

УДК 575.112

РАЗРАБОТКА СУБЕДИНИЧНОЙ ВАКЦИНЫ-КАНДИДАТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ИММУНОИНФОРМАТИКИ

© 2025 г. А. А. Тюленев^{1,*}, В. И. Тимофеев¹, А. А. Чернявский¹, А. С. Ивановский¹,
Ю. В. Кордонская¹, Ю. В. Писаревский¹, Ю. А. Дьякова¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: tiulenev.aa@phystech.edu

Поступила в редакцию 21.11.2024 г.

После доработки 30.11.2024 г.

Принята к публикации 30.11.2024 г.

На основе анализа надмембранных доменов капсидного белка вируса лихорадки Денге спроектирован прототип вакцины против данного вируса. Для предсказания структуры эпитопов с помощью нейронной сети AlphaFold2 смоделированы пространственные структуры доменов. В результате моделирования молекулярной динамики вакцин-кандидатов с использованием программного пакета Gromacs-2023 показано сохранение структурной стабильности всех исследуемых субдоменов. С помощью программы C-IMMSIMM предсказана способность вакцины-кандидата вызывать выраженный первичный и устойчивый вторичный клеточный иммунный ответ.

DOI: 10.31857/S0023476125030164, EDN: VCPVHQ

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы рода *Flavivirus* представляют собой обширную группу РНК-содержащих патогенов, вызывающих широкий спектр заболеваний у людей и животных [1]. Наиболее распространенными представителями этого рода являются вирусы: Денге типов 1–4, гепатита С, лихорадки Западного Нила, желтой лихорадки, японского и клещевого энцефалитов. Эти вирусы способны вызывать серьезные, потенциально опасные для жизни состояния, диагностика которых представляет сложность даже для высококвалифицированных специалистов [2]. В настоящей работе рассмотрены четыре типа вируса лихорадки Денге, которой ежегодно заражается около 5 млн человек [3].

Представители всех четырех типов вирусов лихорадки Денге имеют общие структурные характеристики. Их вирионы обладают схожим строением и используют аналогичный механизм проникновения в клетки хозяина, осуществляемый путем слияния вирусных оболочек с клеточными мембранами.

Особый интерес представляют внешние домены, отвечающие за переход белка в активную форму, поскольку они играют важную роль в процессе слияния мембран. Анализ последовательностей

надмембранных доменов различных типов вируса лихорадки Денге показывает высокую степень консервативности, что подчеркивает его значимость для жизненного цикла вирусов и открывает перспективы для разработки универсальных вакцин против всех типов лихорадок Денге (табл. 1).

В процессе разработки вакцин против вируса лихорадки Денге было предпринято множество попыток на разных этапах исследований — от фундаментальных научных работ и доклинических испытаний до продвинутых стадий клинических исследований. Тем не менее в Российской Федерации до сих пор не одобрено ни одной вакцины для профилактики или лечения этого вируса [4], несмотря на многолетние усилия ученых и рост количества заболевающих [5, 6], а также наличие смертельных случаев [7].

В современных условиях, благодаря накоплению обширных генетических и структурных данных о патогенах в специализированных базах, появилась возможность использовать информацию о пространственных структурах вирусных белков для выявления потенциальных иммуногенных детерминант — эпитопов. Применение к этим данным методов иммуноинформатики, структурной биологии и молекулярной динамики (МД) позволяет

Таблица 1. Процент совпадения последовательностей протеомов, полученный с помощью алгоритма BLAST в Uniprot

		Лихорадка Денге			
		Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 4
Лихорадка Денге	Тип 1	100.0	79.5	74.1	68.6
	Тип 2	79.5	100.0	74.5	73.2
	Тип 3	74.1	74.5	100.0	73.6
	Тип 4	68.6	73.2	73.6	100.0

конструировать и прогнозировать новые эффективные субъединичные вакцины-кандидаты. Более того, развитие биоинформационных инструментов позволяет проводить *in silico* оценку иммунного ответа организма на предполагаемые вакцины, что значительно ускоряет процесс их разработки.

Важно отметить, что использование технологии рекомбинантной ДНК (рДНК) для производства субъединичных вакцин существенно сократило время, необходимое для их создания и внедрения [8–10].

Данное исследование представляет инновационный алгоритм разработки субъединичной вакцины-кандидата против лихорадки Денге, полностью реализованный методами *in silico* [11]. Алгоритм включает в себя применение методов анализа больших данных к пространственным структурам трансмембранных вирусных белков для предсказания Т- и В-эпитопов и конструирование потенциальных субъединичных вакцин, которые могут быть эффективно произведены с использованием технологии рДНК.

