

طراحی یک واکسن پپتیدی چنداپی‌توپی علیه گلیوبلاستومای چندشکلی با هدف‌گیری گیرنده زیر واحد آلفا ۲ اینترلوکین-۱۳ و گیرنده افرین نوع A2: رویکرد ایمنی-محاسباتی

شهرزاد آهنگرزاده^۱، ایلناز رحیم‌منش^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گلیوبلاستومای چندشکلی، GBM (Glioblastoma multiforme) تهاجمی‌ترین تومور اولیه مغزی است و به درمان‌های متداول مقاوم می‌باشد. طراحی واکسن‌های پپتیدی چنداپی‌توپی می‌تواند رویکردی نوین برای تحریک پاسخ ایمنی اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های توموری باشد.

روش‌ها: با استفاده از ابزارهای ایمنی-محاسباتی، اپی‌توپ‌های مرتبط با سلول‌های لنفوسیت‌کشنده (CTLs) و B از آنتی‌ژن‌های IL13Rα2 و EPHA2 شناسایی و بر اساس آنتی‌ژن‌زایی، غیرآلرژن بودن و غیرسمی بودن غربال شدند. توالی نهایی با ۱۶ اپی‌توپ لنفوسیت‌های کشنده و ۶ اپی‌توپ از سلول‌های لنفوسیت B طراحی شد. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختاری و برهم‌کنش واکسن با گیرنده‌های شبه Toll (TLR) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: واکسن نهایی با طول ۲۸۱ اسیدآمین، وزن مولکولی ۳۱,۵۷۹.۵۷ دالتون، $pI = 8/98$ و شاخص ناپایداری ۲۶/۱۰، پایدار ارزیابی شد. مقدار $GRAVY = -0/463$ و $QuerySol = 0/539$ نشان‌دهنده‌ی آب‌دوستی و حلالیت مطلوب بودند. ساختار سه‌بعدی پالایش شده ۹۳/۶ درصد باقی‌مانده‌ها را در نواحی مطلوب رامچاندرا نشان داد و $Z\text{-score} = -1/63$ کیفیت ساختاری را تأیید کرد. آنالیزهای داکینگ نشان داد واکسن بالاترین میل پیوندی را به TLR3 دارد ($\Delta G = -11/1 \text{ kcal/mol}$). $\Delta G = -1/6 \times 10^{-8} \text{ M}$ ، شبیه‌سازی ایمنی، القای قوی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را با تولید سریع Igm پس از اولین ایمن‌سازی و به دنبال آن تغییر ایزوتایپ به IgG1/IgG2 در دوزهای بعدی نشان داد. شبیه‌سازی ایمنی محاسباتی با C-ImmSim پتانسیل القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: واکسن چنداپی‌توپی طراحی شده دارای ویژگی‌های ایمنی‌زایی، پایداری و تعامل مطلوب با TLR3 است و می‌تواند به‌عنوان نامزد بالقوه برای توسعه واکسن‌های ضد گلیوبلاستوما در مطالعات پیش‌بالینی آینده مطرح شود.

واژگان کلیدی: گلیوبلاستوما چندشکلی؛ واکسن چنداپی‌توپی؛ ایمنی-محاسباتی؛ گیرنده زیر واحد آلفا ۲ اینترلوکین-۱۳؛ گیرنده EPHA2 افرین نوع A2؛ شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

ارجاع: آهنگرزاده شهرزاد، رحیم‌منش ایلناز. طراحی یک واکسن پپتیدی چنداپی‌توپی علیه گلیوبلاستومای چندشکلی با هدف‌گیری گیرنده زیر واحد آلفا ۲ اینترلوکین-۱۳ و گیرنده افرین نوع A2: رویکرد ایمنی-محاسباتی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۵؛ ۴۴ (۸۶۸): ۱۱۲۴-۱۱۳۵.

مقدمه

گلیوبلاستومای چند شکلی GBM (Glioblastoma multiforme) شایع‌ترین و تهاجمی‌ترین تومور اولیه بدخیم مغز در بزرگسالان است که با رشد سریع، نفوذ گسترده به بافت‌های اطراف و مقاومت در برابر درمان‌های استاندارد مشخص می‌شود. با وجود پیشرفت‌های حاصل در جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، پیش‌آگهی بیماران همچنان نامطلوب باقی مانده است؛ به‌طوری‌که بقای میانه بیماران حدود ۱۲ تا

۱۵ ماه و میزان بقای پنج‌ساله کمتر از ۱۰ درصد گزارش شده است (۱). ماهیت نفوذی سلول‌های گلیوبلاستومای چند شکلی امکان برداشت کامل حین جراحی را محدود می‌کند و سد خونی-مغزی نیز دسترسی داروهای سیستمیک به بافت تومور را کاهش می‌دهد. افزون بر این، ناهمگنی درون‌توموری و محیط ایمنی-سرکوبگر از دلایل اصلی عود و شکست درمان محسوب می‌شوند (۲). ایمنی درمانی به‌عنوان راهکاری نوین در مدیریت گلیوبلاستوما

۱- مرکز تحقیقات پزشکی بازساختی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، پژوهشکده قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ایلناز رحیم‌منش: مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، پژوهشکده قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: ilnazrahimmanesh@gmail.com

روش‌ها

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T

توالی پروتئینی گیرنده IL13Rα2 (UniProt ID: Q14627) و گیرنده تیروزین‌کینازی EPHA2 (UniProt ID: P29317) از پایگاه داده (https://www.uniprot.org/) UniProt استخراج و در قالب FASTA ذخیره شدند.

اپی‌توپ‌های سلول‌های B با استفاده از ABCpred (http://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/) و BcePred (http://webs.iitd.edu.in/raghava/bcepred/) و IEDB (https://tools.iedb.org/main/) شناسایی شدند. اپی‌توپ‌های سلول‌های T کمکی (MHC-II) توسط NetMHCIIpan-4.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-4.0/) و IEDB (https://tools.iedb.org/main/) پیش‌بینی گردیدند. اپی‌توپ‌های سیتوتوکسیک (MHC-I) نیز با کمک NetMHCpan-4.1 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/) و MHCpred (http://www.ddg-) (pharmfac.net/mhcpred/MHCPred/) انتخاب شدند (۸-۱۰).

ارزیابی ویژگی‌های ایمنی‌شناختی اپی‌توپ‌ها

آنتی‌ژن‌زایی اپی‌توپ‌ها توسط VaxiJen 2.0 (https://www.ddg-) بررسی شد. آلرژن‌زایی با کمک AllerTOP v.2 (https://www.ddg-) و pharmfac.net/AllerTOP/ (https://ddg-) و pharmfac.net/AllerTOP/index.html تحلیل گردید. سمیت احتمالی نیز توسط ToxinPred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/protein.php) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۱-۱۴). پس از این مرحله، تنها اپی‌توپ‌هایی که هم‌زمان دارای آنتی‌ژن‌زایی مطلوب، پیش‌بینی «غیرآلرژن» در AllerTOP v.2 و «غیرسمی» در ToxinPred بودند، وارد فهرست نامزدهای نهایی شدند. برای کنترل طول سازه و در عین حال حفظ پوشش آنتی‌ژنی مناسب، اپی‌توپ‌های واجد شرایط بر اساس امتیاز آنتی‌ژن‌زایی، حداقل هم‌پوشانی توالی و پوشش هر دو آنتی‌ژن IL13Rα2 و EPHA2 مرتب شدند و در نهایت ۱۶ اپی‌توپ سلول‌های لنفوسیت کشنده و ۶ اپی‌توپ B با بالاترین امتیاز ترکیبی برای ساخت واکسن چنداپی‌تویی انتخاب گردیدند.

طراحی واکسن چنداپی‌تویی و پیش‌بینی ویژگی‌های

فیزیکوشیمیایی و ساختار ثانویه

اپی‌توپ‌های منتخب به‌وسیله پیوند دهنده‌های (لینکرهای) اختصاصی (AAY برای CTL و KK برای اپی‌توپ‌های سلول B) به یکدیگر متصل شدند و سازه‌ی نهایی واکسن چنداپی‌تویی ایجاد

چند شکلی مطرح شده است و تلاش می‌کند پاسخ ایمنی میزبان را علیه آنتی‌ژن‌های توموری تقویت نماید. در میان روش‌های مختلف ایمنی درمانی، واکسن‌های پپتیدی به دلیل ایمنی بالا، هزینه کمتر و تولیدی ایجاد پاسخ اختصاصی سلول‌های T توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. با این حال، موفقیت این واکسن‌ها به شناسایی آنتی‌ژن‌های مناسب و ایمنی‌زا وابسته است؛ آنتی‌ژن‌هایی که بیان بیش از حد در سلول‌های توموری داشته و در بافت‌های طبیعی محدود باشند (۳).

