептида предсказаны стабильность и период полужизни. Согласно результатам, показанным на рис. 3, структура белка стабильна, период его полужизни составляет примерно 30 ч в клетках млекопитающих, более 20 ч в дрожжах и более 10 ч в *E. coli* (рис 3).

Прогнозирование вторичной и третичной структуры

Прогноз вторичной и третичной структуры химерного полипептида проиллюстрирован на рис. 4. Как можно видеть, в α -спираль, удлиненную β -структуру и случайный клубок организовано соответственно 31.58, 19.30 и 49.12% аминокислотных остатков из общего числа 344. Кроме того, первичную 3D-модель предлагаемого иммуногена предсказали онлайн-сервером I-TASSER.

Уточнение модели и оценка качества

Процессы уточнения модели выполнены на сервере 3Drefine для выбранной модели полипептида. С этой целью анализировали всю структуру белка, включая элементы вторичной структуры, области петель и его боковые цепи. Пять факторов, включая оценку 3Drefine, GDT-TS, GDT-HA, RMSD, RWplus и MolProbity, – основные параметры для процесса уточнения, которые отражают потенциальную энергию (3Drefine-оценочная функция и RWplus), оценку сходства (GDT-TS и GDT-HA), классификации и физическую реалистичность соответственно. Далее выбирали уточненную модель с соответствующими характеристиками для дальнейших оценок упомянутых факторов. Выявлено, что уточненная сервером 3Drefine модель имеет значения GDT-TS 1.0000, GDT-HA 0.9644, RMSD 0.375, MolProbity 3.395, оценку 3Drefine 22028.8 и RWplus – 63478.84. На

Таблица 4. Результаты молекулярного докинга, проведенного с использованием сервера ClusPro, для предлагаемой последовательности потенциального иммуногена с МНС класса I

Выбранная модель МНС I	Репрезентативность	Взвешенная Score-функция
0	Центр	–829.0
	Самая низкая энергия	–829.0
1	Центр	–805.6
	Самая низкая энергия	–805.6
2	Центр	–659.0
	Самая низкая энергия	–745.5

следующем этапе геометрическое качество первичной и уточненной моделей проанализировали по графику Рамачандрана (рис. 5).

Молекулярный докинг

Результаты анализа молекулярного докинга подтвердили сродство химерных пептидов как МНС класса I, так и МНС класса II. Обнаружено, что химерный пептид проявлял большее сродство к МНС класса II с *e*-value, равным –920.88, тогда как для МНС класса I параметр составлял –772.51. В этом разделе альбумин использовали в качестве нейтрального белка. Кроме того, энергия связывания с МНС класса I и МНС класса II для сконструированного полипептида проанализирована с использованием онлайн-сервера Cluspro (<https://cluspro.bu.edu/login.php>). Результаты представлены в табл. 4 и табл. 5.

Обратная трансляция белка и дизайн конструкторов

Чтобы сконструировать кассету для экспрессии в плазмидном векторе для синтеза целевого белка, необходимо осуществить обратный перевод аминокислотной последовательности в нуклеотидную. С этой целью конечную пептидную последовательность преобразовали в нуклеотидную с использованием инструментов биоинформатики. Поиск ORF последовательности проводили в программе ORFfinder. Полученную нуклеотидную последовательность использовали для моделирования клонирования в вектор pET21 с использованием автономного программного обеспечения SnapGene. Эти результаты показаны на рис. 6.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Недавно разработали несколько методов для индукции иммуногенности вакцин и снижения связанных с их применением рисков. В случае рас-