Ключевым преимуществом данного алгоритма является глубокий анализ структуры целевого антигена, позволяющий учитывать иммунологические свойства субдоменов и воспроизводить их в моделируемых вакцинах-кандидатах. В результате применения этого подхода предложена вакцина-кандидат, наиболее полно отвечающая всем необходимым требованиям среди остальных кандидатов: отсутствие токсичных элементов, гипоаллергенность, структурная стабильность в водной среде, способность вызывать стойкий иммунный ответ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аминокислотная последовательность капсидного белка вируса лихорадки Денге A0A6B7HXR6 получена из базы данных Uniprot [12] с использованием алгоритма BLAST [13], который показал ее значительную консервативность по сравнению с

остальными капсидными белками всех типов лихорадки Денге.

Топология белка относительно клеточной мембраны предсказана с помощью программы DeepTMHMM [14]. Далее с помощью сервиса AlphaFold2 [15] была предсказана пространственная структура надмембранной части исследуемого белка. Дальнейший структурный анализ расположения эпитопов выполняли с использованием PyMol [16].

Эпитопы Т-клеток были предсказаны с помощью программного обеспечения NetCTL [17] только для HLA класса I с использованием следующих параметров: вес tap (transporter associated with antigen processing) – 0.05, вес MHC (major histocompatibility complex) – 1; вес расщепления – 0.15, порог идентификации эпитопа – 0.75.

Как прерывистые (конформационные), так и линейные эпитопы В-клеток были предсказаны с помощью инструмента прогнозирования ElliPro [18], расположенного на сервере IEDB (Immune Epitope Database [19]). Пороговое значение существования иммунной реакции и максимальное расстояние откалиброваны с использованием значений по умолчанию: пороговое значение существования иммунной реакции – 0.5, максимальное расстояние – 6 Å. Смоделированная трехмерная структура белка использовалась для прогнозирования как конформационных (прерывистых), так и линейных эпитопов В-клеток.

Для анализа аллергенности и токсичности обнаруженных эпитопов использовали программы AllerTOP2 [20] и ToxinPred2 [21] соответственно. Иммуногенность найденных эпитопов оценивали с помощью VaxiJen [22].

С использованием программы PyMol [16] выделен надмембранный субдомен исследуемого белка, богатый эпитопами. На основе первичной последовательности выделенного субдомена проведено повторное предсказание его пространственной структуры, предсказание Т- и В-клеточных эпитопов и анализ их иммунологических свойств, поскольку участки связывания с рецепторами клеток иммунной системы субдомена могут варьироваться из-за незначительных изменений в конформации.

Для проверки структурной стабильности предложенной субъединичной вакцины-кандидата, сконструированной на основе второго исследуемого домена, проведено моделирование МД. Моделирование МД каждой системы проводили с использованием пакета Gromacs-2023 [23] в силовом поле AMBER99SB-ILDN [24]. Минимальное расстояние между молекулой белка и гранью ячейки составляло 10 Å. В ячейку добавили воду модели TIP3P [25], а также ионы Cl^- для нейтрализации общего заряда системы. После процедуры минимизации энергии

[26] методом наискорейшего спуска [27] систему уравнивали при постоянной температуре 300 К с использованием улучшенного термостата Берендсена [28] в течение 100 пс, а затем при постоянном давлении (1 атм) с помощью баростата Паринелло–Рахмана [29] в течение 100 пс. Моделирование продуктивной МД продолжительностью 100 нс проводили с использованием алгоритма PME (Particle Mesh Ewald [30]) и радиуса отсечки, составляющего 1 нм. Изменения в укладке белка вдоль траекторий оценивали с помощью среднеквадратичных отклонений (СКО) атомов остова основной цепи, радиуса гирации (R_g) полипептида, а также среднеквадратичных флуктуаций остатков (СКФ) аминокислот полипептидной цепи. Значения для указанных выше параметров были получены с помощью встроенных команд rms, gyrate и rmsf Gromacs-2023 [23] соответственно.