گیرنده‌ی زیرواحد آلفا۲ ایتروکین-۱۳ (IL13Rα2) و گیرنده تیروزین‌کینازی افرین نوع A2 (EPHA2) از اهداف امیدوارکننده برای توسعه واکسن‌های ضد گلیوبلاستوما به شمار می‌روند. پروتئین گیرنده زیرواحد آلفا۲ ایتروکین-۱۳ در اکثر تومورهای گلیوبلاستوما بیش‌ازحد بیان می‌شود و دریافت طبیعی مغز توزیع محدودی دارد. این گیرنده به‌عنوان یک گیرنده فرینده عمل کرده و موجب تهاجم تومور و فرار ایمنی می‌شود. از طرفی، آنتی‌ژن گیرنده تیروزین‌کینازی افرین نوع A2 که عضوی از خانواده گیرنده‌های افرین است، در گلیوبلاستوما بیش‌ازحد بیان شده و با پیشرفت تومور، رگ‌زایی و پیامدهای بالینی نامطلوب مرتبط است. هدف‌گیری هم‌زمان این دو پروتئین می‌تواند با تحریک هم‌زمان پاسخ‌های سلول‌های T کمکی و سلول‌های T کشنده، کارایی درمانی واکسن را افزایش دهد (۴، ۵).

پیشرفت‌های اخیر در حوزه واکسن‌شناسی محاسباتی این امکان را فراهم کرده است که با استفاده از ابزارهای محاسباتی-ایمنی، واکسن‌های چنداپی‌تویی طراحی شوند. این روش‌ها قادرند اپی‌توپ‌های مربوط به سلول‌های B و T با بیشترین پتانسیل آنتی‌ژن‌زایی، کمترین احتمال ایجاد آلرژی و بهترین سازگاری با مولکول‌های کمپلکس سازگاری بافتی اصلی انسان (HLA) را انتخاب کنند و بدین ترتیب، توسعه واکسن را سرعت بخشند. افزون بر این، داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی و مدل‌سازی پاسخ ایمنی، دیدگاه‌های ارزشمندی درباره‌ی پایداری واکسن، ایمنی‌زایی و تعامل آن با گیرنده‌های ذاتی مانند گیرنده‌های شبه Toll (TLRs) به‌دست می‌آید (۶، ۷).

هدف مطالعه‌ی حاضر، طراحی و ارزیابی یک واکسن پپتیدی چنداپی‌تویی علیه گلیوبلاستوما چند شکلی با استفاده از چارچوب ایمنی-محاسباتی است. این واکسن با هدف‌گیری IL13Rα2 و EPHA2 طراحی شده و طی آن پیش‌بینی اپی‌توپ‌ها، بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ایمنی‌شناختی، تحلیل‌های داکینگ و شبیه‌سازی پاسخ ایمنی انجام می‌شود. این رویکرد می‌تواند به‌عنوان اثبات مفهوم برای توسعه واکسن‌های نوین علیه گلیوبلاستوما چند شکلی مطرح شود و در آینده به‌عنوان مکمل درمان‌های موجود، چشم‌انداز بهتری برای بیماران فراهم کند.

یافته‌ها

اپی‌توپ‌های منتخب سلول‌های B و T و ارزیابی

آنتی‌ژن‌زایی/آلرژن‌زایی/سمیت

پس از یکپارچه‌سازی خروجی پایگاه‌ها، اپی‌توپ‌های مشترک غربال شدند و تنها اپی‌توپ‌هایی که آنتی‌ژن، غیرآلرژن و غیرسمی بودند در فهرست نامزدها حفظ شدند. از میان این اپی‌توپ‌های واجد شرایط، به منظور کنترل طول سازه و بهینه‌سازی پوشش آنتی‌ژنی، ۱۶ اپی‌توپ CTL و ۶ اپی‌توپ B با بالاترین امتیاز آنتی‌ژن‌زایی، حداقل هم‌پوشانی توالی و پوشش هر دو آنتی‌ژن IL13Ra2 و EPHA2 به صورت دستی انتخاب شدند. طبق راهبرد طراحی (قرارگیری CTL‌ها در N-ترمینال و اپی‌توپ‌های B در C-ترمینال)، توالی چنداپی‌تویی نهایی شامل ۲۲ اپی‌توپ (۱۶ اپی‌توپ CTL و ۶ اپی‌توپ B-cell) مشخص شد (جدول ۱).

ساختار چنداپی‌تویی و ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی آن

سازه چند اپی‌تویی با اتصال اپی‌توپ‌های منتخب توسط لینکرهای ذکر شده تشکیل شد. ارزیابی اولیه ایمنی - محاسباتی برای غربالگری انجام شد و سازه نهایی بر پایه معیارهای آنتی‌ژن‌زایی (امتیاز آنتی‌ژن‌زایی کل ۰/۷۷۹۸)، عدم آلرژن‌زایی و عدم سمیت انتخاب گردید. اساس محاسبات ProtParam روی توالی نهایی (۲۸۱ اسید آمینه)، وزن مولکولی ۳۱۵۷۹/۵۷ دالتون و نقطه ایزوالکتریک تئوریک $PI = ۸/۹۸$ برآورد شد. شاخص ناپایداری ۲۶/۱ (طبقه‌بندی: پایدار)، شاخص آلفاتیک ۶۳/۷۴ و شاخص $GRAVY = -۰/۴۶۳$ (ماهیت نسبتاً آب دوست) به دست آمد. شمار باقی‌مانده‌های باردار منفی (Asp+Glu) ۲۸ و باردار مثبت (Arg+Lys) ۳۴ بود که بر بازی‌تر بودن سازه دلالت داشت. نیمه‌عمر تقریبی بر پایه قاعده N-end گلوبول‌های قرمز نابالغ پستانداران ۱/۱ ساعت، در مخمر ۳ دقیقه و در *E. coli* دو دقیقه برآورد گردید. حلالیت پیش‌بینی‌شده با Protein-Sol نشان داد مقدار $QuerySol = ۰/۵۳۹$ بالاتر از ۰/۴۵ $PopAvrSol \approx$ است؛ بنابراین، حلالیت سازه نسبت به میانگین پروتئین‌های *E. coli* در مجموعه مرجع بالاتر ارزیابی می‌شود.

پیش‌بینی ساختار ثانویه

پیش‌بینی‌های سرور PSIPRED نشان داد که توزیع ساختار دوم در این پروتئین به صورت ۳۱/۸ درصد آلفا-هلیکس، ۷/۸ درصد رشته بتا و ۶۰/۴ درصد ساختار نامنظم (Coil) است. تفسیر این الگو حاکی از غلبه ساختار نامنظم بر توالی پروتئین مورد مطالعه است. نکته قابل تأمل، آرایش متفاوت نواحی منظم است: نواحی آلفا-هلیکسی تمایل به تجمع و تشکیل چند قطعه پیوسته دارند، در حالی که نواحی بتایی به صورت پراکنده در طول توالی ظاهر می‌شوند.

گردید. خواص فیزیکی‌شیمیایی واکسن طراحی‌شده شامل وزن مولکولی، نیمه‌عمر، شاخص ناپایداری و شاخص آلفاتیک با استفاده از ProtParam (سرور Expasy) تحلیل شد. حلالیت سازه با استفاده از Protein-Sol (https://web.expasy.org/protparam/) و sol.manchester.ac.uk/ (بررسی گردید. ساختار ثانویه پروتئین به کمک سرور PSIPRED (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)) پیش‌بینی شد (۱۵).

