

Конструирование мультиэпитопной субъединичной вакцины против бруцеллеза с помощью методов обратной вакцинологии

В.И.Дятлова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Бруцеллез – это широко распространенное в мире зоонозное заболевание, поражающее как животных, так и человека. Вакцинация является одной из мер по борьбе с распространением данной инфекции. Использование новых биоинформационных подходов к разработке вакцин может позволить получить безопасный и эффективный препарат в короткие сроки. В нашей работе мы создали прототип мультиэпитопной вакцины против бруцеллеза с помощью методов обратной вакцинологии. Она содержит эпитопы для цитотоксических и хелперных Т-клеток, В-эпитопы, 2 адъювантные молекулы, разделенные линкерами, и специфический таг. В ходе исследования были оценены физико-химические, антигенные и другие свойства вакцины. Создана трехмерная модель белка, с помощью которой предсказана способность связывания и динамическое поведение вакцины с рецепторами иммунных клеток.

Ключевые слова: *Brucella*, бруцеллез, вакцина, эпитоп, обратная вакцинология, биоинформатика

Для цитирования: Дятлова В.И. Конструирование мультиэпитопной субъединичной вакцины против бруцеллеза с помощью методов обратной вакцинологии. Бактериология. 2023; 8(4): 14–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-14-27

Construction of multiepitope subunit vaccine against brucellosis using reverse vaccinology methods

V.I.Dyatlova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Brucellosis is a widespread zoonotic disease worldwide, affecting both animals and humans. Vaccination is one of the measures to combat the spread of this infection. The use of new bioinformatic approaches to vaccine development can make it possible to obtain it safe and effective in a short time. In our work, we created a prototype of a multi-epitope vaccine against brucellosis using reverse vaccinology methods. It contains epitopes for cytotoxic and helper T cells, B epitopes, 2 adjuvant molecules separated by linkers and a specific tag. The study assessed the physicochemical, antigenic, and other properties of the vaccine. A three-dimensional protein model was created, which was used to predict the binding ability and dynamic behavior of the vaccine with immune cell receptors.

Key words: *Brucella*, brucellosis, vaccine, epitope, reverse vaccinology, bioinformatics

For citation: Dyatlova V.I. Construction of multiepitope subunit vaccine against brucellosis using reverse vaccinology methods. Bacteriology. 2023; 8(4): 14–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-14-27

Пандемия COVID-19 показала, что иммунизация является одной из наиболее эффективных мер по охране общественного здоровья. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, она позволяет спасти ежегодно до 3 млн жизней [1]. Кроме того, вакцинация, наряду с другими методами профилактики инфекционных заболеваний, позволяет существенно сократить расходы государства на здравоохранение, повысив при этом качество жизни населения.

Для корреспонденции:

Дятлова Варвара Ивановна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 26
Телефон: (4967) 36-0003

Статья поступила 14.11.2023, принята к печати 25.12.2023

Бруцеллез является одним из заболеваний, наносящих существенный экономический урон в сельском хозяйстве; он связан не только с заболеванием и гибелью животных, но и с запаздыванием диагностики у людей из-за подострого начала, неспецифической клинической картины и, как следствие, хронизации инфекции и инвалидизации контактных лиц. Вакцинация традиционными живыми аттенуированными вакцинами позволяет ограничить распространение заболевания, однако обладает и недостатками, включая остаточ-

For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, MD, PhD, Researcher of the Department of Particularly Dangerous Infections of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 26 «Quarter A» territory, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

The article was received 14.11.2023, accepted for publication 25.12.2023

ную вирулентность, осложнение диагностики и ряд противопоказаний к применению [2].

Использование новых биоинформационных подходов к разработке вакцин позволит не только избежать указанных недочетов, но и заранее предсказать эффективность вакцин, а также существенно сократить время и средства при их создании, производстве и тестировании [3].

Применение обратной вакцинологии (ОВ) при выборе вакцины-кандидата против различных целевых бактериальных и вирусных патогенов признано во всем мире. Первой лицензированной вакциной, созданной с помощью методов ОВ, была вакцина против *Neisseria meningitidis* серогруппы B (Bexsero, GSK Vaccines) [4], которая успешно применяется на практике уже много лет. В настоящее время находятся на различных стадиях разработки вакцины против SARS-CoV-2, *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* и других инфекций [5].

В связи с низкой иммуногенностью моновалентных вакцин все большую популярность приобретает подход конструирования мультиэпитопных вакцин (МЭВ), включающих эпитопы различных иммунодоминантных белков патогена, перекрывающих большой спектр иммунных реакций и уменьшающих вероятность гомологии цельного белка микроорганизма с белками человека. Эти вакцины, как правило, включают антигенные детерминанты как клеточного, так и гуморального иммунитета, а также адъювантные молекулы в составе одного синтетического или рекомбинантного белка. При конструировании и прогнозировании эффективности МЭВ используется большое количество компьютерных программ и баз данных, включающих различные алгоритмы расчета, позволяющие поэтапно проводить отбор компонентов вакцины и оценку их качества. Применение биофизических подходов при разработке вакцин *in silico*, таких как молекулярный докинг и анализ молекулярно-динамического моделирования, позволяет предсказать способность связывания и динамическое поведение вакцины с рецепторами иммунных клеток.

В последние годы было предпринято несколько попыток создания МЭВ против бруцеллеза методами ОВ (на основе эпитопов белков *Brucella* Omp19, Omp22, Omp28, Omp31,

BLS, DnaK, L7/L12 и других), однако ни одна из них не была реализована и не прошла клинические испытания [6, 7].

Целью данного исследования являлось конструирование прототипа новой мультиэпитопной субъединичной вакцины против бруцеллеза методами обратной вакцинологии (ОВ).

Материалы и методы

Для анализа были использованы последовательности протеомов 10 штаммов бруцелл: *Brucella abortus* bv. 1 str. 9-941 (UP000000540), *B. abortus* 2308 (UP000002719), *B. abortus* 544 (UP000013221), *B. abortus* str. 63/75 (UP000028790), *B. melitensis* bv. 3 str. *Ether* (UP000028783), *B. melitensis* biotype 1 (str. 16M / ATCC 23456) (UP000028788), *B. melitensis* bv. 2 str. 63/9 (UP000028806), *B. suis* biovar 1 (strain 1330) (UP000029041), *B. suis* (Thompson) (UP000029006), *B. canis* (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) (UP000001385), а также человека (*Homo sapiens* (UP000005640)), мыши (*Mus musculus* (UP000000589)), крупного рогатого скота (*Bos taurus* (UP000009136)), козы (*Capra hircus* (UP000291000)), овцы (*Ovis aries* (UP000002356)), свиньи (*Sus scrofa* (UP000008227)) и собаки (*Canis lupus familiaris* (UP000002254)), полученные в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/teomes>).

Этапы работы по конструированию и валидации МЭВ указаны на рис. 1.

Выбор белка и предиктивная оценка его свойств с помощью методов обратной вакцинологии

Отбор кандидатных бруцеллезных белков проводился методами ОВ, как было описано ранее [8]. С помощью анализа протеома штамма *B. abortus* bv. 1 str. 9-941 (UPID: UP000000540) программой PSORTdb4.0 (<https://db.psort.org>) был предсказан ряд поверхностных бруцеллезных белков, для которых с помощью 24 компьютерных программ была проведена предиктивная оценка их физико-химических, антигенных, иммуногенных и других свойств, а также определен уровень гомологии с белками человека и его микробиоты. Для белков с лучшими вычисленными показателями в ходе биоинформатического анализа, а также белков, выбран-

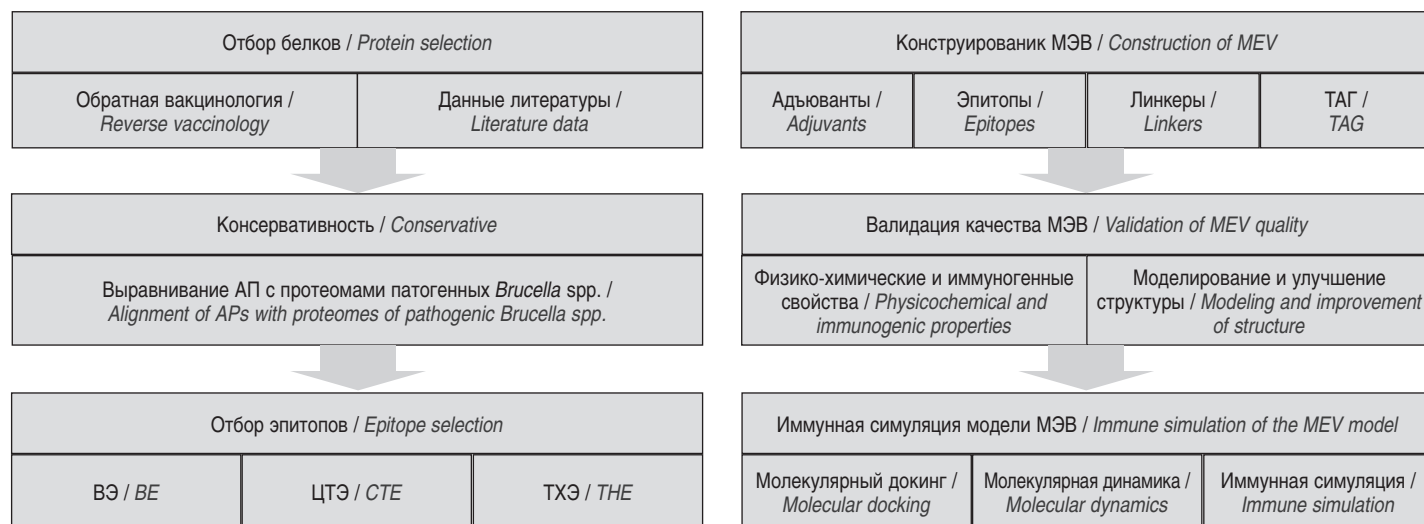


Рис. 1. Этапы конструирования и валидации МЭВ.

Fig. 1. Stages of design and validation of MEV.