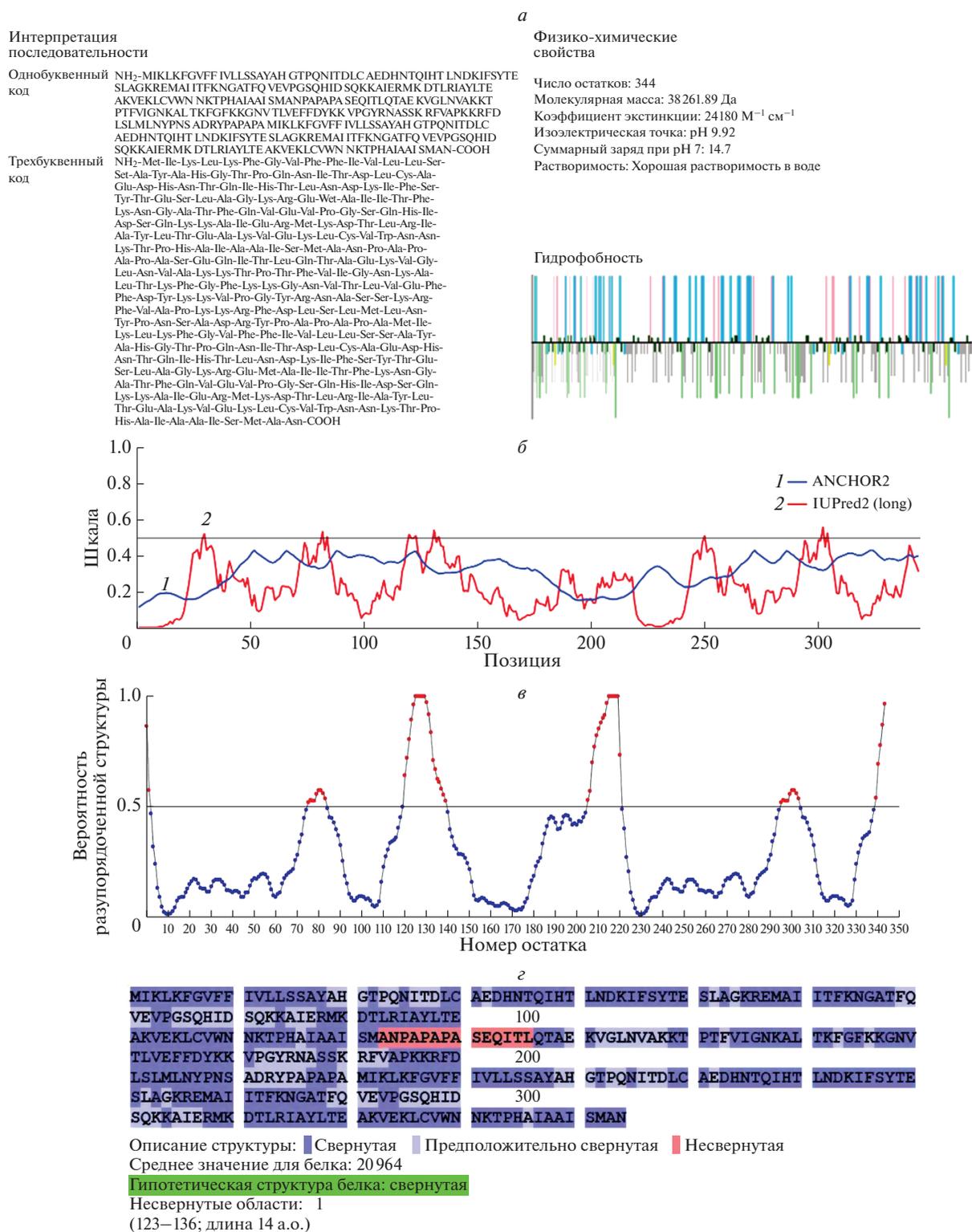


Рис. 2. Свойства сконструированного полипептида. *а* – Аминокислотная последовательность и физико-химические характеристики. Согласно результатам, получен полипептид с общим числом аминокислотных остатков (а.о.) 344, молекулярной массой 38261.89 Да, хорошо растворимый в воде. Кроме того, изоэлектрическая точка равна 9.92, а суммарный заряд при рН 7.0 – около 14.7. *б* – График стабильности белка, созданный с использованием сервера IUPred 2.0. Этот график подтверждает стабильность полученного полипептида, так как прогнозируемые нарушения в его структуре ниже порогового значения 0.5. *в* – Результаты анализа по программе IsUnstruct и предсказание неупорядоченных участков на основе модели Изинга. *г* – Предсказание по программе FoldUnfold в соответствии с аминокислотной последовательностью. Сервер FoldUnfold проверяет аминокислоту в последовательности. Свернутые и несвернутые области в последовательности показаны синим и красным цветом соответственно.

Число аминокислот: 344
 Молекулярная масса: 38262.32
 Теоретическая pI: 9.47
 Аминокислотный состав: CSV-формат

Ala (A)	38	11.0%
Arg (R)	10	2.9%
Asn (N)	20	5.8%
Asp (D)	13	3.8%
Cys (C)	4	1.2%
Gln (Q)	12	3.5%
Glu (E)	17	4.9%
Gly (G)	15	4.4%
His (H)	10	2.9%
Ile (I)	26	7.6%
Leu (L)	25	7.3%
Lys (K)	34	9.9%
Met (M)	9	2.6%
Phe (F)	19	5.5%
Pro (P)	16	4.7%
Ser (S)	19	5.5%
Thr (T)	26	7.6%
Trp (W)	2	0.6%
Tyr (Y)	10	2.9%