مدل‌سازی ساختار سوم و اعتبارسنجی

ساختار سه‌بعدی واکسن با استفاده از AlphaFold 3 (https://www.alphafold.ebi.ac.uk/) پیش‌بینی شد. مدل نهایی به وسیله ابزارهای GalaxyRefine (http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE) اعتبارسنجی ساختار با استفاده از ProSA- (https://saves.mbi.ucla.edu/) PROCHECK (https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php) Web (https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php) و ERRAT (https://saves.mbi.ucla.edu/) انجام گرفت (۱۶-۲۱).

داکینگ پروتئین - پروتئین

برای بررسی تعامل واکسن طراحی‌شده با گیرنده‌های ایمنی، داکینگ بین ساختار واکسن و TLR4 (PDB ID: 7C76)، TLR3 (PDB ID: 9J03) و TLR7 (PDB ID: 7CYN) توسط سرور ClusPro 2.0 (https://cluspro.bu.edu/) با تنظیمات پیش‌فرض پروتئین-پروتئین انجام شد. انرژی آزاد اتصال و جزئیات تماس‌های مولکولی به کمک سرور PRODIGY (https://bianca.science.uu.nl/prodigy/) در دمای ۲۹۸ کلوین (۲۵°C) و با پارامترهای پیش‌فرض برای کمپلکس‌های پروتئین-پروتئین محاسبه گردید (۲۲-۲۷).

شبیه‌سازی پاسخ ایمنی

پاسخ ایمنی واکسن با استفاده از سرور C-ImmSim (نسخه‌ی وب در دسترس در سپتامبر ۲۰۲۴؛ http://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/) شبیه‌سازی گردید. کلیه پارامترها در وضعیت پیش‌فرض نرم‌افزار حفظ شد، به جز گام‌های زمانی که برای سه تزیق در گام‌های ۱، ۸۴ و ۱۶۸ (معادل فواصل چهار هفته‌ای) تنظیم شدند. مقدار آنتی‌ژن در هر دوز ۱۰۰۰ واحد و میزان ادجوانت در دو تزیق نخست ۱۰۰ واحد بود؛ تزیق سوم بدون ادجوانت انجام گرفت. مجموع گام‌های شبیه‌سازی ۱۰۵۰ بود (۲۸، ۲۹). تمامی تحلیل‌های ایمنی - محاسباتی در بازه‌ی اوت تا سپتامبر ۲۰۲۴ و با استفاده از آخرین نسخه‌های در دسترس سرورها و تنظیمات پیش‌فرض انجام شد.

جدول ۱. اپی توپ‌های به کاررفته در سازه چنداپی توپی

ردیف	رده اپی توپ	توالی	طول	لینکر مجاور
۱	CTL (MHCI-CD8)	FFKFEASES	۹	AAAY
۲	CTL (MHCI-CD8)	FSVTLDLLA	۹	AAAY
۳	CTL (MHCI-CD8)	KIDTIAPDE	۹	AAAY
۴	CTL (MHCI-CD8)	WLTHPYGKG	۹	AAAY
۵	CTL (MHCI-CD8)	YSEPPHGLT	۹	AAAY
۶	CTL (MHCI-CD8)	ELGWLTHPY	۹	AAAY
۷	CTL (MHCI-CD8)	YTFTVEARN	۹	AAAY
۸	CTL (MHCI-CD8)	GLVTSRSFR	۹	AAAY
۹	CTL (MHCI-CD8)	SDAPSLATV	۹	AAAY
۱۰	CTL (MHCI-CD8)	KGFYLAFAQD	۹	AAAY
۱۱	CTL (MHCI-CD8)	GFSVTLDL	۹	AAAY
۱۲	CTL (MHCI-CD8)	KGWDLMQNI	۹	AAAY
۱۳	CTL (MHCI-CD8)	ITVSSDFEA	۹	AAAY
۱۴	CTL (MHCI-CD8)	INQTEPPKV	۹	AAAY
۱۵	CTL (MHCI-CD8)	SVRYSEPPH	۹	AAAY
۱۶	CTL (MHCI-CD8)	GWDLMQNIM	۹	AAAY
۱۷	B cell	PKVRLEGRSTTS	۱۲	KK
۱۸	B cell	QALTQEGQGAG	۱۱	KK
۱۹	B cell	QTLSPGSG	۹	KK
۲۰	B cell	SRVWKYEVTYRKKGDS	۱۶	KK
۲۱	B cell	YGTNFQKRLFTKIDTI	۱۶	KK
۲۲	B cell	TKVQDMDCVYYNWQYL	۱۶	KK

هیچ باقیمانده‌ای در ناحیه‌های نامیاز مشاهده نشد (شکل ۱C).