ных по результатам анализа литературы, было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей (АП) с протеомами 10 штаммов патогенных для человека видов бруцелл в программах Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/>) и BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Прогнозирование и оценка эпитопов для целей включения в состав вакцины против бруцеллеза

Для целей конструирования МЭВ с помощью программного обеспечения рассчитывали Т- и В-клеточные эпитопы в составе отобранных бруцеллезных белков. Среди Т-эпитопов отдельно определяли CD8⁺ Т-эпитопы (ЦТЭ), активирующие цитотоксические Т-лимфоциты, и CD4⁺ Т-эпитопы (ТХЭ), активирующие Т-хелперы. Отбор Т-эпитопов из бруцеллезных белков проводился с учетом полиморфизма главного комплекса гистосовместимости (МНС) на территории Российской Федерации (РФ). С помощью базы данных частот аллелей (Allele Frequencies Net Database/AFND) (<http://www.allelefrequenciest.net/>) были отобраны наиболее часто встречающиеся аллели HLA класса I (A*(01, 02, 03, 11, 24, 30), B*(07, 08, 13, 15, 18, 35, 40, 44, 49, 51), C*(03, 04, 06, 07, 08, 12))) и II (DRB1*(01, 04, 07, 11, 12, 13, 15), DQA1*(01, 02, 03, 05), DQB1*(02, 03, 05, 06), DPA1*(01), DPB1*(02, 04)) у населения в 53 субъектах РФ, выборка составила 15 490 человек. С помощью компьютерных программ определялись ЦТЭ и ТХЭ, имеющие высокое сродство связывания к каждому из отобранных человеческих лейкоцитарных антигенов HLA класса I и II соответственно, затем определялись дополнительные характеристики, косвенно указывающие на высокую степень вероятности активации Т-клеточного рецептора выбранными эпитопами в комплексе пептид/МНС.

В-клеточные рецепторы распознают не только линейные, но и конформационные эпитопы, поэтому для вычисления В-эпитопов (ВЭ) в качестве исходных данных использовались не только аминокислотные последовательности белков, представленные в формате FASTA (база данных UniProt), но также последовательности структур бруцеллезных белков, определенные как кристаллографией (RCSB Protein Data Bank/RCSB PDB) (<https://www.rcsb.org/>), так и вычисленные компьютерным анализом (AlphaFold Protein Structure Database/AlphaFoldDB) (<https://alphafold.com/>), сохраненные в формате PDB. ВЭ вычислялись с помощью нескольких серверов с учетом таких свойств пептидов, как гидрофильность, гибкость, доступность, полярность, экспонирование на поверхности, антигенность и наличие поворотов, и ранжировались по величине комбинированной оценки.

Предсказанные ЦТЭ, ТХЭ, ВЭ с лучшими ранговыми оценками подвергались дополнительному скринингу. С помощью методов биоинформатики рассчитывались физико-химические свойства (молекулярная масса, изоэлектрическая точка (pI), заряд, индекс нестабильности, алифатический индекс, среднее значение гидропатии (GRAVY), (ProtParam (<https://web.expasy.org/>), значения гидрофобности, гидрофильности (Peptide2 (<https://www.peptide2.com/>), Proteomics tools (<http://www.innovagen.com/>)), консервативность для белка (Epitope Conservancy Analysis (<http://tools.iedb.org/>), растворимость (SolPro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>)), иммуногенные свойства пептидов (иммуногенность (Class I

Immunogenicity, CD4episcore (<http://tools.iedb.org/>), антигенность (ANTIGENpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/>), аллергенность (AlgPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/>), AllerCatPro 2.0 (<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>), AllerTOP v2.0, (<http://www.ddg-pharmfac.net/>), токсичность (ToxDL (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/>), ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/>)), вероятность индукции провоспалительного (PIP-EL (<http://www.thegleelab.org/>)), противовоспалительного ответов (PreAIP (<http://kurata14.bio.kyutech.ac.jp/>)), γ -интерферон (ИФН- γ), интерлейкины ИЛ-1, -4, -6, -10, синтез антител классов A, G, E (IFNepitope, IL2Pred, IL4Pred, IL-6Pred, IL10Pred, IL-13Pred, IgPred (<https://webs.iitd.edu.in/>)), отсутствие гомологии (с белками человека, микробиоты кишечника человека (HMMER 3.4 (<https://www.ebi.ac.uk/>), PBIT (<http://www.pbit.bicnirrh.res.in/>), (Ensembl (<https://www.ensembl.org/>), BLASTp, порог идентичность >50%, покрытие >50%, E-значение <0,005), а также степени покрытия внутрипопуляционного полиморфизма HLA при применении выбранных эпитопов (CD4episcore, Population Coverage (<http://tools.immuneepitope.org/>), NetCTLpan-1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>)).

В качестве наиболее вероятных кандидатов на включение в состав МЭВ рассматривались неаллергенные, нетоксичные, негомологичные белкам человека и животных пептиды с максимальными показателями иммуногенности, антигенности, связывающие наибольшее число аллельных вариантов антигенов HLA, обладающие гидрофильностью, высокой растворимостью, а также рядом других показателей.

Вычисление эпитопов для цитотоксических Т-лимфоцитов

ЦТЭ, длиной 9 аминокислотных остатков (aa), в белковых последовательностях предсказывали с помощью серверов NetMHCpan-4.1.a. (<https://services.healthtech.dtu.dk/>) и MHC-I Binding Predictions v.2.24 (<http://tools.immuneepitope.org/>), где пептиды, имеющие сродство к антигенам HLA класса I (часто встречающихся на территории РФ аллелей), с ранговой оценкой <0,5% определялись как «сильные связывающие» эпитопы и отбирались для дальнейшего анализа. В программах NetCTLpan 1.1, MHC-I Processing Predictions (<http://tools.immuneepitope.org/>), T cell class I (<https://nextgen-tools.iedb.org/>) вычислялась комбинированная оценка для каждого пептида, включающая аффинность связывания с молекулами HLA-I (порог концентрации полумаксимального ингибирования IC50 <50 нМ для сильно связывающих, 50–500 нМ для средне связывающих HLA-I эпитопов), эффективность протеасомального расщепления С-конца пептида (>0,225) и его транспорта антигена транспортером, связанным с процессингом белкового комплекса (TAP) (>0,05). Среди ТЦЭ с полученной ранговой оценкой <1,0% (NetCTLpan 1.1) или эпитопов с общей оценкой >0 и IC50 <200 нМ (T cell class I) проводился отбор пептидов на основе прогноза их физико-химических и иммуногенных свойств, гомологии с белками человека, а также с учетом общего числа антигенов HLA-I, к которому имеет сродство эпитоп.

Прогнозирование эпитопов для Т-хелперов

ТХЭ, длиной 15 aa, в белковых последовательностях предсказывали с помощью серверов NetMHCIIpan 4.0 ([16](https://</p></div><div data-bbox=)

services.healthtech.dtu.dk/) и MHC-II Binding Predictions (<http://tools.immuneepitope.org/>), где пептиды, имеющие сродство к антигенам HLA класса II (часто встречающихся на территории РФ аллелей), с ранговой оценкой (Rank_EL) <1% определялись как сильные, а 1–5% – как слабые связывающие эпитопы. Также учитывался показатель прогнозируемого сродства связывания IC50 (<50нМ) и ранг сродства по сравнению с набором из случайных природных пептидов (Rank_BA <1). Среди данных эпитопов с помощью программ, указанных выше, исключались аллергены, токсичные пептиды, гомологи белков человека и микробиоты кишечника, неантигены (оценка Vaxijen <0,4), пептиды с низкой иммуногенностью (комбинированная оценка CD4episcore с учетом сродства к 7 вариантам HLAII). Для оставшихся эпитопов оценивалась вероятность продукции цитокинов иммунными клетками после активации рецепторов комплексом пептид/HLA II. Отбирались ТХЭ преимущественно с гидрофильными свойствами, растворимые в воде, с учетом максимального охвата аллель-специфических вариаций рестрикции эпитопов к HLA II.

Прогнозирование В-клеточных эпитопов

Линейные В-эпитопы бруцеллезных белков рассчитывались с помощью программ Vsepred, IgPred, ABCpred, Lbtope (<https://webs.iitd.edu.in/>), SVMTriP (<http://sysbio.unl.edu/>), BepiPred-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>), с пороговыми значениями оценок (score), установленными по умолчанию. Конформационные В-эпитопы определялись с помощью программы ElliPro (<http://tools.iedb.org/>), баз данных RCSB PDB и AlphaFoldDB. Для ВЭ с наиболее высокими ранговыми оценками рассчитывались дополнительные параметры, указанные выше. ВЭ, не имеющие гомологии с белками человека, с оптимальными значениями физико-химических и иммуногенных показателей отбирались для включения в МЭВ.

Конструирование МЭВ

В состав МЭВ включались Т- и В-клеточные эпитопы с лучшими оценочными показателями, разделенные линкерами (KK для В-эпитопов, AAY – для ЦТЭ, GP GPG – для ТХЭ, EAAAK – для адъювантов, HEYGAEALERAG – между ТЦЭ и ТХЭ, R VRR – перед полигистидиновым тагом), а также адъювантные последовательности на N-конце, полигистидиновый таг на C-конце полипептидной цепи.

Предсказание физико-химических и иммуногенных свойств МЭВ

С помощью компьютерных программ рассчитаны следующие характеристики МЭВ: молекулярная масса, аминокислотный состав, заряд, pI, коэффициент молярной экстинкции, заряд белка, индекс нестабильности, алифатический индекс, GRAVY, время полужизни белка при экспрессии в *E. coli*, дрожжах, клетках млекопитающих (ProtParam), растворимость (SOLpro, Protein-Sol, Innovagen, CCSOL), антигенность (VaxiJen v.2.0, ANTIGENpro), протективность (Vaxign-ML (<https://violinet.org/>)), аллергенность (AllerTOP v.2.0, AllergenFP v.1.0, AlgPred2), токсичность (ToxDL, ToxinPred2), общая иммуногенность белков (Class I Immunogenicity IEDB).

Прогнозирование структуры МЭВ

Вторичная структура МЭВ

Вторичная структура МЭВ вычислялась с помощью программ PSIPRED (<http://www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/>), SSpro8 (<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>), RaptorX Property (<http://raptorx2.uchicago.edu/>). Прогнозировалось расположение основных структур (8 классов: 310-, α -, π -спирали, β -лист, β -мост, поворот, изгиб, катушка), полярных молекул, неупорядоченных участков (DISOPRED3).

Моделирование третичной структуры МЭВ, структурные улучшения и валидация качества модели

Моделирование третичной структуры белка выполнено в программах RoseTTAFold (<https://rosetta.bakerlab.org/>), IntFOLD (<https://www.reading.ac.uk/>), I-TASSER (<https://zhanglab.dcm.med.umich.edu/>). Оценка качества моделей проводилась в программах MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), SAVES v6.0 (ERRAT, VERIFY, PROCHECK) (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/>), Structure Assessment (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Улучшения качества модели осуществляли в программах GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/>), 3Drefine (<https://3drefine.mu.hekademeia.org/>), ReFOLD3, ModFOLD9 (<https://www.reading.ac.uk/>), ModRefiner (<https://zhanggroup.org/>). PREFMD (<https://feig.bch.msu.edu/>). 3D-модели визуализировали с помощью программы ChimeraX (<https://www.rbvi.ucsf.edu/>).