Val (V)	19	5.5%
Pyl (O)	0	0%
Sec (U)	0	0%
(B)	0	0%
(Z)	0	0%
(X)	0	0%

Общее число отрицательно заряженных остатков (Asp + Glu): 30

Общее число положительно заряженных остатков (Arg + Lys): 44

Предполагаемый период полужизни:

N-конец рассмотренной последовательности – M (Met)

Установленный период полужизни: 30 ч (ретикулоциты человека, *in vitro*)

> 20 ч (дрожжи, *in vivo*)

> 10 ч (*E. coli*, *in vivo*)

Рис. 3. Результаты предсказания стабильности сконструированного полипептида программой ProtParam. Аланин и лизин чаще всего встречаются в последовательности белка и в сумме составляют 20% всех аминокислот; расчетный период полужизни белка в клетках млекопитающих составляет около 30 ч.

a

Длина последовательности: 344

Метод GOR4:

α -спираль	(Hh) :	110	is	31.98%
3_{10} -спираль	(Gg) :	0	is	0%
π -спираль	(Ii) :	0	is	0%
β -мостик	(Bb) :	0	is	0%
Вытянутая β -структура	(Ee) :	66	is	19.19%
β -поворот	(Tt) :	0	is	0%
Область изгиба	(Ss) :	0	is	0%
Случайный клубок	(Cc) :	168	is	48.84%
Неоднозначные состояния	(?) :	0	is	0%
Другие состояния	:	0	is	0%

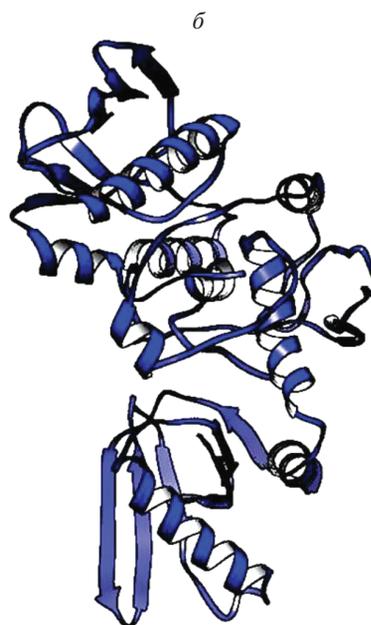


Рис. 4. Предсказание вторичной и третичной структуры сконструированного полипептида. *a* – Вторичная структура белка. Из 344 аминокислот 110, 66 и 168 вовлечены в формирование α -спирали, β -структуры и случайного клубка соответственно. *b* – Предсказанная с помощью сервера I-TASSER третичная структура.