داکینگ پروتئین- پروتئین واکسن با گیرنده‌های TLR و

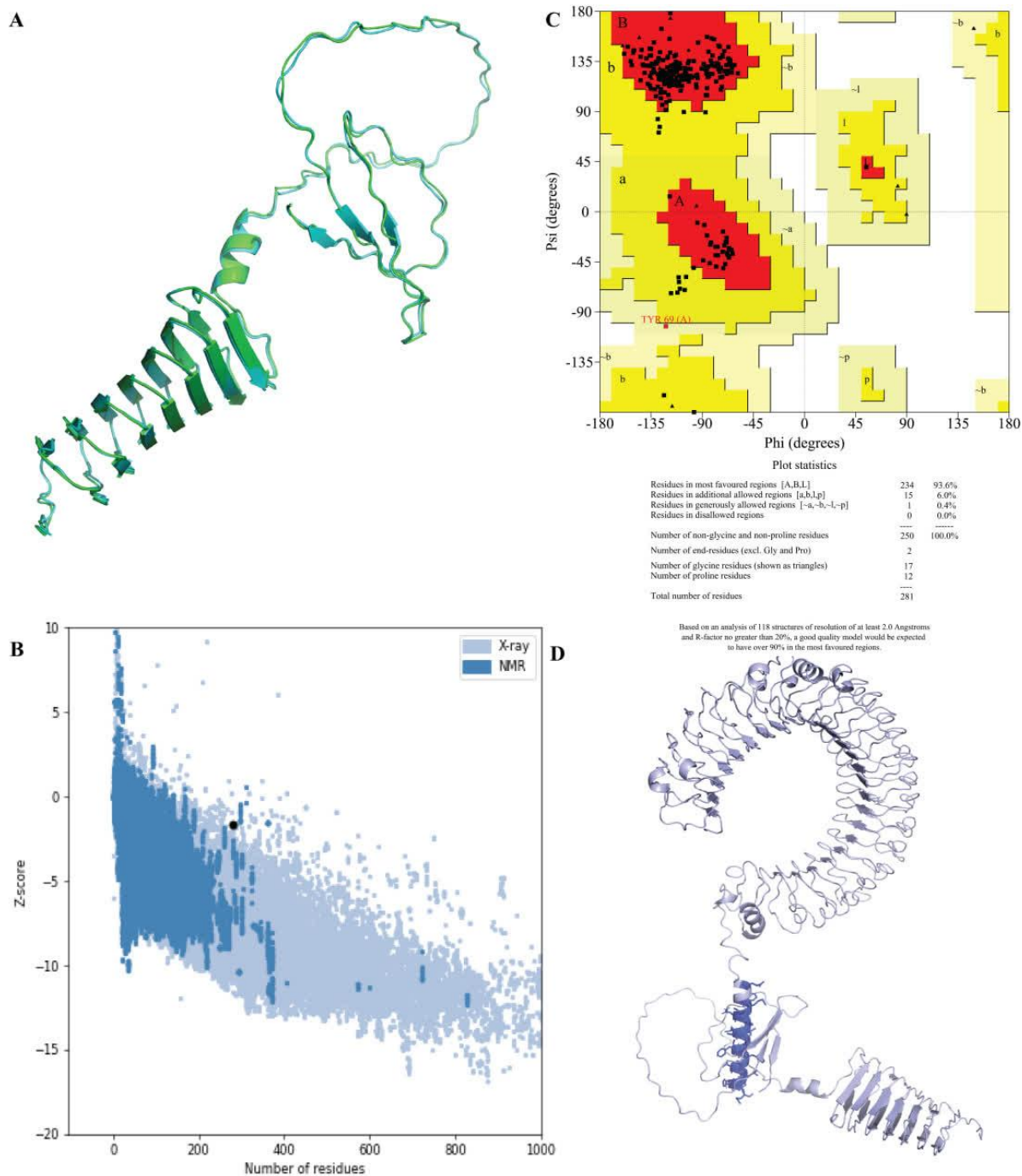
تحلیل انرژی پیوندی

برای ارزیابی قابلیت برهم‌کنش ذاتی سازه چنداپی توپی با گیرنده‌های ذاتی سیستم ایمنی، داکینگ پروتئین-پروتئین میان واکسن و دامنه‌های اتصال لیگاند TLR3، TLR4 و TLR7 با سرور ۲/۰ ClusPro انجام شد. از میان مدل‌های تولیدشده در هر داکینگ، مدل برتر بر پایه معیارهای خوشه‌بندی و امتیاز انرژی انتخاب و سپس با سرور PRODIGY آنالیز شد تا ΔG و K_d (25°C) و نیز جزئیات تماس‌های میان‌سطحی (ICs) و سطوح غیربرهم‌کنش‌کننده (NIS) به‌دست آید. به‌طور مقایسه‌ای، TLR3 قوی‌ترین میل پیوندی را نشان داد ($\Delta G = -11/1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $K_d \approx 1/6 \times 10^{-8}$) سپس TLR4 با پیوندی متوسط ($\Delta G = -8/6$, $K_d \approx 8/2 \times 10^{-7} \text{ M}$) و نهایتاً TLR7 با پیوند ضعیف‌تر ($\Delta G = -7/4$, $K_d \approx 6/6 \times 10^{-6} \text{ M}$). الگوی تماس‌ها در کمپلکس Vaccine-TLR3 غالباً apolar-apolar و charged-apolar بود که معمولاً با تثبیت هسته آبگریز و قفل شدن

پالایش و اعتبارسنجی ساختار سوم

مدل سه‌بعدی حاصل از AlphaFold 3 با سرور GalaxyRefine پالایش شد. در میان مدل‌های پالایش‌شده، مدل یک به‌دلیل کیفیت هندسی و انرژی مطلوب‌تر برای ادامه تحلیل‌ها برگزیده شد؛ این مدل نسبت به ساختار اولیه دارای $2/22 \text{ \AA}$ = RMSD، $1/1481$ ، MolProbity = $0/6$ ، Clash score = $0/9$ ، Poor rotamers = $93/2$ و Rama favored = $93/2$ بود و کمینه انرژی گزارش‌شده $-6294/36$ GALAXY energy را نشان داد (شکل ۱A). ارزیابی ERRAT (ضریب کیفیت کلی) را برابر با $55/08$ گزارش کرد. افزون‌براین، تحلیل ProSA-Web برای مدل منتخب $Z\text{-score} = -1/63$ را به‌دست داد که با محدوده ساختارهای تجربی هم‌اندازه سازگار است (شکل ۱B).

اعتبارسنجی مستقل با PROCHECK حاکی از قرارگیری $93/6$ درصد از باقی‌مانده‌ها در ناحیه‌های کاملاً مطلوب، $6/0$ درصد در ناحیه‌های مجاز افزوده و $0/4$ درصد در ناحیه‌های مجاز سخاوتمندانه و 0 درصد در ناحیه‌های نامیاز بود (مجموع باقی‌مانده‌ها = 281)؛ بنابراین



شکل ۱. مدل سازی و اعتبارسنجی ساختار سه بعدی واکسن چندابایی تویی طراحی شده

(A) ساختار سه بعدی پیش بینی شده واکسن پس از پالایش.

(B) نمودار Z-score حاصل از ProSA-web که کیفیت کلی مدل واکسن را در مقایسه با ساختارهای پروتئینی تعیین شده با روش های X-ray و NMR نشان می دهد.

(C) نمودار رامچاندرا که بیانگر قرار گرفتن بیش تر بقایای اسید آمینه در نواحی مجاز بوده و پایداری استرئوشیمیایی مدل واکسن را تأیید می کند.

(D) ساختار نهایی پالایش شده پس از مینیمم سازی انرژی و داکینگ شده با TLR3

تماس ها کمتر بود. این نتایج نشان می دهد که تحریک مسیر TLR3 برای این سازه محتمل تر از TLR4/7 است و مبنای مناسبی برای تحلیل های پایین دستی (مانند شبیه سازی پاسخ ایمنی) فراهم می سازد.

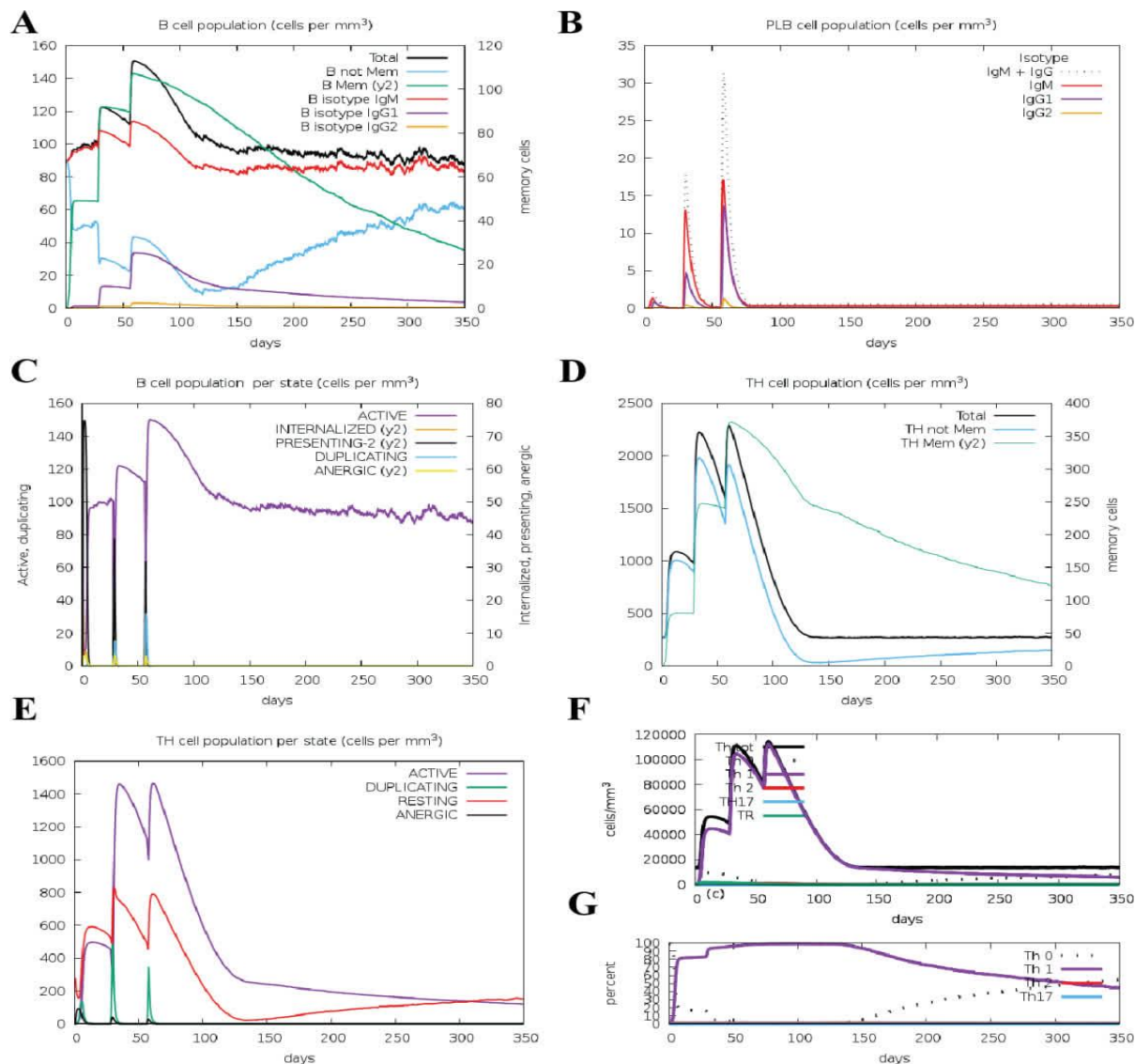
الکترواستاتیک در ناحیه ی مرزی سازگار است (شکل ۱D)؛ در حالی که در Vaccine-TLR4 سهم تماس های charged-polar و charged-charged بیشتر شد و برای Vaccine-TLR7 تعداد کل

دینامیک سلول‌های B و تولید آنتی‌بادی‌ها

خروجی C-ImmSim شبیه سازی کرد که جمعیت سلول‌های B در پاسخ به سه دوز واکسن افزایش می‌یابد. پس از تزریق نخست، افزایش سریع IgM مشاهده شد و در تزریق‌های بعدی جابه‌جایی ایزوتایی به IgG1 و IgG2 رخ داد. سلول‌های B حافظه در سطح بالایی تثبیت شدند و تا پایان شبیه‌سازی (روز ۳۵۰) پایدار باقی ماندند. جمعیت پلاسمابلاست‌ها (PLB) نیز پس از هر دوز افزایش چشمگیری داشت، به‌ویژه در دوز دوم که اوج IgM و IgG1 مشاهده شد (شکل ۲A-C).