Иммуномоделирование единичной инъекции вакцины-кандидата проводили при помощи веб-сервиса C-IMMSIMM [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании, направленном на разработку субъединичных вакцин против вируса лихорадки Денге, был применен комплексный подход, включающий в себя последовательность вычислительных процедур. Этот подход во многом аналогичен методологии, успешно использованной

Таблица 2. Блок-схема разработки субъединичных вакцин *in silico*

Вычислительные процедуры	Программы и базы данных
Поиск целевого антигена и его валидация	UniProtKB
Построение 3D-модели выбранного белка	AlphaFold2
Анализ олигомерного состояния топологии и доменной организации	PyMol2.4, DeepTMHMM
Поиск В- и Т-клеточных эпитопов и оценка их локализации	NetCTL, ElliPro
Анализ иммуногенности, аллергенности, токсичности выбранных эпитопов	VaxiJen, AllerTOP, ToxinPred
Моделирование кандидатов на субъединичную вакцину	AlphaFold2
Проверка стабильности смоделированных полипептидов с использованием МД-моделирования	Gromacs-2023
Прогнозирование иммунных реакций хозяина	C-IMMSIM

в [11], что подтверждает его эффективность и надежность. Ключевые этапы вычислительного каскада представлены в табл. 2.

Анализ доменной организации белка A0A6B7HXR6 вируса лихорадки Денге

На основе функциональных свойств, определенных с помощью базы данных UniProt [12], были выбрано три домена белка A0A6B7HXR6. Расположение этих доменов над клеточной мембраной, подтвержденное сервисом DeepTMHMM [14], делает их более уязвимыми для иммунного ответа организма (рис. 1). Эти домены играют ключевую роль в активации белка с помощью фуринов, сигнальной пептидазы [32]. Благодаря своей доступности для иммунной системы они представляют особый интерес для разработки вакцины.

Разработка субъединичной вакцины на основе Т- и В-клеточных эпитопов

Эпитопы В-клеток классифицированы на два типа в зависимости от пространственной структуры эпитопов: непрерывные (линейные) и прерывистые (конформационные). Полные списки предсказанных эпитопов обоих типов представлены в дополнительных материалах.

Поиск антигенных детерминант в доменах проводили с использованием программы ElliPro [18], которая идентифицирует антигенные остатки на основе трехмерной структуры белка.

Для поиска Т-клеточных эпитопов последовательности доменов разделили на участки длиной девять аминокислот, из которых 18 были идентифицированы как антигенные детерминанты. Список всех предсказанных эпитопов приведен в дополнительных материалах. Аффинность к главному комплексу гистосовместимости рассчитывали по формуле

$$1 - \log_{50000}(aff),$$

где *aff* – аффинность в нМ.

Согласно общему прогнозу антигена, полученному с помощью VaxiJen [22], и рис. 2–4, из которых видно, что все домены достаточно богаты эпитопами, данные домены могут быть протестированы в качестве вакцины. Но третий домен показал несоответствие критериям аллергенности, а первый – токсичности в результате анализа AllerTOP2 [20] и ToxinPred2 [21] соответственно. Таким образом, только второй домен, прошедший обе проверки, является перспективным кандидатом для дальнейшей разработки вакцины.

Однако потенциальная иммуногенность второго домена может быть невысокой из-за его