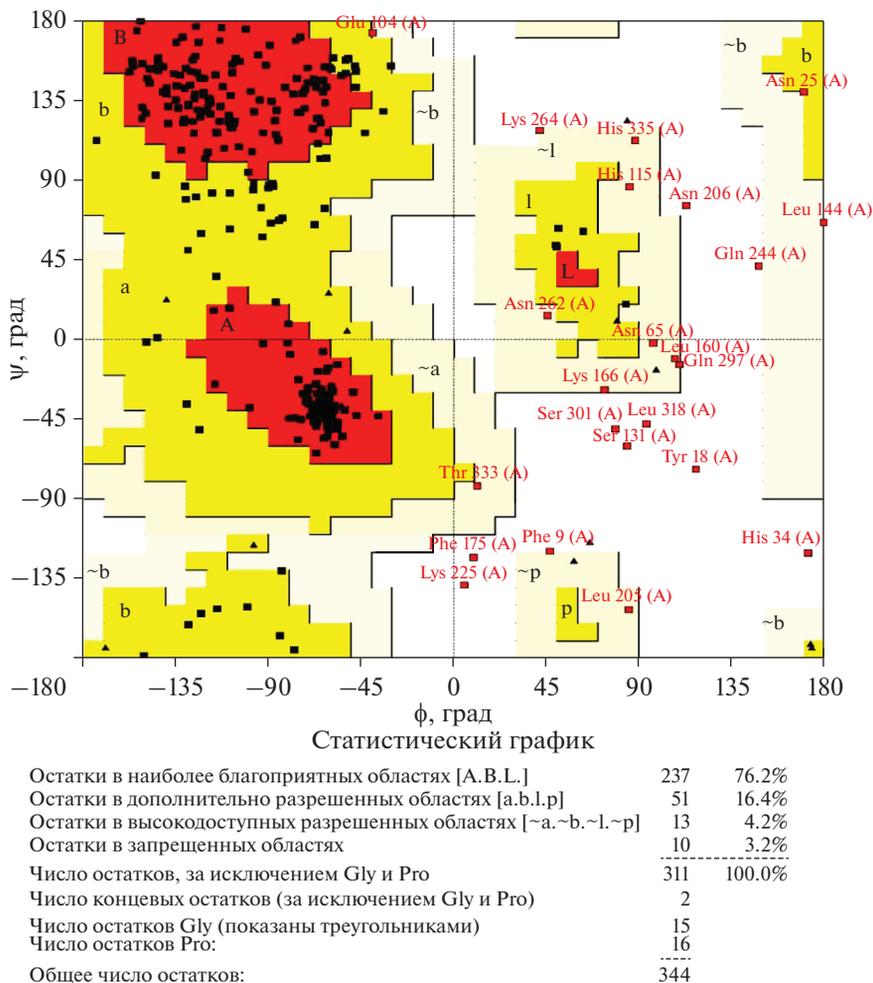


Рис. 5. Анализ пептидной последовательности по графику Рамачандрана.

пространенного зоонозного заболевания, Q-лихорадки, доступна только одна коммерческая вакцина. Это инактивированная формалином бактерия *C. burnetii* [8]. В представленной работе описано со-

Таблица 5. Результаты молекулярного докинга, проведенного с использованием сервера ClusPro, для предлагаемой последовательности иммуногена с МНС класса II

Выбранная модель МНС II	Репрезентативность	Взвешенная Score-функция
0	Центр	-824.2
	Самая низкая энергия	-824.2
1	Центр	-631.3
	Самая низкая энергия	-708.2
2	Центр	-648.4
	Самая низкая энергия	-737.4