پاسخ سلول‌های T کمک‌کننده

سلول‌های T کمک‌کننده افزایش قابل‌توجهی پس از هر تزریق نشان دادند، به‌طوری که قله‌های اصلی در روزهای حدود ۵۰ و ۹۰ ظاهر شد. سلول‌های T کمک‌کننده با فنوتیپ حافظه به‌طور تدریجی تثبیت شدند و پس از فاز انبساط اولیه، در سطح بالایی باقی ماندند. الگوی فعال‌سازی این سلول‌ها بیانگر یک پاسخ کمکی قوی است که می‌تواند به بهبود تولید آنتی‌بادی و تحریک سلول‌های T کشنده کمک کند (شکل ۲D-G).



شکل ۲. شبیه‌سازی ایمنی سلول‌های ایمنی در پاسخ به واکسن چندای توبی طراحی شده

(A) تغییرات جمعیت سلول‌های B و زیرمجموعه‌های IgM، IgG1 و IgG2 طی ۳۶۰ روز.

(B) تغییرات سلول‌های پلاسمابلاست (PLB) و ایزوتایپ‌های IgM و IgG.

(C) دینامیک حالت‌های عملکردی سلول‌های B شامل فعال، در حال تقسیم، پلاسمابلاست، دوگانه و آنریزیک. (D) جمعیت کل سلول‌های Th و زیرمجموعه حافظه در بازه زمانی شبیه‌سازی.

(E) تغییرات حالت‌های عملکردی سلول‌های Th1 شامل فعال، تقسیم‌شونده، پلاسمابلاست و آنریزیک.

(F) فراوانی نسبی زیرمجموعه‌های سلول‌های Th1، Th2 و Th17 در طول دوره شبیه‌سازی.

(G) درصد نسبی پاسخ‌های Th1، Th2 و Th17 طی ۳۶۰ روز.

بحث

گلیوبلاستوما چند شکلی به‌عنوان بدخیم‌ترین تومور اولیه مغز با وجود جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی همچنان با بقای میانه حدود ۱۵ ماه و بقای پنج‌ساله کمتر از ۱۰ درصد همراه است و همین امر ضرورت رویکردهای نوین، به‌ویژه ایمنی درمانی را برجسته می‌کند. در میان گزینه‌ها، واکسن‌های پپتیدی به سبب ایمنی قابل‌قبول، هزینه کمتر و قابلیت جهت‌دهی پاسخ‌های سلول‌های T محور، جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند؛ اما موفقیت آن‌ها کاملاً به گزینش آنتی‌ژن‌های توموری واقعاً «انتخابی» وابسته است (۳۰). در این چارچوب، دو هدف سطحی IL13Rα2 و EphA2 که هر دو در گلیوبلاستوما چند شکلیش بیان و در بافت طبیعی محدودند، به‌عنوان اهدافی مستند و امیدوارکننده شناخته می‌شوند (۳۱).

آنتی‌ژن IL13Rα2 در نزدیک به سه‌چهارم موارد گلیوبلاستوما چند شکلی بیان بیش از حد دارد، حال آن‌که در بافت طبیعی مغز بیان ناچیزی داشته و بنابراین یک نشانگر و هدف ایمنی بسیار انتخابی به‌شمار می‌آید (۳۲). بر همین مبنا در کار حاضر، یک واکسن چنداپی‌توبی بر پایه‌ی ۱۶ اپی‌توپ CTL و ۶ اپی‌توپ B طراحی شد. در طراحی اولیه، اپی‌توپ‌های سلول‌های T کمکی (HTL) (کلاس II) به‌منظور ساده نگه‌داشتن سازه و کاهش احتمال ارائه‌ی ناچای اپی‌توپ‌های مشترک با بافت‌های سالم و تقویت تولرانس نسبت به آنتی‌ژن‌های مشترک توموری کنار گذاشته شدند؛ چالش تولرانس نسبت به آنتی‌ژن‌های خودی در واکسن‌های توموری کلاس II در برخی بررسی‌ها مورد تأکید قرار گرفته است (۳۳). با این حال، مطالعات بنیادی و بالینی متعددی نشان داده‌اند که سلول‌های CD4+ Th برای پایدار ماندن پاسخ سلول‌های CD8+ و تشکیل حافظه‌ی بلندمدت ضروری هستند؛ بنابراین، نبود اپی‌توپ‌های HTL در سازه‌ی حاضر یک محدودیت مهم محسوب می‌شود و در طراحی‌های آتی باید با به‌کارگیری اپی‌توپ‌های Th عمومی (مانند PADRE) یا ادجولنت‌ها و واکسن‌های کمکی هدف‌گیر CD4+ جبران گردد. از منظر فیزیوشیمیایی، سازه‌ی ۲۸۱ اسیدآمینه‌ای پایدار (شاخص ناپایداری ۲۶/۱)، نسبتاً آب‌دوست ($\text{GRAVY} = -0.463$)، با حالیت پیش‌بینی‌شده‌ی بالاتر از میانگین پروتئین‌های مرجع (۰/۵۳۹) $\text{QuerySol} =$ و کیفیت ساختاری مطلوب پس از پالایش (۹۳/۶) $\approx \text{Ramachandran favored}$ ؛ تأیید ProSA/ERRAT) ارزیابی شد. مهم‌تر آن‌که داکینگ تطبیقی نشان داد میل اتصال واکسن به TLR3 از TLR4/7 بیشتر است ($\Delta G \approx -11.1 \text{ kcal/mol}$)، که از منظر القای پیام‌رسانی IFN نوع I و راه اندازی مقاطع مسیره‌های سمیت سلولی، می‌تواند مزیت عملکردی ایجاد کند؛ شبیه‌سازی C-ImmSim نیز به‌صورت یک پیش‌بینی *in silico* الگوی غالب