Минимизация энергии МЭВ

Энергетическую минимизацию с помощью силового поля выполняли в программе YASARA Energy Minimization Server (<http://www.yasara.org/>), где корректировались цис-пептидные связи и неправильные изомеры боковой цепи. Минимизация останавливалась, как только энергия снижалась менее чем на 0,05 кДж/моль на атом в течение 200 шагов. Показатель энергии в программе представляет собой сумму энергии силового поля (исключая воду) и неявной энергии сольватации (метод быстрых граничных элементов) и демонстрирует то, на сколько стандартных отклонений качество структуры отличается от типичной рентгеновской структуры с высоким разрешением.

Определение конформационных эпитопов

Конформационные В-эпитопы вычислялись в программе ElliPro (<http://tools.iedb.org/>), учитывались пептиды с оценочным показателем >0,5.

Иммунная симуляция МЭВ

Молекулярный докинг МЭВ с иммунными рецепторами

Молекулярный докинг модели МЭВ со структурами TLR-1,2,3,4,6, HLA-A*02:01 и HLA-DRB1*01:01 осуществлялся в программах ClusPro2 (<https://cluspro.org/>), HawkDock (<http://cadd.zju.edu.cn/>) и HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) в три последовательных этапа: стыковка твердых тел, кластеризация структур с наименьшей энергией и структурные улучшения за счет минимизации энергии. Модели ранжировались по наименьшему энергетическому рейтингу и макси-

мальному числу точек стыковки. Для анализа отбирались в большинстве случаев модели с наименьшим рангом, учитывая сбалансированный оценочный показатель.

Симуляция молекулярной динамики стыковочного комплекса

Динамическое моделирование проводилось для определения стабильности белкового комплекса МЭВ/TLR-4 в различных термобарических условиях. Для этого первоначально выполнялась минимизация энергии прогнозируемой вакцины в программе YASARA Energy Minimization Server. На сервере PRODIGY (<https://bianca.science.uu.nl/>) определялись прогнозируемые аффинность связывания (свободная энергия Гиббса (ΔG)) комплекса, константа диссоциации (Kd), количество и тип межмолекулярных контактов в пределах предельного расстояния 5,5 Å, доля заряженных и неполярных аминокислот на невзаимодействующей поверхности.

Моделирование молекулярной динамики комплекса МЭВ/TLR-4 проводили в программе MDWeb (<https://mmb.irbbarcelona.org/>). Метод моделирования основан на хорошо известных программах, таких как Amber, NAMD и Gromacs, а также включает ряд инструментов анализа траекторий. В MDWeb определяются недостатки структуры, такие как альтернативное местоположения остатка, разрывы последовательности, столкновения атомов, неправильная хиральность, необычная конфигурация цис-пептидных связей, дисульфидные связи, вставки, структуры, содержащие нуклеиновые кислоты, металлы, лиганды.

Анализ нормальной моды (normal mode analysis/NMA) проводили на сервере iMODS (<https://imods.iqfr.csic.es/>), осу-

ществляющем расчет вероятных движений комплекса на основе специализированных параметров, включая В-фактор, среднеквадратичное отклонение позиции атомов (RMSD), деформируемость комплекса, значения ковариации и упругости модели, обеспечивающие минимизацию энергии, молекулярную стабильность и подвижность атомов.

Также использовался веб-инструмент для анализа гибкости белков FlexServ (<https://mmb.irbbarcelona.org/>), включающий в себя протоколы для вычисления динамики белков (определение базового геометрического анализа, В-фактора, существенную динамику, анализ жесткости, меры коллективности, индексы Линдемманна, корреляцию остатков, цепную корреляцию, определение динамической области, обнаружение шарнирных точек) с использованием 3 типов моделирования, включающих анализ нормального режима, броуновскую и дискретную динамику.

В программе MDdMD (<https://mmb.irbbarcelona.org/>) проводили поиск путей конформационного перехода комплекса с помощью дискретного молекулярно-динамического моделирования, основанного на сочетании методов существенной динамики и методов выборки Максвелла–Демона.

Симуляция иммунного ответа против МЭВ

Программа C-ImmSim (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/>) использовалась с целью компьютерного иммунологического моделирования клеточных и гуморальных реакций, возникающих против антигенной вакцины. Сервер использует антигенные пептидные последовательности и рецепторы лимфоцитов для имитации иммуногенных ответов. В этом исследовании применялся стандартный клинический протокол с четырехнедельным периодом между двумя дозами для проведения

Таблица 1. Предсказанные эпитопы бруцеллезных белков для ТЦЭ
Table 1. Predicted CTL epitopes of brucella proteins

Название / Title	Пептид / Peptide	Начало, aa / Beginning, aa	Белок (UniProt) / Protein (UniProt)	ГП / HP	Протеос. / Proteos.	TAP / TAP	ИМ / IM	АГ / AG	N HLA	HLAmax	Аффинность / Affinity	IC50
Ц1	AERLAVEAW	189	Q57FW8	0,11	1,4	0,46	0,19	0,78	3	B44	0,97	15,7
Ц2	FQSDDNFQV	439	Q2YR58	-0,94	1,1	0,12	0,02	0,6	6	A2	0,89	7,5
Ц3	GAYGYRLYK	3049	A0A0H3GGE2	-0,83	0,8	0,27	0,07	1,15	4	A11	0,92	5,2
Ц4	IPFDDISGY	468	Q2YR58	0,08	1,3	1,18	0,09	0,55	7	B35	0,99	6,2
Ц5	KEIGWTPSL	435	A0A7U8PLF0	-0,39	1,5	0,48	0,22	0,82	6	B40	0,99	8,2
Ц6	RLSAGFDVF	498	Q2YRQ2	0,69	1,4	1,14	0,17	0,97	2	B15	0,72	13
Ц7	RPVRGRRGL	673	Q57DM9	-1,38	1,4	0,37	0,21	0,98	1	B7	0,98	3,5
Ц8	RVRARALAL	16	Q2YNI2	0,41	1,5	0,51	0,16	0,96	6	B7	0,91	5,4
Ц9	YAMRATLVY	119	A0A0H3GGE2	0,63	1,5	1,28	0,08	0,52	9	B35	0,99	2,1
Ц10	YRFNESVRL	621	Q2YIK8	-0,81	1,6	0,50	0,03	0,6	2	C6	0,96	16,5
Ц11	YFDLNFYRF	367	Q57E55	-0,21	1,4	1,01	0,16	2,3	7	C4	0,94	39

ИМ – иммуногенность, АГ – антигенность, HLAmax – антиген с наибольшим сродством к пептиду, Протеос. – прогноз протеосомального С-терминального расщепления пептида; TAP – показатель эффективности связывания с TAP; IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования; жирным выделены «индукторы» ИФН-γ; подчеркнуты пептиды, растворимые в воде, сд – содержащий домен.

IM – immunogenicity, AG – antigenicity, HLAmax – antigen with the highest affinity for the peptide, Протеос. – prediction of proteasomal C-terminal cleavage of the peptide; TAP – an indicator of the efficiency of binding to TAP; IC50 – concentration of half-maximal inhibition; “inducers” of ИФН-γ – highlighted in bold; Water-soluble peptides with a CD-containing domain are underlined.

Таблица 2. Предсказанные эпитопы бруцеллезных белков для Т-хелперов
Table 2. Predicted Th epitopes of brucella proteins

Название / Title	Пептид / Peptide	Белок (UniProt) / Protein (UniProt)	Начало, aa / Beginning, aa	ГП / HP	ИМ / IM	АГ / AG	N HLAII	HLAII max	Аффинность / % ранг / Affinity / % rank
Tx1	VKAEDYDFQRFNDVKS	Q93SI4	174	-1,1	65	0,9	8/3	DPA1*1/ DPB1*4	0,89/ 0,01
Tx2	GGIKYFHANSIGADS	A0A0H3G586	420	-0,2	39	0,7	31/22	DRB1*15	0,97/ 0,04
Tx3	KTKIRVARDQLAGKE	Q2YLZ4	169	-1,1	47	1,0	31/22	DRB1*13	0,79/ 0,67
Tx4	STAIAALNAARADVK	Q57DG8	191	0,4	42	0,8	31/21	DQA1*5/ DQB1*6	0,26/ 0,02
Tx5	GGQIKGTASLTVDGG	A0A0H3GGE2	2222	-0,1	61	1,5	30/10	DRB1*7	0,97/ 0,02
Tx6	GEDYRPAASFAAYTD	Q2YNJ8	486	-0,7	47	0,6	29/21	DRB1*4	0,95/ 0,06
Tx7	LNPNFYQAYANRALV	Q2YIV8	109	-0,2	36	0,6	27/17	DRB1*1	0,96/ 0,17
Tx8	KGTYYRVRVQAGSKE	Q2YNJ8	956	-1,2	55	1,2	26/15	DRB1*11	0,91/ 0,40
Tx9	AASYRRAGSEAAPAA	Q2YNJ8	611	-0,3	60	0,8	25/19	DQA1*1:3/ DQB1*3	0,46/ 0,01
Tx10	QRLVAGGRIDRASVE	Q579L1	390	-0,4	62	0,7	21/15	DQA1*5/ DQB1*3	0,9/ 0,04
Tx11	NPQFNGYPARPGKAS	Q2YJ67	46	-1,4	68	0,9	23/14	DRB1_1	0,8/ 0,52

ИМ – иммуногенность, АГ – антигенность, N – число связываемых HLAII (слабое/сильное сродство); HLAII max – антиген с наибольшим сродством к пептиду; жирным выделены «индукторы» ИФН-γ; подчеркнуты пептиды, растворимые в воде.
IM – immunogenicity, AG – antigenicity, N – number of bound HLAII (weak/strong affinity); HLAII max – antigen with the highest affinity for the peptide; “inducers” of ИФНγ are highlighted in bold; water-soluble peptides are underlined.

иммунной симуляции разработанной вакцинной конструкции. Для анализа были выбраны наиболее распространенные аллели HLA-A*01:01, 02:01, B*07:02, 13:02, DRB1*01:01, 04:01. Иммуная симуляция проводилась с использованием настроек по умолчанию для 1000 шагов.