здание полипептида, который может быть использован как иммуноген для вакцины против Q-лихорадки. Полипептид сконструирован на основе спрогнозированных функциональных и иммунодоминантных эпитопов *C. burnetii*. При предсказании эпитопов использовали несколько баз данных [27–29]. В пептидных вакцинах на конец аминокислотной цепи можно ввести метку, например Arg-тег, кальмодулинсвязывающий пептид, целлюлозсвязывающий домен, DsbA, с-мус-тег, глутатион-S-трансферазу, FLAG-, NAT-тег, His-тег, мальтозсвязывающий белок, NusA, S-тег и др. [30]. Дальнейшую белковую инженерию можно применять для солубилизации нерастворимого полипептида или стабилизации нестабильного [31]. После отбора эпитопов сконструированную аминокислотную последовательность обратно переводят в кодирующую ее нуклеиновую и полученный остов синтезируют и клонируют в подходящем хозяине для экспрессии целевого белка [32].

В последнее время опубликовано множество исследований по разработке вакцин на основе

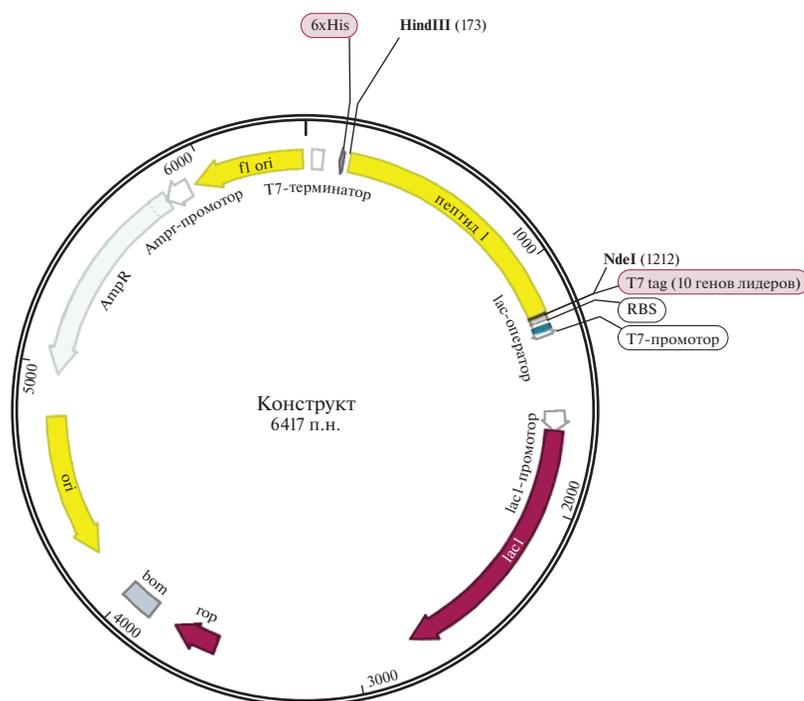


Рис. 6. Смоделированная и сконструированная конструкция ДНК, кодирующей полипептид в векторе экспрессии PET21. *In silico* клонирование проводили через сайты рестрикции NdeI и Hind III системы рЕТ.

пептидов против инфекционных заболеваний. Например, Farhadi и др. [33] представили вакцину на основе пептидов, которая состоит из эпитопов В-клеток и линейных CD4⁺ Т-клеток, выбранных из белков внешней мембраны (Omps) *Klebsiella pneumoniae*. В другом исследовании Nosrati и др. [34] получили мультиэпитопную рекомбинантную вакцину из линейных В-клеточных и Т-клеточных связывающих эпитопов из гликопротеинов Gc и Gp вируса геморрагической лихорадки Крым–Конго. Полученный ими оптимизированный пептид состоял из 382 аминокислотных остатков, организованных в четыре домена, включая линейные В-клеточные эпитопы, Т-клеточные эпитопы и два адъюванта [34]. В 2020 году Arganzad и соавт. [35] разработали и изготовили иммуногенный химерный белок против антигенов IpaD и IpaB из *Shigella dysenteriae* [35]. В 2021 году Sohali и др. [36] описали процедуру *in silico* для предсказания Т-клеточного эпитопа SARS-CoV-2 [36]. Jaydari и соавт. [37] сообщали о В- и Т-клеточных эпитопах против *C. burnetii*. В этой вакцине эпитопы Com1 и OmpH в различном порядке были организованы в 3 группы: Т-клеточные, В-клеточные и общие Т- и В-клеточные. Авторы показали, что каркас, сконструированный из эпитопов В-клеток, проявляет наибольшую иммуногенность как в отношении антигенов Com1, так и OmpH.