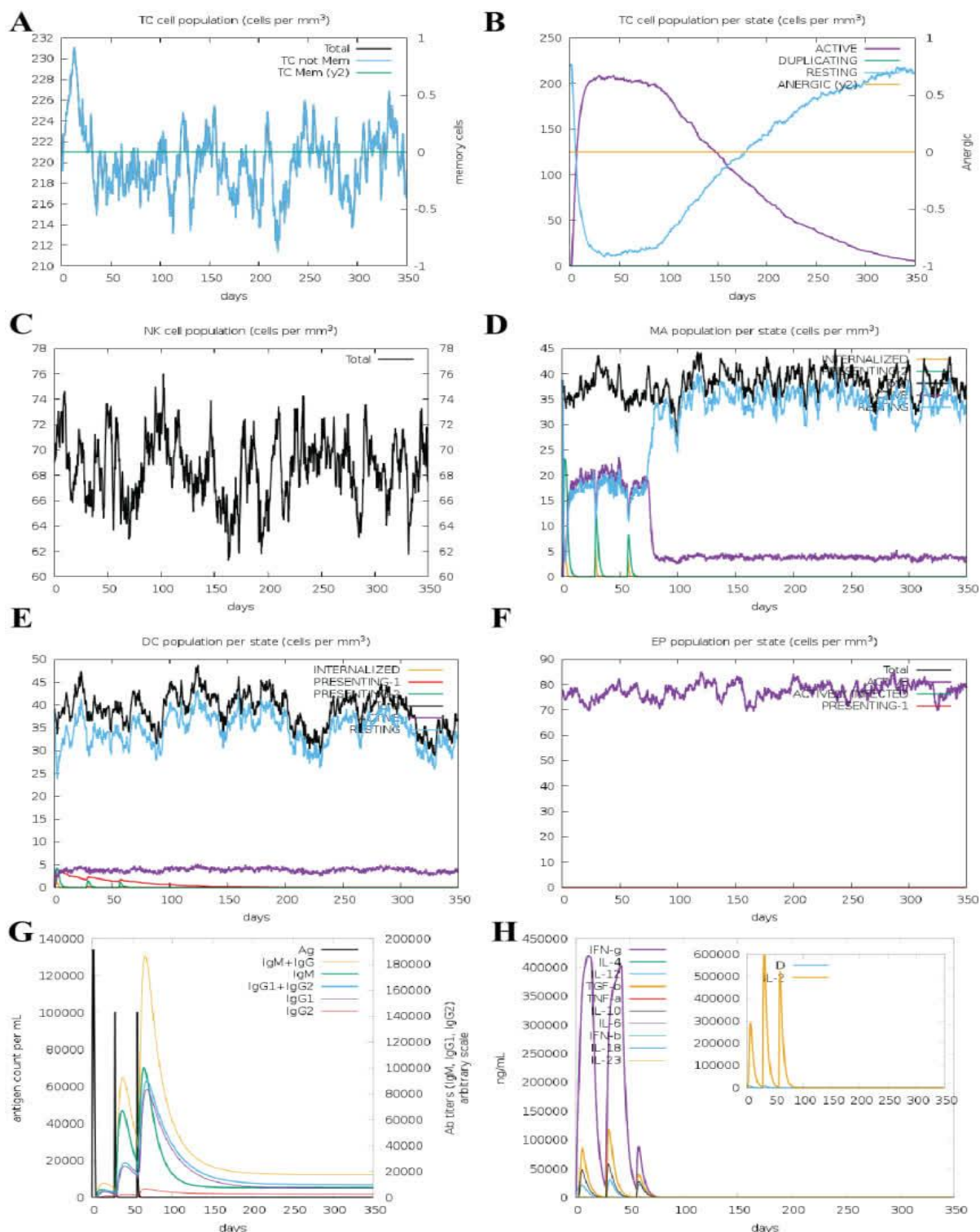
در شبیه‌سازی ایمنی مشاهده شد که سلول‌های T تنظیمی در روزهای اولیه فعال بودند اما سپس کاهش یافته و در سطح پایینی تثبیت شدند، موضوعی که بیانگر کاهش اثرات مهارى بر پاسخ ضدتوموری است. در مقابل، سلول‌های T کشنده ابتدا یک فاز فعال‌سازی را طی کردند و سپس به مرحله تکثیر و استراحت وارد شدند؛ اگرچه جمعیت سلول‌های فعال کاهش یافت، اما سلول‌های تکثیری تا پایان شبیه‌سازی پایدار باقی ماندند که نشان‌دهنده توانایی واکسن در تحریک ایمنی ضدتوموری است. سلول‌های کشنده طبیعی (NK) در طول دوره تغییرات نوسانی داشتند ولی به طور کلی در سطح حدود ۷۰ سلول بر میلی‌متر مکعب ثابت ماندند. ماکروفاژها نیز در مراحل اولیه فعال بودند اما در ادامه به سطح متوسطی رسیدند و تثبیت شدند، وضعیتی که نشان‌دهنده نقش حمایتی آن‌ها در فعال‌سازی سلول‌های T و B محسوب می‌شود. سلول‌های دندریتیک فعالیت ارائه‌ی آنتی‌ژن را عمدتاً در روزهای نخست نشان دادند و سپس در محدوده ۳۰ تا ۴۰ سلول بر میلی‌متر مکعب ثابت باقی ماندند، در حالی که سلول‌های اپی‌تلیال نیز در محدوده ۷۰ تا ۸۰ سلول بر میلی‌متر مکعب حفظ شدند و نقش پایدار خود را در ارائه آنتی‌ژن ادامه دادند (شکل ۳A-F).

بار آنتی‌ژن و تیر آنتی‌بادی‌ها

پس از هر دوز تزریق، بار آنتی‌ژن به‌سرعت کاهش یافت. این کاهش نشان‌دهنده فعال‌سازی مؤثر سیستم ایمنی و حذف آنتی‌ژن‌های ارائه‌شده توسط واکسن بود. بیشترین کاهش بار آنتی‌ژن بلافاصله پس از تزریق دوم مشاهده شد که حاکی از تقویت پاسخ ایمنی در دوزهای یادآور است. در مقابل، تیر آنتی‌بادی‌های IgM و IgG افزایش چشمگیری را نشان داد. پس از تزریق اول، سطح IgM به سرعت افزایش یافت و سپس با تزریق‌های بعدی، جبهه‌جایی ایزوتایی به IgG1 و IgG2 رخ داد. بیشترین سطح آنتی‌بادی‌ها پس از تزریق دوم ثبت شد و این سطوح تا پایان دوره شبیه‌سازی در مقادیر بالا پایدار باقی ماند (شکل ۳G).

سایتوکاین‌ها

الگوی سایتوکاین‌ها نشان داد که اینترفرون گاما ($\text{IFN-}\gamma$) به‌عنوان شاخص سلول‌های لنفوسیت T کمکی نوع ۱ (Th1) در مقادیر بالا ترشح شد و با قله‌های حدود $400,000 \text{ ng/mL}$ پس از هر دوز همراه بود اینترفرون گاما-۲ (IL-2). نیز به‌عنوان فاکتور تکثیری برای سلول‌های T قله‌های متعدد نشان داد. در مقابل، سایتوکاین‌های ضدالتهابی مانند اینترفرون گاما-۱۰ (IL-10) و فاکتور رشد تغییر دهنده بتا ($\text{TGF-}\beta$) در سطوح پایین‌تری حضور داشتند. این الگو تأییدی بر القای ایمنی غالب Th1 است که برای پاسخ ضدتوموری ضروری است (شکل ۳H).



شکل ۳. شبیه‌سازی ایمنی سلول‌های ایمنی و سایتوکاین‌ها در پاسخ به واکسن چندایمی توپی طراحی شده

(A) تغییرات جمعیت کل سلول‌های T کشته (TC) و زیرمجموعه‌های حافظه طی ۳۶۰ روز. (B) دینامیک حالت‌های عملکردی سلول‌های TC شامل فعال، تقسیم‌شونده و آنرژیک. (C) نوسانات جمعیت سلول‌های NK در طول دوره شبیه‌سازی. (D) تغییرات جمعیت ماکروفاژها (MA) و زیرمجموعه‌های فعال و غیر فعال. (E) دینامیک جمعیت سلول‌های دندریتیک (DC) و وضعیت‌های عملکردی مختلف شامل داخلی‌سازی، پردازش و ارائه آنتی‌ژن. (F) پایداری جمعیت سلول‌های اپی‌تلیال (EP) طی ۳۶۰ روز. (G) تولید آنتی‌بادی‌های IgM و IgG (زیرکلاس‌های ۱-۴) در پاسخ به واکسن. (H) پروفایل سایتوکاینی شامل IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12, TGF- β , TNF- α , IL-10, IL-6, IFN- β , IL-18, IL-23 و سایر سیتوکاین‌های کلیدی در طی دوره شبیه‌سازی.

به صورت هم زمان بهره می برد. با این حال، عدم حضور لنفوسیت های کمک کننده T ممکن است ضرورت طراحی رژیم های تقویتی (مانند روش اولیه سازی- تقویت یا استفاده از محرک های ایمنی) را برجسته تر سازد.

در مطالعه ی Gharbavi و همکاران، از منظر ارتباط بین بیوانفورماتیک و آزمایشگاه یک آنتی ژن چنددانه ای نو ترکیب (-IL-13Rα2/Tenascin-IL-13Rα2/PTPRZ-1: ۵۰۶ آمینه اسیدی) را از طراحی محاسباتی تا بیان در *E. coli* و نتایج های و سترن بلات پیش برده و داکینگ قلیلی با TLR4 گزارش کرد. این مسیر نشان می دهد که ارتباط بین بیوانفورماتیک و آزمایشگاه ممکن و ارزشمند است؛ بدین ترتیب، برای سازی حاضر نیز گام های آتی باید شامل بیان نو ترکیب، سنجش پردازش/ارائه ای اپی توپ ها، پوشش HLA چندقومیتی، ارزیابی سمیت/آلرژی و آزمون های عملکردی سلول های لنفوسیت T کشنده و سلول های کشنده طبیعی در مدل های توموری باشند (۳۵).