Клонирование МЭВ *in silico*. Оптимизация кодонов для экспрессии в системе *E. coli*

С целью клонирования белка в системе *E. coli* в программе Codon Adaptation Tool (<https://www.jcat.de/>) была вычислена и оптимизирована нуклеотидная последовательность гена, выбран вектор для экспрессии с T7 промотором, определены условия культивирования и очистки белка.

Результаты исследования и их обсуждение

Выбор белка и предиктивная оценка его свойств с помощью методов обратной вакцинологии

Методами обратной вакцинологии предсказано 45 поверхностных бруцеллезных белков, имеющих вакцинный потенциал. Кроме того, по данным литературы было отобрано еще 46 бруцеллезных белков, проявляющих протективные свойства в случаях экспериментального бруцеллеза [8]. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей подтвердило консервативность 91 отобранного белка для патогенных для человека видов бруцелл. Большинство отобранных белков относятся к группам транс-

портеров (АТФ-связывающие кассетные транспортеры, автотранспортеры, порины, белки системы секреции IV типа, липополисахарид-сборочные белки, транспортеры гема BhuA), флагеллинов, адгезинов, шаперонов, ферментов, белков семейств OMP25/OMP31, MliC, YadA, OmpP1/FadL и другим. Подробный список использованных белков, аминокислотные последовательности вычисленных эпитопов и их характеристики представлены в базах данных [9, 10].

Прогнозирование и оценка эпитопов для целей включения в состав вакцины против бруцеллеза

С помощью программного обеспечения NetMHCpan-4.1a для 91 белка бруцелл был вычислен ряд ТЦЭ (9 aa), имеющих сродство для антигенов HLA класса I (22 аллелей: HLA-A*01:01, 02:01, 03:01, 11:01, 24:02, 30:01; HLA-B*07:02, 08:01, 13:02, 15:01, 18:01, 35:01, 40:02, 44:02, 49:01, 51:01; HLA-C*03:04, 04:01, 06:02, 07:01, 12:03), из которых 2309 эпитопов были определены как «сильные связывающие». Среди них антигенными свойствами обладали 1306 эпитопов (VaxiJen v 2.0). Далее с помощью трех программ (NetCTLpan 1.1, MHC-I Processing Predictions, T cell class I) был отобран 821 эпитоп, имеющий высокую аффинность связывания с выбранным набором антигенов HLA I, значимые показатели эффективности процессинга и иммуногенности. Дополнительный скрининг эпитопов позволил вычислить 42 нетоксичных, неаллергенных, не имеющих гомологии с белками человека и микробиоты кишечника ТЦЭ, связывающих от 1

Таблица 3. Предсказанные В-эпитопы бруцеллезных белков
Table 3. Predicted B epitopes of brucella proteins

Название / Title	Пептид / Peptide	Белок (Uniprot) / Protein (UniProt)	Локализация / Localization	Размер (aa) / Size (aa)	Гидроксипатичность / Hydrophobicity	Антигенность / Antigenicity	Растворимость / Solubility
Линейные эпитопы							
B1	ENRTNGGTSE	Q2YNY3	61	10	-2,15	2,6	0,94
B2	VNTHSDSKSKGKGTIERSED	C4IUF4	134	20	-1,68	1,51	0,94
B3	SQKLGNDPEEYRSR	Q576D7	498	20	-2,25	0,93	0,96
B4	KRSFNYIDEENVNIN	Q64JD6	229	15	-1,27	0,82	0,91
Конформационные эпитопы							
Bc1	A:R157,A:G158,A:E159,A:G162,A:T163,A:G164, A:F165	Q2YN33		7	-1,01	1,36	0,99
Bc2	A:R113,A:K115,A:A116,A:K117,A:D118,A:N119,A:T120,A:T121,A:S122,A:A123,A:P124,A:G125,A:W126	Q93SI4		13	-1,6	1,2	0,7
Bc3	A:Q100, A:A101, A:V102, A:K103, A:K104, A:V105, A:A106, A:Q107, A:E108, A:Q109, A:K110, A:R111, A:L112, A:S113, A:D114, A:E115, A:T117, A:K118	Q8YF53		18	-1,49	0,5	0,87
Bc4	A:K31, A:L32, A:P33, A:D34, A:S35, A:V36, A:K37, A:V38, A:A59, A:G60, A:D61	Q57ES7		11	-0,33	0,42	0,84

до 9 антигенов HLA I с высокой аффинностью (IC50 для одного из выбранных HLA I составил от 2 до 39 нМ), с высокими прогнозируемыми показателями протеасомального расщепления (0,83–1,68), транспорта TAP (0,07–1,31), антигенности (0,4–2,3), иммуногенности (0,02–0,47), 12 из которых определены в программе IFNepitope как «индукторы ИФН-γ». Из них для включения в МЭВ было отобрано 11 ТЦЭ с оптимальными физико-химическими показателями (гидроксипатичности (ГП), гидрофобности (ГБ), гидрофильности (ГЛ), заряда, растворимости и других), а также с максимальным числом связываемых HLA I, покрывающих полиморфизм МНС населения РФ (табл. 1).

Прогнозирование эпитопов для Т-хелперов

Скрининг 90 белков с помощью программ NetMHCIIpan 4.1, MHC-II Binding Predictions выявил 2519 и 4640 ТХЭ, сильно связывающих (Rank_EL <1%) 33 антигена HLA II (DRB1*01, 04, 07, 11, 12, 13, 15, DQA1*01:01, 01:02, 01:03, 02:01, 03:01, 05:01/ DQB1*02:01, 03:01, 05:01, 06:02; DPA1*01:03/ DPB1*02:02, 04:01) соответственно. В результате из двух программ было отобрано 1547 ТХЭ (831 с аффинностью связывания IC50 <50нМ и 975 с оценкой связывания >0,9 и процентильным рангом оценки прогнозирования лиганда <0,1). Дополнительный анализ отсортировал из них 699 нетоксичных, негомологичных белкам человека и микробиоты кишечника антигенных пептидов. Затем было отобрано 132 неаллергенных, иммуногенных ТХЭ (комбинированная оценка иммуногенности <68) растворимых пептидов (ГБ, ГП <0, ГЛ >0). На последнем этапе было отобрано 10 ТХЭ, преимущественно прогнозируемых как индукторы провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-6, ИФН-γ), и неиндукторы противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13) с наибольшим числом вариантов связываемых антигенов HLA II (от 21 до 31), компенсирующих полиморфизм МНС в популяции (с учетом отсутствия повторения коровой антигенной последо-

вательности), а также один ТХЭ (Тх1), обладающий сильным сродством преимущественно к 2 вариантам HLA II (DPA1*01:03/ DPB1*02:02, 04:01) (табл. 2).

Предсказание В-клеточных эпитопов

Для 26 поверхностных белков бруцелл было вычислено более 200 линейных и конформационных В-эпитопов. Неаллергенные и нетоксичные пептиды с максимальными показателями антигенности, вероятности растворимости, минимальными значениями гидроксипатичности и отсутствием гомологии с белками человека и микробиоты кишечника человека рассматривались как кандидаты на включение в состав МЭВ. В табл. 3 представлены наиболее перспективные линейные и конформационные В-эпитопы бруцеллезных белков для использования в составе МЭВ.

Конструирование мультиэпитопной вакцины

Была сконструирована МЭВ, 642 аа, включающая 11 ЦТЭ (Тс1-11), 11 ТХЭ (Тх1-11), 8 ВЭ (В1-4, Вс1-4), разделенных линкерами, а также адъювантные молекулы: пептид PADRE (AKFVAAWTLKAAA) и белок большой рибосомной субъединицы bL12 (50S рибосомный белок L7/L12) (UPID:Q2YM14) на N-конце, полигистидиновый таг из 8 остатков гистидина (8H) на C-конце полипептидной цепи. Конструкция МЭВ и ее аминокислотная последовательность представлены на рис. 2.

Предсказание физико-химических и иммуногенных свойств МЭВ

Результаты оценка свойств МЭВ методами биоинформатики представлены в табл. 4. Формула МЭВ – C3014H4729N887O904S2, молекулярная масса белка составила 67,9 кДа, pI = 9,6, согласно расчетам белок определен как высокорастворимый, стабильный в растворе, термостабильный, гидрофильный, неаллергенный, нетоксичный, с высокими показателями антигенности и иммуногенности.

Таблица 4. Валидация свойств МЭВ
Table 4. Validation of MEV properties

Показатель / Indicator	Значение / Value Score	Оценка / Evaluation	Показатель / Indicator	Значение / Value Score	Оценка / Evaluation
Количество aa / Quantity of aa	642		Аллергенность / Allergenicity	13	Не аллерген / Not allergen
Мм, Да	67919		Аллергенность / Allergenicity	14	Не аллерген / Not allergen
pI	9,64		Токсичность / Toxicity	-0,265	Нетоксичный / Non-toxic
ЧЗО-(D + E) / NCR-(D + E)	71		Токсичность / Toxicity	9x 10-56	Нетоксичный / Non-toxic
ЧЗО+(R + K) / NCR+(R + K)	100		Антигенность / Antigenicity	0,997	Антиген / Antigen
Индекс нестабильности / Instability index	24,19	Стабильный / Stable		0,898	Антиген / Antigen
GRAVY	-0,596	Гидрофильный / Hydrophilic	Вирулентность / Virulence	-0,996	Невирулентный / Non-virulent
Алифатический индекс / Aliphatic index	64,98	Термостабильный / Heat stable	Патогенность / Pathogenicity		Патогенный / Pathogenic
Коэффициент экстинкции M-1 см-1, при 280 нм / Extinction coefficient M-1 cm-1, at 280 nm	69410 75180	Abs 0.1% (= 1 g/l) 1.107	Протективность / Protectiveness	94,4	Протективный / Protective
Растворимость (Вероятность) / Solubility (Probability)	0,851	Растворимый / Soluble	Время полужизни белка E. coli in vivo / Half-life of E. coli protein in vivo	>10 ч	
	0,582	Растворимый / Soluble	Дрожжи in vivo / Yeast in vivo	>20 ч	
Заряд при pH 7 / Charge at pH 7	30,19	Хорошо растворим в воде / Soluble in water	Ретикулоциты млекопитающих in vitro / Mammalian reticulocytes in vitro	>30 ч	
Адгезивность / Adhesiveness	0,42	Не адгезин / Not adhesin	Иммуногенность / Immunogenicity	1,26	Иммуногенный / Immunogenic

aa – аминокислоты; Мм – молекулярная масса, ЧЗО – число заряженных остатков, 1 – SolPro, 2 – Protein-Sol, 3 – AllerTOP v.2.0, 4 – AllergenFP v.1.0, 5 – ToxinPred, 6 – ToxDL, 7 – Vaxijen v.2.0, 8 – AntigenPro, 9 – Innovagen.
 aa – amino acids; Мм – molecular weight, ЧЗО – number of charged residues, 1 – SolPro, 2 – Protein-Sol, 3 – AllerTOP v.2.0, 4 – AllergenFP v.1.0, 5 – ToxinPred, 6-ToxDL, 7 – Vaxijen v. 2.0, 8 – AntigenPro, 9 – Innovagen.