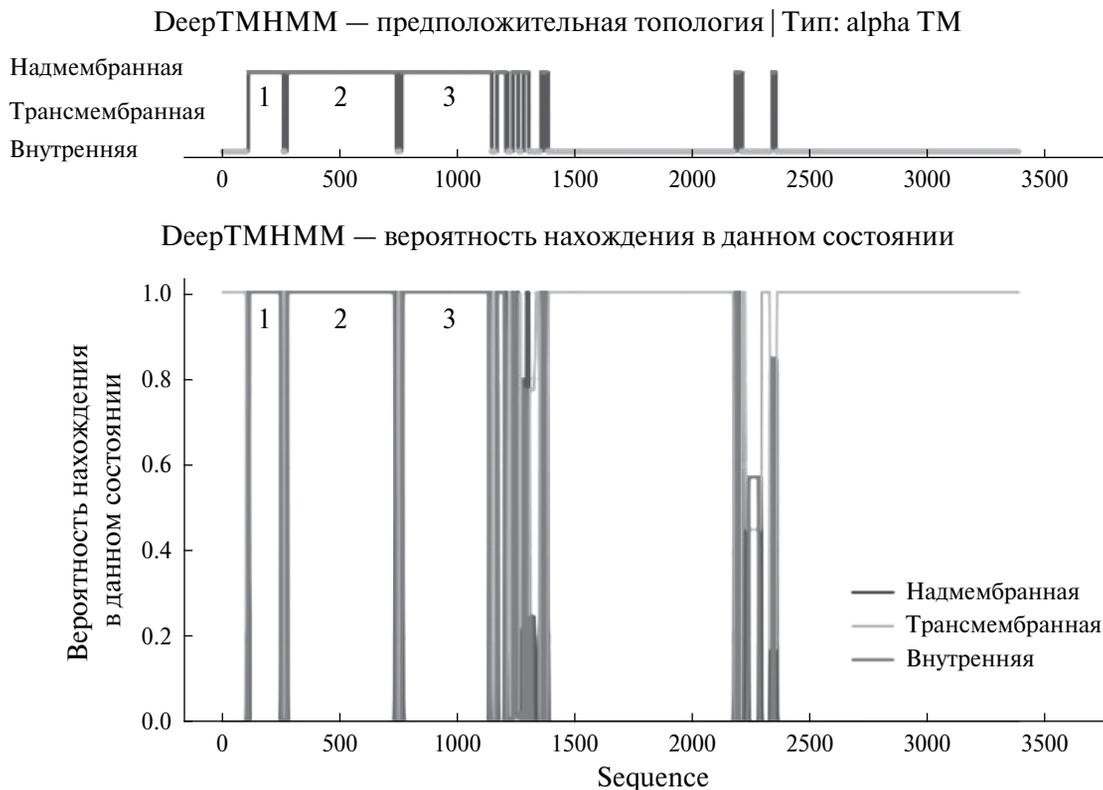


Рис. 1. Расположение белка относительно клеточной мембраны, цифрами 1, 2 и 3 выделены исследуемые надмембранные домены.

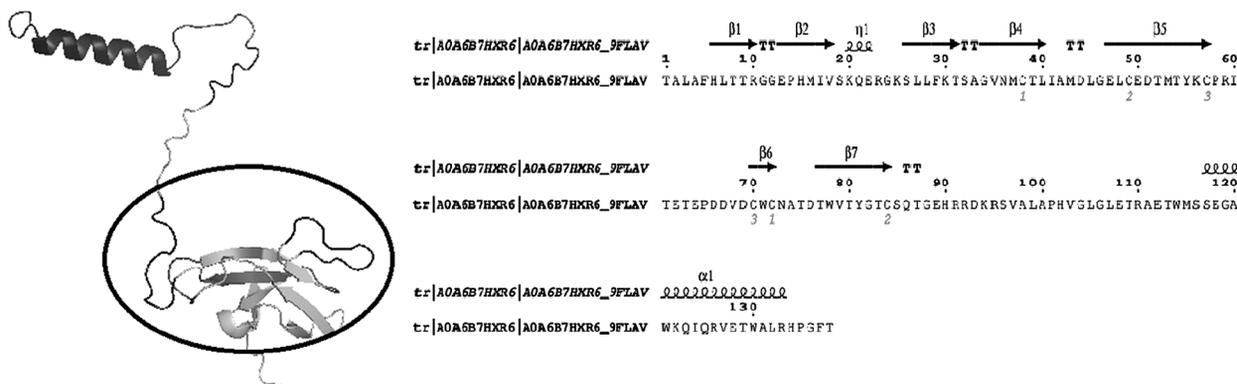


Рис. 2. Пространственная структура первого исследуемого домена белка A0A6B7HXR6 (Т-клеточные эпитопы выделены темно-серым, В-клеточные эпитопы – светло-серым, черным кругом выделен наиболее богатый эпитопами субдомен).

значительного размера (462 аминокислоты). Для повышения иммуногенности и усиления иммунного ответа в качестве вакцины-кандидата выбрали наиболее насыщенный эпитопами субдомен длиной ~100 аминокислот (рис. 5).

Моделирование и валидация вакцины-кандидата

Поскольку база данных UniProtKB/TrEMBL [12] содержит более 200 миллионов белковых последовательностей, а база данных PDB [30] включает в

себя лишь около 200 тыс. экспериментально определенных структур белков, моделирование третичной структуры белка становится критически важным этапом разработки вакцин *in silico*. Одним из наиболее передовых и точных инструментов для такого моделирования является AlphaFold2 [15], основанный на технологиях глубокого обучения и нейронных сетях. В данном исследовании AlphaFold2 использовали для моделирования доменов и субъединичной вакцины-кандидата.