لازم به ذکر است که مطالعه ای حاضر چند محدودیت مهم داشت. نخست، این مطالعه یک آنالیز کاملاً ایمنی- محاسباتی است و تمامی نتایج آن (پیش بینی اپی توپ ها، مدل ساختاری، داکینگ و شبیه سازی ایمنی) در حال حاضر جنبه ای فرضی دارند و باید در آزمایشگاه و مدل های حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرند. دوم، در تحلیل داکینگ، کنترل منفی اختصاصی (مانند توالی scrambled یا پروتئین نامرتبط) مدل سازی نشد و تفسیر نتایج عمدتاً بر مقایسه ی نسبی بین TLR3، TLR4 و TLR7 متکی است؛ از این رو، دقت پیش بینی مطلق برهم کنش ها محدود است. سوم، شبیه سازی C-ImmSim بر پایه ی یک مدل عمومی از سیستم ایمنی انسان است و پارامترهای اختصاصی بیماران مبتلا به GBM (مانند ایمنی سرکوبی ریزمحیط تومور) را به طور کامل در بر نمی گیرد؛ بنابراین، الگوهای پاسخ IgM/IgG و سایتوکاین ها لزوماً از نظر کمی با پاسخ های درون تنی منطبق نیستند. چهارم، نبود اپی توپ های HTL در سازی می تواند بر کیفیت پاسخ حافظه تأثیر بگذارد و در طراحی های آینده باید به کمک اپی توپ های Th عمومی یا آدجوانت های هدف گیر CD4+ جبران شود. عدم انجام آنالیز پوشش جمعیتی اپیتوپ های منتخب نیز از محدودیت های این مطالعه است که باید در مطالعات بعدی و پیش از ورود به فازهای آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد.

از منظر اعتبارسنجی ساختاری، امتیاز ERRAT مدل در حد متوسط (۵۵/۰۸) بوده و در محدوده ی قابل قبول برای مدل های پیش بینی شده قرار می گیرد، اما به کیفیت ساختارهای تجربی یا مدل های پالایش شده با امتیازهای >۸۰ نمی رسد؛ بنابراین، در این مطالعه ساختار سه بعدی عمدتاً برای تحلیل های کیفی مانند محل برهم کنش با TLR3 و نه تفسیر دقیق جزئیات اتمی به کار گرفته شده است (۱۷).

Th1، بالا بودن IFN-γ/IL-2، ایجاد حافظه ی B/T و کاهش Treg سلول های T تنظیمی را نشان داد، الگویی که از نظر کیفی با نیازهای ضد توموری همخوان است، هرچند این الگو نمی تواند جایگزین داده های تجربی برون تنی یا درون تنی شود.

در مقایسه با آثار هم حوزه، چند تفاوت محوری دیده می شود. در مطالعه ی Salahlou و همکاران، ماکروفازهای مرتبط با تومور راهداف قرار دادند و واکسن طراحی شده برون داد داکینگ بسیار قوی با TLR2/4 و پایداری مناسب در شبیه سازی داینامیکی کوتاه مدت را گزارش نمود؛ جهت گیری آن کار، بیش از آن که بر محور سلول های توموری باشد، بر بازبرنامه ریزی ریزمحیط ایمنی مبتنی است. در برابر، طراحی حاضر بر محور سلول های توموری بوده و بر پایه هدف قرار دادن دو آنتی ژن است؛ و تفاوت گیرنده ی ذاتی غالب نیز معنادار است، در حالی که در محور TLR2/4 پررنگ است. از منظر زیست-ایمنی، جهت گیری به سمت TLR3 می تواند به ارائه متقابل قوی تر و حافظه ی فعالیت ضد توموری بادوام تر منتهی شود، در حالی که جهت گیری به سمت TLR4 بیشتر یک التهاب گسترده ی میکروذاتی را تقویت می کند؛ بنابراین، انتخاب گیرنده ی ذاتی، به دو «مکانیسم غالب» متفاوت می انجامد (۳۴).

در مطالعه ی Mirzaie و همکاران، انتخاب آنتی ژن ها بر اساس تحلیل های ژن بیان/بقا از TCGA انجام شد (PLAUR, ITGB3, HLA-A, HLA-B) و سازی نهایی کوتاه تر (۱۸۶ اسید آمینه) با سه اپی توپ CTL و یک اپی توپ Th و آدجوانت پروتئینی IL7/L12 طراحی شد؛ داکینگ قوی با TLR4، نیمه عمر بالاتر و پایداری MD 300 ns گزارش گردید و شبیه سازی ایمنی افزایش IgM/IgG و IFN-γ/IL-2 را تأیید کرد (۶). نسبت به کار Mirzaie و همکاران، طراحی حاضر بلندتر اما همچنان در بازه ی مناسب تولید صنعتی است، HTL را عمدهً کنار گذاشته و به جای اتکا به آدجوانت پروتئینی، بر تحریک TLR3 (و استفاده ی بالقوه از آگونیست های پلی (I:C)) تکیه می کند؛ این تفاوت استراتژیک می تواند در راهبردهای ترکیبی آینده (prime-boost) یا هم افزایی با مهارکننده های ایست های ایمنی تعیین کننده باشد. در مطالعه ای دیگر، و همکاران با جمع Salahlou آنتی ژن های کلاسیک GBM و به کارگیری PADRE اپی توپ متصل شونده به HLA DR (PADRE) و پروتئین های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی (HSP70)، سازی ۴۱۰ اسید آمینه ای ساختند که از نظر پایداری و داکینگ با TLR4 نتایج قوی و معناداری داشت و در C-ImmSim نیز پاسخ های هومورال/سلولی مطلوبی را پیش بینی کرد (۳۴).

در مقایسه، کار حاضر با هدف افزایش پوشش جمعیتی از طریق هدف گیری آنتی ژن هایی با بیان بالا و همزمان با کاهش کمیت اپی توپی و کوچک سازی نسبی سازی به منظور بهبود تولید پذیری، از دو آنتی ژن

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که طراحی واکسن پپتیدی چندای تویی علیه گلیوبلاستوما چند شکلی با هدف گیری گیرنده های IL13Rα2 و EPHA2 از منظر ایمنی- محاسباتی دارای ویژگی های قابل توجهی است. در این سازه، اپی توپ های منتخب بر اساس معیارهای آنتی ژن زایی، غیر آلرژن بودن و غیر سمی بودن شناسایی و با استفاده از لینکرهای اختصاصی به یکدیگر متصل شدند تا توانایی تحریک پاسخ ایمنی مؤثر تضمین شود. بررسی های فیزیوشیمیایی نشان داد که واکسن طراحی شده از پایداری ذاتی و قابلیت انحلال مناسبی برخوردار است که این ویژگی ها از نظر تولید پروتئین نوترکیب نیز اهمیت دارد. پیش بینی ساختار ثانویه و تحلیل مدل سه بعدی پالایش شده بیانگر کیفیت بالای ساختاری و تطابق مناسب با معیارهای تجربی بود. از منظر تعامل با گیرنده های ایمنی، واکسن بیشترین تمایل اتصال را به TLR3 نشان داد که این امر بیانگر قابلیت بالای آن در تحریک مسیرهای سیگنال دهی مرتبط با پاسخ ضد توموری است. برهم کنش با TLR4 و TLR7 نیز در سطح متوسط و ضعیف تر قرار داشت، که نشان می دهد اثر اصلی ایمنی زایی این واکسن احتمالاً از

طریق TLR3 اعمال می شود. به طور کلی، یافته ها تأیید می کند که واکسن طراحی شده دارای ویژگی های مطلوب ایمنی شناختی، فیزیوشیمیایی و ساختاری است و می تواند به عنوان یک نامزد بالقوه برای مطالعات آزمایشگاهی و پیش بالینی مطرح شود. با توجه به محدودیت های درمان های رایج و پیش آگهی نامطلوب بیماران مبتلا به GBM، این رویکرد ایمنی- محاسباتی می تواند مسیر جدیدی برای توسعه واکسن های ضد سرطانی فراهم کند، اما تمامی یافته ها در حال حاضر در حد پیش بینی های *in silico* بوده و تأیید نهایی آن ها مستلزم مطالعات آزمایشگاهی و پیش بالینی گسترده در مدل های سلولی و حیوانی است.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی با کد ۱۴۰۲۱۳۱ می باشد که در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسیده و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به انجام رسیده است. بدین وسیله از زحمات مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و سرکار خانم هاجر ناجی اصفهانی تقدیر و تشکر می شود.