Прогнозирование структуры МЭВ

Вторичная структура МЭВ

Согласно данным компьютерного анализа в программе SSpro8 вторичная структура МЭВ с большой вероятностью содержит 38,4% α -спиралей, 9% β -цепей, 44,2% – беспорядочный клубок, кроме того, содержит такие структуры, как

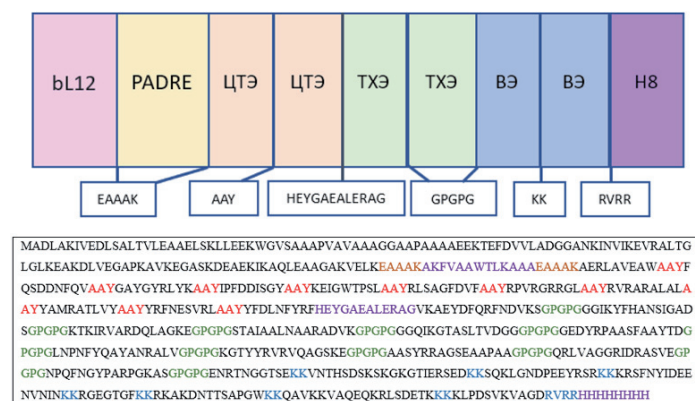


Рис. 2. Конструкция МЭВ и ее аминокислотная последовательность.

Fig. 2. MEV design and its amino acid sequence.

G-310-спираль, I-пи-спираль, β -мост, Т-поворот, S-изгиб. В программе PSIPRED были предсказано расположение основных элементов вторичной структуры, неупорядоченных участков, полярных и гидрофобных аминокислот, а также возможная локализация белка в клетке (рис. 3).

Моделирование третичной структуры МЭВ, структурные улучшения и валидация качества модели

3D-модель МЭВ, полученная в программе RoseTTAFold, имела лучшие значения показателей состоятельности модели в Structure Assessment. Использование трех программ (GalaxyRefine, 3Drefine, ModFOLD9) позволило значительно улучшить качество модели (среднеквадратичное отклонение позиции атомов (RMSD) = 0,84, IDDT = 0,89, TM = 0,99, GDT-TS = 0,96, GDT-HA = 0,85).

На карте Рамачандрана изменились показатели (MolProbity – с 3,16 до 1,56, благоприятные области – с 93,75 до 96,25%, неблагоприятные – с 1,25 на 0,31%, внеслоевые ротамеры – с 0 до 0,66%, плохие связи – с 1 до 0, плохие углы – с 13 до 56). Значения качества модели улучшились после уточнения и минимизации энергии (Errat – с 98,5 до 97,2, VERIFY – с 85,83 до 88,66% остатков со средним бал-

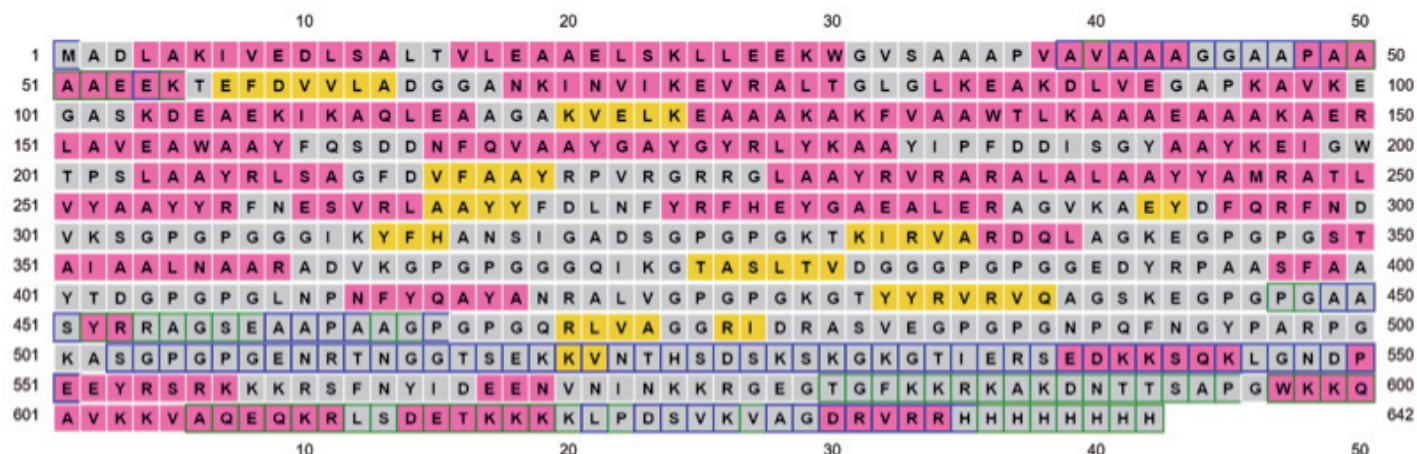


Рис. 3. Прогнозируемая вторичная структура МЭВ.

Розовым выделена α -спираль, желтым – β -лист, серым – беспорядочный клубок, синим – неупорядоченная область, зеленым – участок связывания белка.

Fig. 3. Predicted the secondary structure of MEV.

Pink – α -helix, yellow – β -sheet, gray – random coil, blue – disordered region, green – protein binding site.

лом $3D-1D \geq 0,1$, PROCHECK ошибка 1 предупреждение 6 прошли проверку с 3 до 2, Z-счет – с -8,84 до -8,75, QMEANDisCo Global – с 0,6 до $0,62 \pm 0,05$, C β – с -0,31 на 0,05, All Atom – с -0,47 до -0,33). В целом получены высокие показатели качества улучшенной модели МЭВ (рис. 4).

Минимизация свободной энергии МЭВ

В результате энергетической минимизации в программе YASARA Energy Minimization Server свободная энергия структуры МЭВ уменьшилась с -278877,1 до -365960 кДж/моль, а показатель Z – с -0,75 до -0,63 (рис. 5).

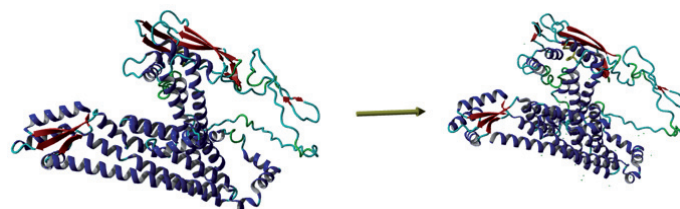


Рис. 5. Минимизация свободной энергии МЭВ.

Fig. 5. Minimization of free energy of MEV.

Прогнозирование конформационных эпитопов

В программе Ellipro определено 6 конформационных В-эпитопов, размерами от 13 до 74 аа, с оценкой от 0,706 до 0,835. На рис. 6 представлен конформационный ВЭ, размерами 74аа, со значением оценки 0,835.

Иммунная симуляция МЭВ

Молекулярный докинг МЭВ с иммунными рецепторами

В программе ClusPro2 была проведена стыковка моделей МЭВ со структурами TLR-1,2,3,4,6 (PDB ID: 2Z7X, 3A79, 3FXI, 1ZIW, 4G8A), HLA-A* 02:01 (1I1Y), HLA-DRB1*04:01 (5NI9)) и определена минимальная энергия связывания (сбалансированная оценка) и число связей ($E_{3FXI} = -880$; $N = 26$, $E_{4G8A} = -1016$; $N = 100$, $E_{1ZIW} = -1113$; $N = 55$, $E_{3A79} = -1025$; $N = 60$, $E_{2Z7X} = -850$; $N = 53$, $E_{1I1Y} = -998$; $N = 59$, $E_{5NI9} = -935$; $N = 54$). В программе HawkDock (<http://cadd.zju.edu.cn/>) энергия связывания составила для МЭВ с 4G8A: -86,44 ккал/моль; $N_{4G8A} = 386$, $N_{МЭВ} = 642$; с 5NI9: -86,21 ккал/моль; $N_{5NI9} = 386$, $N_{МЭВ} = 642$; с 1I1Y: -80 ккал/моль; $N_{1I1Y} = 768$, $N_{МЭВ} = 642$. На рис. 7 красным выделены связи комплексов МЭВ / иммунный рецептор с наименьшей свободной энергией. Например, пять аминокислот МЭВ (Arg₂₂₆, Arg₂₂₃, Lys₅₇₅, Arg₅₆₀, Tyr₁₅₉) связываются с 5 аминокислотами TLR-4 (4G8A) (Asp₃₇₂, Glu₉₇, Glu₁₅₇, Glu₃₄₇, Glu₁₀₀) в комплексе МЭВ/TLR-4.

Симуляция молекулярной динамики стыковочного комплекса

В результате проведения минимизации энергии комплекса МЭВ/TLR-4 в программе YASARA Energy Minimization Server потенциальная энергия уменьшилась с 56057712,7 до

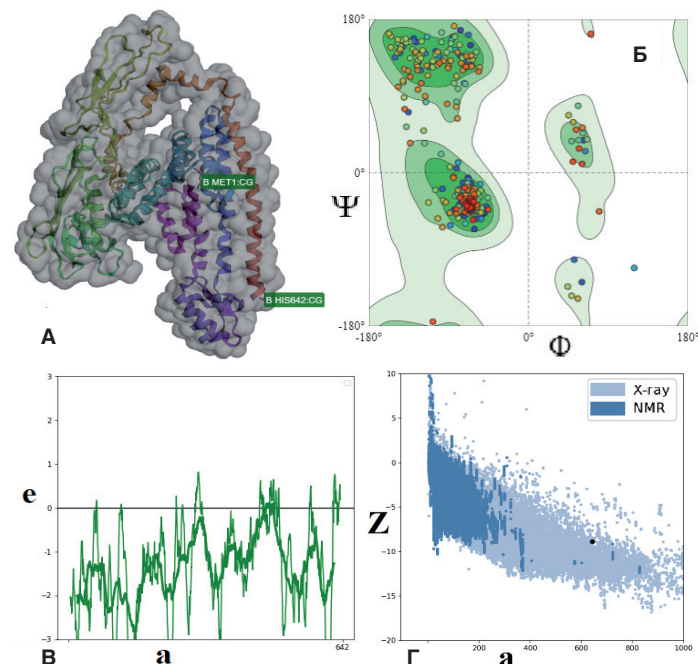


Рис. 4. Оценка качества модели МЭВ: А – 3-D модель МЭВ; Б – карта Рамачандрана; В, Г – графики локального и общего качества модели в ProSA-web: а – аминокислотные остатки, Z – оценочный показатель, е – прогнозируемая энергия.