Нами исследованы все Т-клеточные эпитопы семи антигенов *C. burnetii*, включая белки Com1 и

OmpH (табл. 1). При разработке пептидных вакцин первостепенное значение имеет определение иммуногенных В-клеточных и Т-клеточных эпитопов. Т-клетки играют важную роль в иммунном ответе клетки на патогены. Бактерия *C. burnetii* – облигатный внутриклеточный патоген, поэтому иммунные ответы на *C. burnetii* главным образом основаны на Т-клеточном иммунитете [38]. Из-за этого мы сосредоточились на Т-клеточных эпитопах с высоким уровнем иммуногенности и сродства к МНС класса I и II. Мы изучили все Т-клеточные эпитопы семи антигенов *C. burnetii*, включая белки Com1 и OmpH (табл. 1). После проверки показателей иммуногенности, аллергенности, физико-химических характеристик и взаимодействия между вакциной-кандидатом и молекулами МНС была подтверждена пригодность вакцины-кандидата.

Иммуноинформатический подход – рентабельный, безопасный и быстрый метод разработки вакцин. Эта работа была направлена на создание мультиэпитопной вакцины против зоонозной бактерии *C. burnetii*, вызывающей Q-лихорадку. В результате сконструирован и наработан мультиэпитопный иммуногенный полипептид высокой стабильности, пригодный для использования в качестве иммуногена в вакцине против Q-лихорадки.