References

1. Sarfraz Z, Maharaj A, Venur VA, Lathia JD, Odia Y, Ahluwalia MS. Immunotherapy in Glioblastoma: An Overview of Current Status. Clin Pharmacol 2025; 17: 185-209.
2. Latzer P, Zelba H, Battke F, Reinhardt A, Shao B, Bartsch O, et al. A real-world observation of patients with glioblastoma treated with a personalized peptide vaccine. Nat Commun 2024; 15(1): 6870.
3. Xiong Z, Raphael I, Olin M, Okada H, Li X, Kohanbash G. Glioblastoma vaccines: past, present, and opportunities. EBioMedicine 2024; 100: 104963.
4. Knudson KM, Hwang S, McCann MS, Joshi BH, Husain SR, Puri RK. Recent advances in IL-13Rα2-directed cancer immunotherapy. Front Immunol 2022; 13: 878365.
5. Muhammad N, Wang R, Li W, Zhang Z, Chang Y, Hu Y, et al. A novel TanCAR targeting IL13Rα2 and EphA2 for enhanced glioblastoma therapy. Mol Ther Oncolytics 2022; 24: 729-41.
6. Mirzaie S, Yuan KD, Ni H, Wu XY. Design of a novel multiepitope vaccine against glioblastoma by in silico approaches. Sci Rep 2025; 15(1): 24046.
7. Wei Y, Qiu T, Ai Y, Zhang Y, Xie J, Zhang D, et al. Advances of computational methods enhance the development of multi-epitope vaccines. Brief Bioinform 2025; 26(1): bbaf055.
8. Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand WH, Peters B, Nielsen M. Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. J Proteome Res 2020; 19(6): 2304-15.
9. Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins 2006; 65(1): 40-8.
10. Saha S, Raghava GPS. BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. ICARIS; Springer; 2004.
11. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics 2007; 8(1): 4.
12. Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP v.2--a server for in silico prediction of allergens. J Mol Model 2014; 20(6): 2278.
13. Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. Bioinformatics 2014; 30(6): 846-51.
14. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Open Source Drug Discovery C, et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. PLoS One 2013; 8(9): e73957.
15. Buchan DWA, Jones DT. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. Nucleic Acids Res 2019; 47(W1): W402-W7.
16. Heo L, Park H, Seok C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. Nucleic Acids Res 2013; 41(Web Server issue): W384-8.
17. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. Protein Sci 1993; 2(9): 1511-9.
18. Bowie JU, Luthy R, Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-

- dimensional structure. *Science* 1991; 253(5016): 164-70.
19. Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D . Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. 1992; 356(6364): 83-5.
 20. Pontius J, Richelle J, Wodak SJ. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *J Mol Biol* 1996; 264(1): 121-36.
 21. Laskowski R, MacArthur M, Thornton J. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates 2006.
 22. Xue LC, Rodrigues JP, Kastritis PL, Bonvin AM, Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics* 2016; 32(23): 3676-8.
 23. Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure* 2020; 28(9): 1071-81 e3.
 24. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, et al .New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins* 2017; 85(3): 435-44.
 25. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc* 2017; 12(2): 255-78.
 26. Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, et al. How good is automated protein docking? *Proteins* 2013; 81(12): 2159-66.
 27. Vangone A, Bonvin AM. Contacts-based prediction of binding affinity in protein-protein complexes. *Elife* 2015; 4: e07454.
 28. Rapin N, Lund O, Bernaschi M, Castiglione F. Computational immunology meets bioinformatics: the use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. *PLoS One* 2010; 5(4): e9862.
 29. Castiglione F, Mantile F, De Berardinis P ,Prisco A. How the interval between prime and boost injection affects the immune response in a computational model of the immune system. *Comput Math Methods Med* 2012; 2012(1): 842329.
 30. Hosseinalizadeh H, Rahmati M, Ebrahimi A, O'Connor RS. Current Status and Challenges of Vaccination Therapy for Glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 2023; 22(4): 435-46.
 31. Jaén M, Martín-Regalado Á, Bartolomé RA, Robles J, Casal JI. Interleukin 13 receptor alpha 2 (IL13Rα2): Expression, signaling pathways and therapeutic applications in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2022; 1877(5): 188802.
 32. Muhammad N, Wang R, Li W, Zhang Z, Chang Y, Hu Y, et al. A novel TanCAR targeting IL13Rα2 and EphA2 for enhanced glioblastoma therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2022; 24: 729-741
 33. Li W-H, Su J-Y, Li Y-M. Rational design of T-cell- and B-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Acc Chem Res* 2022; 55(18): 2660-71.
 34. Salahlou R, Farajnia S, Alizadeh E, Dastmalchi S, Bargahi N, Rahbarnia L, et al. Design and in silico analysis of a novel peptide-based multiepitope vaccine against glioblastoma multiforme by targeting tumor-associated macrophage. *Heliyon* 2024; 10(24): e40774.
 35. Gharbavi M, Danafar H, Amani J, Sharafi A. Immunoinformatics analysis and expression of a novel multi-domain antigen as a vaccine candidate against glioblastoma. *Int Immunopharmacol* 2021; 91: 107265.

Design of a Multi-Epitope Peptide Vaccine Against Glioblastoma Multiforme Targeting IL13R α 2 and EPHA2: An Immuno-Informatics Approach

Shahrzad Ahangarzadeh¹, Ilnaz Rahimmanesh²

Original Article

Abstract

Background: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive primary brain tumor and is highly resistant to conventional therapies. Designing multi-epitope peptide vaccines represents a promising strategy to elicit tumor antigen-specific immune responses.

Methods: Using immunoinformatics tools, cytotoxic T lymphocyte (CTL) and B-cell epitopes were identified from the IL13R α 2 and EPHA2 tumor-associated antigens and filtered based on antigenicity, non-allergenicity, and non-toxicity. The final vaccine construct comprised 16 CTL epitopes and 6 B-cell epitopes. Physicochemical properties, structural features, and interactions of the vaccine with Toll-like receptors (TLRs) were evaluated.

Findings: The final vaccine consisted of 281 amino acids, with a molecular weight of 31,579.57 Da, pI = 8.98, and an instability index of 26.10, indicating high stability. A GRAVY value of -0.463 and a QuerySol score of 0.539 suggested favorable hydrophilicity and solubility. The refined 3D structure showed 93.6% of residues in favored regions of the Ramachandran plot, and a Z-score of -1.63 confirmed good structural quality. Molecular docking analyses revealed the strongest binding affinity toward TLR3 ($\Delta G = -11.1$ kcal/mol; $K_d \approx 1.6 \times 10^{-8}$ M). Immune simulation demonstrated robust induction of both humoral and cellular immune responses: rapid IgM production after the first immunization followed by isotype switching to IgG1/IgG2 in subsequent doses. In silico immune simulation with C-ImmSim suggested a potential for robust induction of both humoral and cellular immune responses.

Conclusion: The designed multi-epitope vaccine exhibits favorable immunogenicity, stability, and strong interaction with TLR3, positioning it as a promising candidate for further preclinical development as a therapeutic vaccine against glioblastoma.

Keywords: Glioblastoma Multiforme, Multi-Epitope Vaccine, Immunoinformatics, Interleukin-13 Receptor Subunit Alpha 2 (IL13R α 2), Ephrin Type-A Receptor 2 (EPHA2), Molecular Docking Simulation

Citation: Ahangarzadeh Sh, Rahimmanesh I. **Design of a Multi-Epitope Peptide Vaccine Against Glioblastoma Multiforme Targeting IL13R α 2 and EPHA2: An Immuno-Informatics Approach.** J Isfahan Med Sch 2026; 44(864): 1124- 35.

1- Regenerative Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Applied Physiology Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Ilnaz Rahimmanesh, Applied Physiology Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: ilnazrahimmanesh@gmail.com