Fig. 4. Assessment of the quality of the MEV model: A – 3D model of the MEV; Б – Ramachandran map; В, Г – graphs of local and overall quality of the model in ProSA-web: а – amino acid residues, Z – score, е – predicted energy.

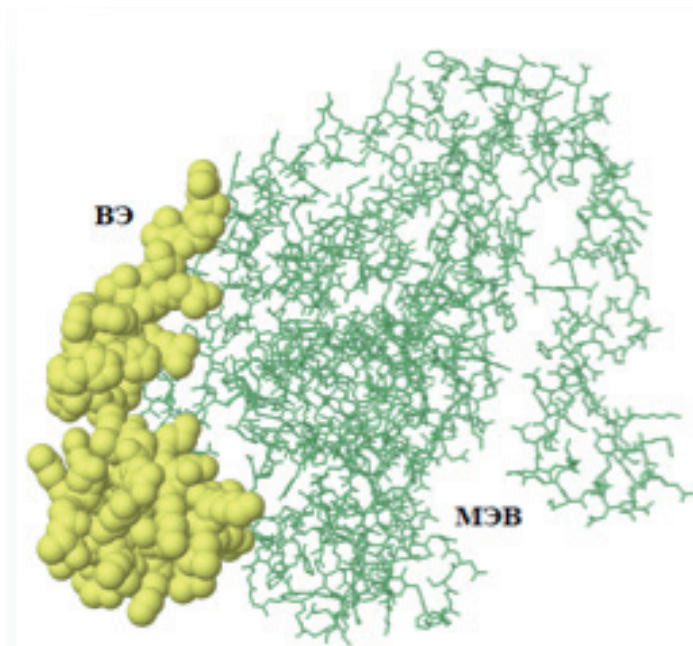


Рис. 6. Прогнозируемый конформационный ВЭ МЭВ.
Fig. 6. Predicted conformational EV of MEV.

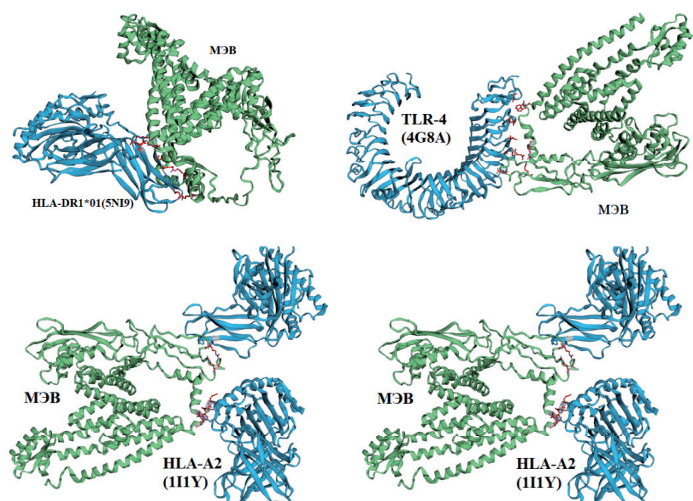


Рис. 7. Молекулярный докинг МЭВ со структурами TLR и HLA: красным обозначены наиболее сильные связи между МЭВ и структурами, А – прогнозируемая энергетически выгодная структура комплекса МЭВ/TLR-4(4G8A).

Fig. 7. Molecular docking of MEV with TLR and HLA structures: The strongest bindings are indicated in red, A – is the predicted energetically favorable structure of the MEV/TLR-4 complex.

-652527,2 кДж/моль, оценка качества улучшилась с 1,96 до -0,94. На рис. 7А представлена визуализация энергетически выгодной трехмерной структуры белкового комплекса после процесса минимизации в программе ChimeraX. На сервере PRODIGY прогнозируемая для комплекса ΔG составила -11,7 ккал/моль, константа диссоциации (Kd) при 25°C – 2,7e-09 моль, 28% заряженных и 40,3% незаряженных остатков на невзаимодействующей поверхности, всего межмолекулярных контактов – 143, из них заряжено-заряженных – 10, заряжено-полярных – 34, заряжено-неполярных – 32. Заряженные остатки обеспечивают термостабильность белков.

Моделирование молекулярной динамики в программе MDWeb не выявило недостатков структуры комплекса МЭВ/

TLR-4, связанных с наличием альтернативного местоположения остатков, разрывов последовательностей, столкновения атомов, неправильной хиральности, необычной конфигурации цис-пептидных связей, вставок, связей с нуклеиновыми кислотами, тяжелыми металлами, лигандами. В ходе анализа в комплексе выявлено 5 дисульфидных связей (A29-A40, A281-A306, A390-A391, A583-A609, A585-A627), стабилизирующих структуру, а также 10 столкновений полярных акцепторов.

Анализ нормальной моды (NMA) был проведен для установления молекулярной стабильности и динамики комплекса МЭВ/TLR-4. Результаты анализа указаны на рис. 8. На графике деформируемости (рис. 8А) наиболее высокие пики указывают на наиболее деформируемые области. График В-фактора (рис. 8Б) демонстрирует связь между мобильностью NMA и комплексом МЭВ/TLR4, представляя собой средние значения RMSD пристыкованного комплекса. На рис. 8Г каждая нормальная мода комплекса представлена индивидуальной (фиолетовый) и кумулятивной (зеленый) дисперсиями. Дисперсия и собственное значение отрицательно коррелировали. Вычисленное собственное значение комплекса 7,19e-06 отражает жесткость движения и связано с энергией, необходимой для деформации конструкции. Плавный процесс деформации поддерживается нижним собственным значением (рис. 8В). Связь между парами остатков отображается на графике ковариации, как показано на рис. 8Д (красный цвет показывает корреляцию, синий цвет – антикоррелированные остатки, а белый цвет связан с некоррелированными движениями). Также была создана специализированная карта эластичной сети, представляющая собой пару атомов, соединенных пружиной в комплексе МЭВ/TLR4. Точки окрашены в соответствии с их жесткостью, более темные серые цвета указывают на более жесткие пружины и наоборот (рис. 8Е). Анализ NMA показал стабильное взаимодействие между TLR-4 и МЭВ.

Анализ гибкости белкового комплекса проводился в веб-инструменте FlexServ, который моделирует структурные колебания, используя как стандартные, так и гауссовские RMSD, форсирует молекулы, усиливая выравнивание жестких фрагментов и благоприятствуя размещению движений в гибких областях. При анализе дискретной динамики комплекса были вычислены показатели существенных деформационных движений: профили В-фактора, индекс «коллективности» (0,356/0,283Å), размерность, дисперсионный профиль (общая дисперсия 3974/4265Å², процент отраженной дисперсии 90%), размер существенного пространства (162/164 собственных значений), индекс Линдемманна (0,266/0,267Å, все в жидкой фазе). Для определения остатков, вокруг которых создаются наибольшие колебания белка, была проведена детекция шарнирных точек (рис. 9). На рис. 9А наиболее подвижные области обозначены красным цветом. На рис. 9Б показан график анализа структуры методом изменения уклона В-фактора, где низкие значения показателя указывают на фиксированные области, переход к восходящим значениям (гибким доменам) обозначен зеленым, к низким значениям – красным. На рис. 9В представлен график путей конформационного перехода комплекса, составленный с помощью дискретного молекулярно-динами-

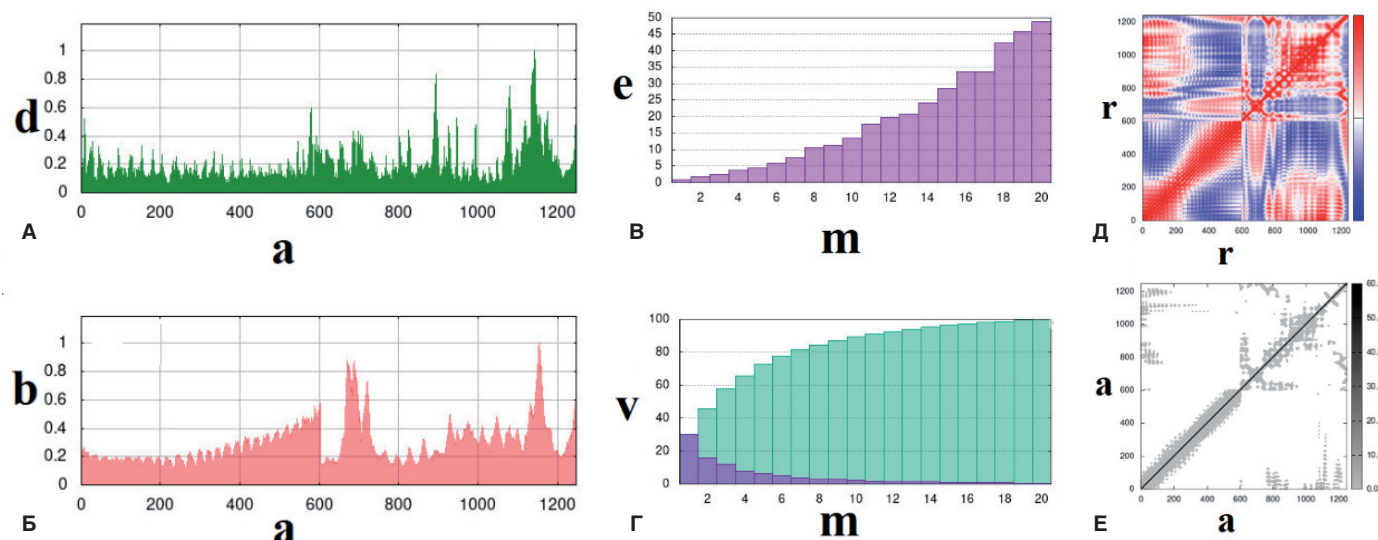


Рис. 8. Анализ нормальной моды: А – график деформируемости, Б – график В-фактора, В – график собственного значения, Г – график дисперсии, Д – ковариационный график корреляции остатков, Е – график эластичности модели, а – атомный индекс, б – В-фактор, d – деформируемость, e – собственное значение, m – индекс моды, r – индекс остатка, v – дисперсия.