Авторы благодарят исследовательский совет Malek-Ashtar University of Technology (MUT) за финансовую поддержку этого исследования.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McQuiston J.H., Childs J.E., Thompson H.A. (2002) Q fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **221**(6), 796–799. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.796>
- Marrier T.J. (2010) Q fever pneumonia. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **24**(1), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.10.004>
- Angelakis E., Raoult D. (2010) Q fever. *Vet. Microbiol.* **140**(3–4), 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.016>
- Mori M., Mertens K., Cutler S.J., Santos A.S. (2017) Critical aspects for detection of *Coxiella burnetii*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **17**(1), 33–41. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1958>
- Fenollar F., Fournier P.E., Raoult D. (2004) Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4919–4924. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.4919-24>
- Melenotte C., Protopopescu C., Million M., Edouard S., Carrieri M.P., Eldin C., Angelakis E., Djossou F., Bardoin N., Fournier P.E., Mege J.L., Raoult D. (2018) Clinical features and complications of *Coxiella burnetii* infections from the French national reference center for Q fever. *JAMA Netw. Open.* **1**(4), e181580. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.1580>
- Njeru J., Henning K., Pletz M.W., Heller R., Neubauer H. (2016) Q fever is an old and neglected zoonotic disease in Kenya: a systematic review. *BMC Public Health.* **16**, 297. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-2929-9>
- Bond K.A., Franklin L.J., Sutton B., Firestone S.M. (2017) Q-Vax Q fever vaccine failures, Victoria, Australia 1994–2013. *Vaccine.* **35**(51), 7084–7087. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.088>
- Hornstra H.M., Priestley R.A., Georgia S.M., Kachur S., Birdsell D.N., Hilsabeck R., Gates L.T., Samuel J.E., Heinzen R.A., Kersh G.J., Keim P., Massung R.F., Pearson T. (2011) Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* **6**(11), e26201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026201>
- Vigil A., Ortega R., Nakajima-Sasaki R., Pablo J., Molina D.M. (2010) Genome-wide profiling of humoral immune response to *Coxiella burnetii* infection by protein microarray. *Proteomics.* **10**(12), 2259–2269. <https://doi.org/10.1002/prot.201000064>
- Florea L., Halldórsson B., Kohlbacher O., Schwartz R., Hoffman S., Istrail S. (2003) Epitope prediction algorithms for peptide-based vaccine design. *Proc. IEEE Comput. Soc. Bioinform. Conf.* **2**, 17–26. <https://doi.org/10.1109/CSB.2003.1227293>
- Zhang Q., Wang P., Kim Y., Haste-Andersen P., Beaver J., Bourne P.E., Bui H.H., Buus S., Frakild S., Greenbaum J., Lund O., Lundegaard C., Nielsen M., Ponomarenko J., Sette A., Zhu Z., Peters B. (2008) Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Res.* **36**, 513–518. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn254>
- Saha S., Bhasin M., Raghava G.P.S. (2005) Bcipep: a database of B-cell epitopes. *BMC Genom.* **6**, 79. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-79>
- Deavin A.J., Auton T.R., Greaney P.J. (1996) Statistical comparison of established T-cell epitope predictors against a large database of human and murine antigens. *Mol. Immunol.* **33**(2), 145–155. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(95\)00120-4](https://doi.org/10.1016/0161-5890(95)00120-4)
- Consortium T. (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* **47**(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Doytchinova I., Flower D. (2007) VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinform.* **8**(4), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
- Dimitrov I., Bangov I., Flower D., Doytchinova I. (2014) AllerTOP v.2 – a server for *in silico* prediction of allergens. *J. Mol. Model.* **20**(6), 2278–2284. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>
- Lear S., Cobb S. (2016) Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **30**(3), 271–277. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-9902-7>
- Dosztányi Z., Csizmok V., Tompa P., Simon I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics.* **21**(16), 3433–3434. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti541>
- Lobanov M.Y., Sokolovskiy I.V., Galzitskaya O.V. (2013) IsUnstruct: prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **31**(10), 37–41. <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.718529>
- Galzitskaya O., Garbuzynskiy S. (2006) FoldUnfold: web server for the prediction of disordered regions in protein chain. *Bioinformatics.* **22**(23), 2948–2949. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl504>
- Zhang Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* **9**(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Wiederstein M., Sippl M. (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**(Web Server issue), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Vajda S., Yueh C., Beglov D., Bohnuud T., Mottarella S.E., Xia B., Hall D.R., Kozakov D. (2017) New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins.* **85**(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/prot.25219>
- Kozakov D., Beglov D., Bohnuud T., Mottarella S.E., Xia B., Hall R., Vajda S. (2013) How good is automated protein docking? *Proteins.* **81**(12), 1–22. <https://doi.org/10.1002/prot>
- Kozakov D., Hall D.R., Xia B., Porter K.A., Padhorny D., Yueh C., Beglov D., Vajda S. (2017) The ClusPro web server for protein – protein docking. *Nat.*