Fig. 8. Normal mode analysis: A – deformability graph, Б – B-factor graph, В – the eigenvalue specifies the motion stiffness linked to each normal mode, Г – the variance map, Д – covariance graph of residual correlation, Е – elastic network model, а – atomic index, б – B-factor, d – deformability, e – eigenvalue, m – mode index, r – residue index, v – variance.

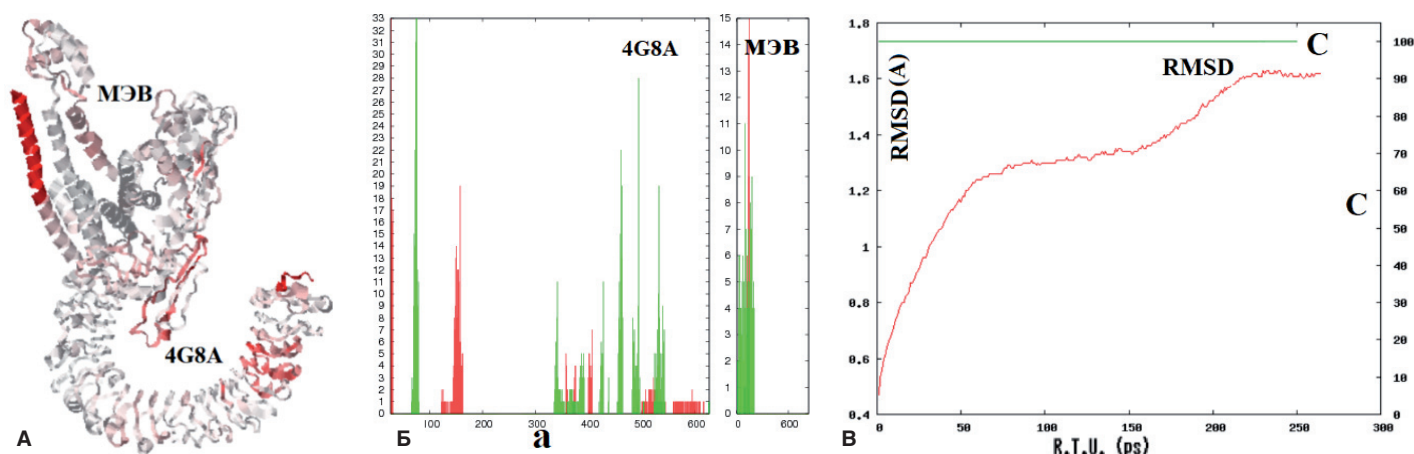


Рис. 9. Симуляция молекулярной динамики комплекса МЭВ/TLR-4: А – изображение динамики МЭВ, Б – график анализа методом изменения уклона В-фактора (по вертикали обозначены оценочные показатели), В – график путей конформационного перехода комплекса, а – аминокислотные остатки, С – допущение.

Fig. 9. Simulation of molecular dynamics of the MEV/TLR-4 complex: А – image of MEV dynamics, Б – graph of analysis using the method of changing the slope of the B-factor (eigenvalues are indicated vertically), В – graph of the conformational transition paths of the complex, а – amino acids residuals, С – acceptance.

ческого моделирования в программе MDdMD. В целом структура белкового комплекса достаточно стабильна и не обладает выраженной гибкостью.

Иммунная симуляция МЭВ

Результаты иммунного моделирования в программе C-ImmSim показали значительное увеличение первичных и вторичных иммунных ответов против предложенной вакцинной конструкции (рис. 10). После введения вакцины наблюдались высокие уровни антител IgG1, IgM, IgG, что свидетельствует о пролиферации иммунных ответов (рис. 10А). Увеличение популяции В-клеток было очевидным после повторного воздействия антигенной вакцины, что приводило к развитию гуморальной иммунной памяти (рис. 10В). Популяция цитотоксических (ТЦ) и хелперных Т-клеток (ТХ)

увеличивалась при существенном уменьшении популяции антигенов во время вторичного и третичного иммунного ответа (рис. 10 Г–Е). Это указывает на повышенную способность предлагаемой модели вакцины к адаптивному иммунитету. Прогнозируется преобладание Th1 ответа на МЭВ. Более того, было предсказано, что развитие естественных клеток-киллеров, дендритных клеток и макрофагов будет поддерживать рост после каждой иммунизации. В случае предложенной конструкции достоверно повышенные уровни цитокинов и интерлейкины, включая ИФН- γ , трансформирующий ростовой фактор β -1 (ТФР β 1), ИЛ-2, были предсказаны после непрерывного воздействия антигена во время периодов иммунизации, в то время как другие цитокины обнаруживают более низкие концентрации (рис. 10Б). Индекс Симпсона (общий сигнал опасности, D) оказался нормаль-

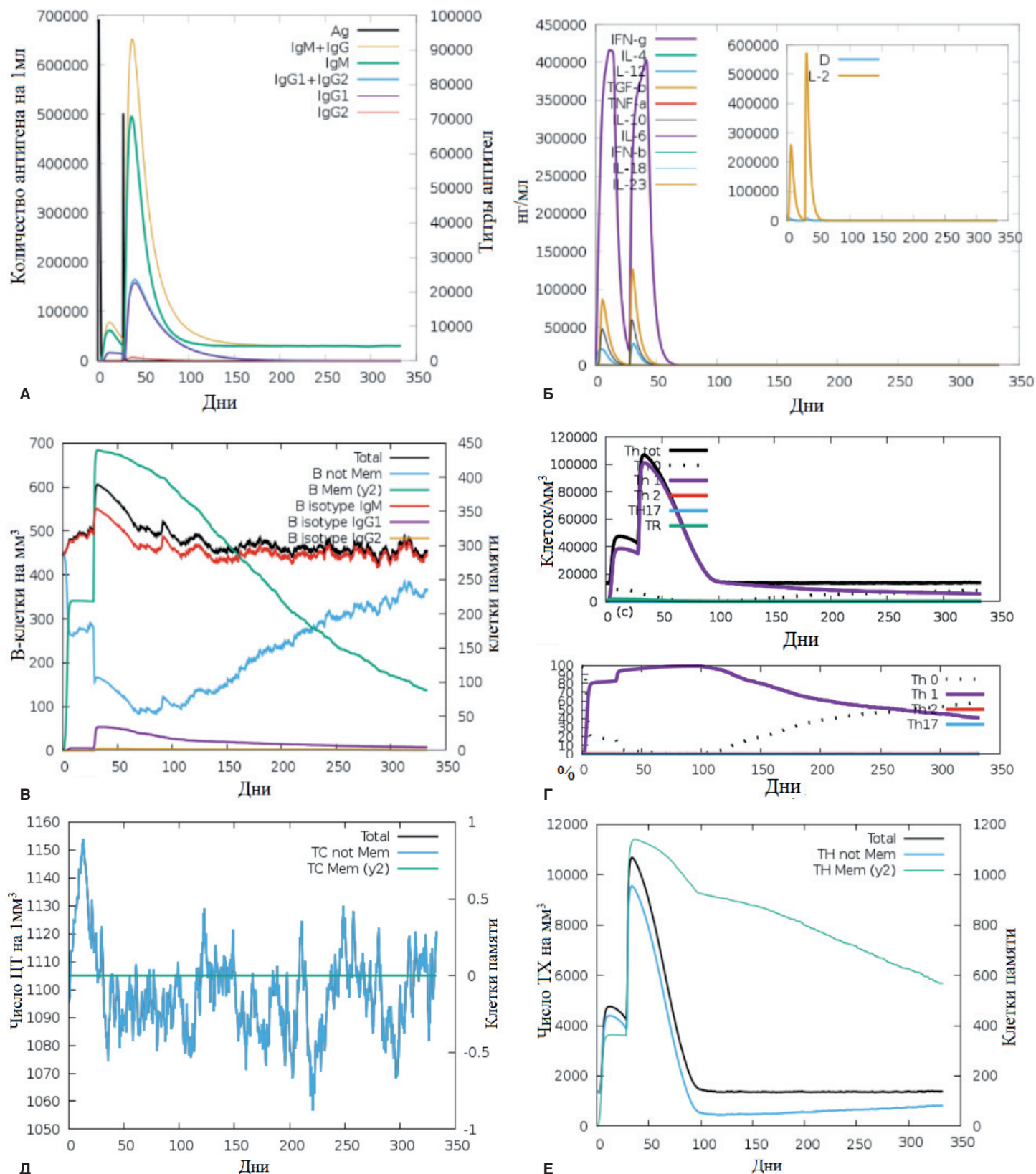


Рис. 10. Иммунная симуляция МЭВ: А – график гуморального ответа, Б – график симуляции секреции цитокинов, В–Е – графики популяций В-, Т-клеток. Act – активные, internalized – поглощающие антиген, Pres II – презентующие на МНС II, Dup – в митотическом цикле, Anergic – анергичные, Resting – неактивные, TH – TX, TC – ЦТ, Mem – клетки памяти, TR – регуляторные клетки, IL – интерлейкин, INF – интерферон, TNF – фактор некроза опухоли, TGF-b – ТФРβ1, Ig – иммуноглобулин, Ag – антиген, D – общий сигнал опасности.

Fig. 10. Immune simulation of MEV: A – graph of humoral response, B – graph of simulation of cytokine secretion, B–E – graphs of populations of B-, T-cells. Act – active, internalized – absorbing antigen, Pres II – presenting on MHC II, Dup – in the mitotic cycle, Anergic – anergic, Resting – inactive, TH – TX, TC – CT, Mem – memory cells, TR – regulatory cells, IL – interleukin, INF – interferon, TNF – tumor necrosis factor, TGF-b – TGFβ1, Ig – immunoglobulin, Ag – antigen, D – general danger signal.

ным, что указывает на то, что вакцина оказывает аналитическое более широкое воздействие. Также в программе были вычислены 12 В- и 87 Т-эпитопов для наиболее распространенных HLA (A*01:01, 02:01, B*07:02, 13:01, DRB1*01:01, 04:01). Эти прогнозы иммунного моделирования предполагают, что вакцина потенциально может активировать Т- и В-клетки для выработки антител, что приводит к развитию клеток долговременной памяти после повторного воздействия антигена. Прогноз иммунного моделирования показал, что вакцинная конструкция обладает потенциалом вызывать сильные врожденные и адаптивные иммунные реакции в иммунной системе человека против бруцеллеза.

Клонирование МЭВ *in silico*. Оптимизация кодонов для экспрессии в системе *E. coli*

В программе Codon Adaptation Tool проводили оптимизацию кодонов нуклеотидной последовательности МЭВ для экспрессии в системе *E. coli* в плазмиде pET22b(+) по сайтам рестрикции NcoI/XhoI, длина гена составила 1926 п.о., CAI = 1,0, GC-состав – 52%.

Бруцеллез является самым распространенным зоонозом во всем мире. Ежегодно в мире регистрируется около 500 тыс. новых случаев заболевания, что составляет, по разным оценкам, <5% от общей заболеваемости бруцеллезом. В нашей стране на протяжении десятилетий заболеваемость составляет 0,2–0,7 на 100 тыс. населения. Применение вакцины против бруцеллеза является эффективным и экономически выгодным подходом к снижению заболеваемости и смертности от инфекции у животных, а также у людей [2].

Современные достижения науки в области технологий секвенирования нового поколения, наличие массивных геномных и протеомных данных в общедоступных базах данных привели к разработке новых подходов к созданию вакцин. Методы обратной вакцинологии и иммуноинформатики позволяют выявить наиболее перспективных кандидатов в вакцины, оценить структуру и свойства, основываясь на данных их генетической последовательности [3].

В нашей работе с помощью методов ОБ мы создали прототип МЭВ против бруцеллеза. Исследование включало несколько этапов. С помощью методов, описанных ранее [7], а также по данным анализа литературы был отобран 91 эссенциальный (необходимый для жизнедеятельности микроорганизма) и константный для протеомов патогенных видов *Brucella* бруцеллезный белок. Большинство из них имело прогнозируемую поверхностную локализацию в клетке, что предопределяло их высокую доступность для иммунной системы и способность вызвать иммунный ответ. Однако для некоторых белков (шаперон GroEL, рибосомные белки L9, L7/L12), имеющих преимущественно внутриклеточную локализацию, в литературе описаны свидетельства их высокой иммуногенности, в связи с чем они были также включены в работу. Важным аспектом отбора кандидатных белков для последующего анализа являлось исключение гомологов белков человека и его микробиоты, что уменьшало риск развития аутоиммунных реакций у людей на вводимую вакцину.

На следующем этапе исследования вычислялись Т- и В-эпитопы отобранных белков для включения в МЭВ. Для максимального охвата населения, восприимчивого к вакци-

не, отбор Т-эпитопов из бруцеллезных белков проводился с учетом полиморфизма МНС на территории РФ. Скрининг наиболее перспективных для МЭВ ЦТЭ и ТХ проводился по степени их сродства к антигенам HLA I и II соответственно, а также на основе прогноза их гидрофильности, иммуногенности, антигенности, отсутствию гомологии с белками человека, аллергенных и токсичных свойств, а также по другим указанным выше параметрам. Из более чем 10 000 предсказанных Т-эпитопов для включения в МЭВ было отобрано только 22. Несмотря на превалирование клеточного иммунного ответа в защите от внутриклеточных патогенов, при разработке МЭВ сложилась концепция включения в их аминокислотную последовательность антигенных детерминант антительного ответа для более широкого воздействия на иммунитет и перспектив серодиагностики. В нашей работе в состав МЭВ были включены как линейные, так и конформационные ВЭ. При отборе учитывались как антигенные, иммуногенные, так и физико-химические свойства пептида.

Для повышения иммуногенности в состав МЭВ были включены 2 адъювантные молекулы. Пептид PADRE часто используется в качестве адъюванта во многих иммунотерапевтических вакцинах, так как активирует ТХ, имея панспецифическое сродство к 15 из 16 наиболее распространенных антигенов HLA-DR [11]. Для рибосомального белка L7/L12 была продемонстрирована способность специфически стимулировать моноциты инфицированных животных, повышать уровень транскрипции и экспрессии ИФН- γ , кроме того, он также является агонистом TLR-4, инициируя врожденный иммунный ответ [12].

В работе была сконструирована МЭВ, содержащая 642 аминокислотных остатка, включающая 11 ЦТЭ, 11 ТХЭ, 8 ВЭ, разделенных линкерами, 2 адъювантные молекулы на N- и гистидиновый таг на C-конце полипептидной цепи. Предложены условия для эффективной экспрессии белка в системе *E. coli*. Согласно расчетам, рекомбинантный белок, перспективный в качестве МЭВ, определен как высокорастворимый, стабильный в растворе, термостабильный, гидрофильный, неаллергенный, нетоксичный, с высокими показателями антигенности и иммуногенности.

Информация о трехмерной структуре имеет решающее значение для изучения активности вакцины, понимания ее биомолекулярных взаимодействий с рецепторами иммунных клеток человека. В нашей работе была рассчитана 3D-модель МЭВ, проведено уточнение ее структуры, минимизация свободной энергии с целью повышения ее качества и стабильности. Также проводился молекулярный докинг улучшенной модели с иммунными структурами, который показал энергетически выгодное взаимодействие как с различными рецепторами врожденного иммунитета TLR, так и с антигенами HLA (A*02 и DRB1*04). Симуляция молекулярной динамики белкового комплекса МЭВ/TLR-4 в разных компьютерных программах продемонстрировала устойчивость, низкие гибкость и деформируемость структуры. Симуляция иммунного ответа в программе показала наиболее выраженную реакцию иммунитета на повторное введение вакцины. Она стимулировала преимущественно Th1-ответ, высокий уровень секреции ИЛ-2, ИФН- γ , временное повышение секреции антител, а также длительную продукцию В- и Т-клеток памяти.

В данном исследовании представлена конструкция мультиэпитопной химерной вакцины с использованием компонентов бруцеллезных белков. Согласно биоинформатическому анализу, она может быть получена в качестве рекомбинантного белка в системе *E. coli*, должна сохранять стабильность как в растворе, так и в организме, эффективно стимулировать врожденный и приобретенный иммунитет, приводя к формированию и поддержанию активной иммунологической памяти. Тем не менее, несмотря на успехи применения ОВ для создания вакцин, в настоящее время данный метод имеет некоторые ограничения, связанные с отсутствием точной методологии прогнозирования, стандартного набора вычислительных исследований и практических наработок по валидации результатов расчетов *in silico*. На данном этапе развития компьютерных технологий все еще требуются тщательные исследования по подтверждению безопасности и эффективности прогнозируемой вакцины *in vitro* и *in vivo*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках НИОКР 3.1.2 по государственному заданию.

Financial support

The work was carried out within the framework of R&D 3.1.2 on a government assignment.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. WHO. Immunization Agenda 2030: A Global Strategy To Leave No One Behind. 2020.
2. Охупкина ВЮ, Пяткова НВ, Павлов ДЛ, Сулопаров АА. Эпидемическая опасность бруцеллеза в современных условиях. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(3):15-22. / Okhapkina VYu, Pyatkova NV, Pavlov DL, Susloparov AA. Epidemic Risk of Brucellosis in Modern conditions. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2016;15(3):15-22. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-3-15-22 (In Russian).
3. Rappuoli R, Bottomley MJ, D'Oro U, Finco O, De Gregorio E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. J Exp Med. 2016 Apr 4;213(4):469-81. DOI: 10.1084/jem.20151960
4. Masignani V, Pizza M, Moxon ER. The Development of a Vaccine Against Meningococcus B Using Reverse Vaccinology. Front Immunol. 2019 Apr 16;10:751. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00751
5. Enayatkhani M, Hasaniyazad M, Faezi S, Gouklani H, Davoodian P, Ahmadi N, et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an *in silico* study. J Biomol Struct Dyn. 2021 May;39(8):2857-2872. DOI: 10.1080/07391102.2020.1756411
6. Chen Z, Zhu Y, Sha T, Li Z, Li Y, Zhang F, et al. Design of a new multi-epitope vaccine against *Brucella* based on T and B cell epitopes using bioinformatics methods. Epidemiol Infect. 2021 May 25;149:e136. DOI: 10.1017/S0950268821001229
7. Saadi M, Karkhah A, Nouri HR. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. Infect Genet Evol. 2017 Jul;51:227-234. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.04.009
8. Дятлова ВИ. Применение методов обратной вакцинологии для разработки новых вакцин против бруцеллеза. Бактериология. 2021; 6(4): 16–29. / Dyatlova VI. Application of reverse vaccinology methods for the development of new vaccines against brucellosis. Bacteriology. 2021;6(4):16-29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-16-29 (In Russian).
9. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2022622748 Российская Федерация. Эпитопы антигенов бруцелл, активирующие Т-хелперы, перспективные для использования в составе мультиэпитопных вакцин против бруцеллеза: №2022622699: заявл. 31.10.2022: опубл. 03.11.2022. Дятлова ВИ; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». EDN DZYWRE. / Certificate of state registration of the database No 2022622748 Russian Federation. Epitopes of Brucella antigens that activate T-helper cells, promising for use in multi-epitope vaccines against brucellosis: No 2022622699: application. 10/31/2022: publ. 03.11.2022. Dyatlova VI; applicant Federal Budgetary Institution of Science «State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology». EDN DZYWRE. (In Russian).
10. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2022622856 Российская Федерация. Эпитопы антигенов бруцелл, активирующие цитотоксические Т-лимфоциты, перспективные для использования в составе мультиэпитопных вакцин против бруцеллеза: №2022622696: заявл. 28.10.2022: опубл. 14.11.2022. Дятлова ВИ; заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. EDN ZVTQHA. / Certificate of state registration of the database No 2022622856 Russian Federation. Epitopes of Brucella antigens that activate cytotoxic T-lymphocytes, promising for use in multi-epitope vaccines against brucellosis: No 2022622696: application. 10/28/2022: publ. 11/14/2022. Dyatlova VI; applicant Federal Budgetary Institution of Science «State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare. EDN ZVTQHA. (In Russian).
11. Rosa DS, Tzelepis F, Cunha MG, Soares IS, Rodrigues MM. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. Immunol Lett. 2004 Apr 15;92(3):259-68. DOI: 10.1016/j.imlet.2004.01.006
12. Golshani M, Rafati S, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Shahcheraghi F, Arsang A, et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a divalent DNA vaccine encoding Brucella L7/L12-truncated Omp31 fusion protein by a DNA priming and protein boosting regimen. Mol Immunol. 2015 Aug;66(2):384-91. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.04.015