- Protoc.* **12**(2), 255–278.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
27. Soria-Guerra R.E., Nieto-Gomez R., Govea-Alonso D.O., Rosales-Mendoza S. (2015) An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *J. Biomed. Inform.* **53**, 405–414.
<https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>
 28. Wagstaff S.C., Laing G.D., Theakston R.D.G., Pappaspyridis C., Harrison R.A. (2006) Bioinformatics and multi-epitope DNA immunization to design rational snake antivenom. *PLoS Med.* **3**(6), 832–844.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030184>
 29. Patronov A., Doytchinova I. (2013) T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol.* **3**(1), 120139.
<https://doi.org/10.1098/rsob.120139>
 30. Terpe K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**(5), 523–533.
<https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6>
 31. Kazlauskas R.J., Bornscheuer U.T. (2009) Finding better protein engineering strategies. *Nat. Chem. Biol.* **5**(8), 526–529.
<https://doi.org/10.1038/nchembio0809-526>
 32. Ghorban Hosseini N., Tebianian M., Farhadi A., Hossein Khani A., Rahimi A., Mortazavi M., Hosseini S.Y., Taghizadeh M., Rezaei M., Mahdavi M. (2017) *In silico* analysis of L1/L2 sequences of human papillomaviruses: implication for universal vaccine design. *Viral. Immunol.* **30**(3), 210–223.
<https://doi.org/10.1089/vim.2016.0142>
 33. Farhadi T., Karimia Z., Younes G., Nezafatb N., Hemmati S., Erfani N. (2015) Production of a novel multi-epitope vaccine based on outer membrane proteins of *Klebsiella pneumoniae*. *Trends Pharm. Sci.* **1**, 167–172.
 34. Nosrati M., Behbahani M., Mohabatkar H. (2019) Towards the first multi-epitope recombinant vaccine against Crimean–Congo hemorrhagic fever virus: a computer-aided vaccine design approach. *J. Biomed. Informat.* **93**, 103160.
<https://doi.org/10.1016/j.jbi.2019.103160>
 35. Aryanzad S.A., Zeinoddini M., Haddadi A., Nazarian S., Sajedi R.H. (2020) *In silico* design of chimeric and immunogenic protein-containing IpaB and IpaD as a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae*. *Curr. Proteom.* **17**(4), 333–341.
<https://doi.org/10.2174/1570164617666190906145843>
 36. Sohail M.S., Ahmed S.F., Quadeer A.A., McKay M.R. (2021) *In silico* T cell epitope identification for SARS-CoV-2: progress and perspectives. *Adv. Drug Del. Rev.* **171**, 29–47.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.007>
 37. Jaydari A., Forouharmehr A., Nazifi N. (2019) Determination of immunodominant scaffolds of Com1 and OmpH antigens of *Coxiella burnetii*. *Microb Pathog.* **126**, 298–309.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.012>
 38. Zhang G., Peng Y., Schoenlaub L., Elliott A., Mitchell W., Zhang Y. (2013) Formalin-inactivated *Coxiella burnetii* phase I vaccine-induced protection depends on B cells to produce protective IgM and IgG. *Infect. Immun.* **81**(6), 2112–2122.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00297-13>

***In silico* DESIGN OF A NEW MULTI-EPITOPE PEPTIDE-BASED VACCINE CANDIDATE AGAINST Q FEVER**

S. Jabarzadeh¹, A. Samiminemati¹, and M. Zeinoddini¹. *

¹ Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

*e-mail: zeinoddini52@mut.ac.ir

Novel types of the vaccines with high immunogenicity and low risks, including epitope-based vaccines, are sought. Among zoonotic disease, Q fever caused by *Coxiella burnetii* is an important target due to numerous outbreaks and the pandemic potential. Here we present a synthetic multi-epitope vaccine against *Coxiella burnetii*. This vaccine was developed using immunoinformatics approach. Antigenic proteins were studied, and five T cell epitopes were selected. Antigenicity, allergenicity, and toxicity of the selected epitopes were evaluated using the VaxiJen 2.0, AllerTOP, and ToxinPred servers, respectively. Selected epitopes were joined in a peptide sequence, with the cholera toxin B subunit (CTxB) as an adjuvant. The affinity of the proposed vaccine to MHC I and II molecules was measured in a molecular docking study. Resultant vaccine has high antigenicity, stability, and a half-life compatible with utilization in vaccination programs. In conclusion, the validated epitope sequences may be used as a potential vaccine to ensure protection against Q fever agent.

Keywords: Q fever, *Coxiella burnetii*, peptide-based vaccine, immune informatics, epitope