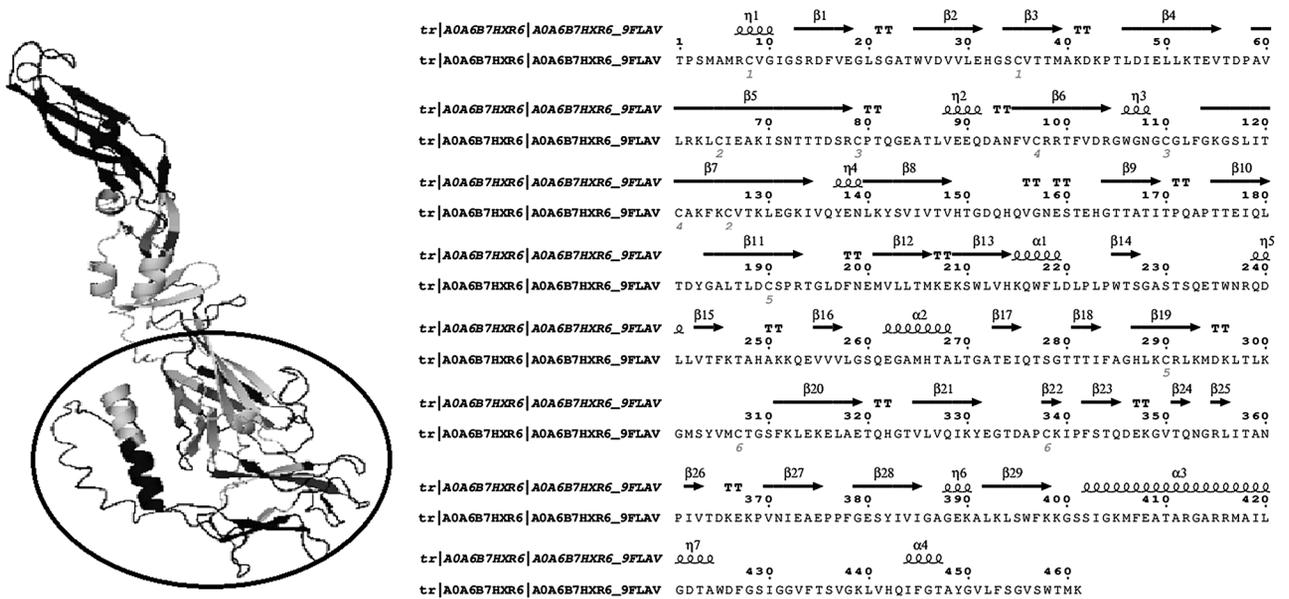


Рис. 3. Пространственная структура второго исследуемого домена белка A0A6B7HXR6 (Т-клеточные эпитопы выделены темно-серым, В-клеточные эпитопы – светло-серым, черным кругом выделен наиболее богатый эпитопами субдомен).



Рис. 4. Пространственная структура третьего исследуемого домена белка A0A6B7HXR6 (Т-клеточные эпитопы выделены темно-серым, В-клеточные эпитопы – светло-серым, черным кругом выделен наиболее богатый эпитопами субдомен).

Стабильность смоделированной структуры была подтверждена методом МД. Анализ СКО, СКФ и R_g показал достаточную стабильность вакцины-кандидата на протяжении 100 нс моделирования (рис. 6–8).

В заключительном этапе валидации был смоделирован иммунный ответ на предложенную вакцину-кандидата (рис. 9). Результаты показали, что она способна вызывать значительное повышение

титров антител и стимулировать умеренную продукцию цитокинов, что указывает на ее потенциальную эффективность в качестве вакцины.

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить перспективного кандидата для субединичной вакцины против лихорадки Денге, который показал высокую структурную стабильность и способность вызывать иммунный ответ в *in silico*-моделях.



Рис. 5. Пространственная структура вакцины-кандидата (темные части – эпитопы, светлые части – не эпитопы).

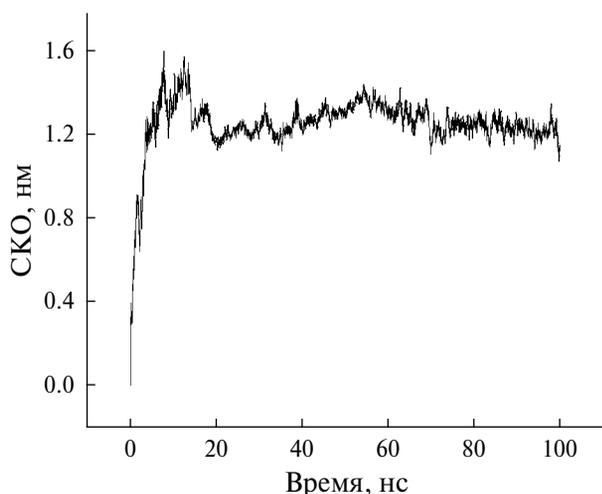


Рис. 6. Среднеквадратичное отклонение атомов вакцины-кандидата в процессе молекулярной динамики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакцинация является одной из наиболее успешных инициатив общественного здравоохранения, однако разработка вакцин против многих заболеваний до сих пор представляет собой сложную задачу. Например, несмотря на десятилетия исследований, в Российской Федерации отсутствуют утвержденные вакцины для профилактики инфекций, вызванных вирусом лихорадкой Денге.

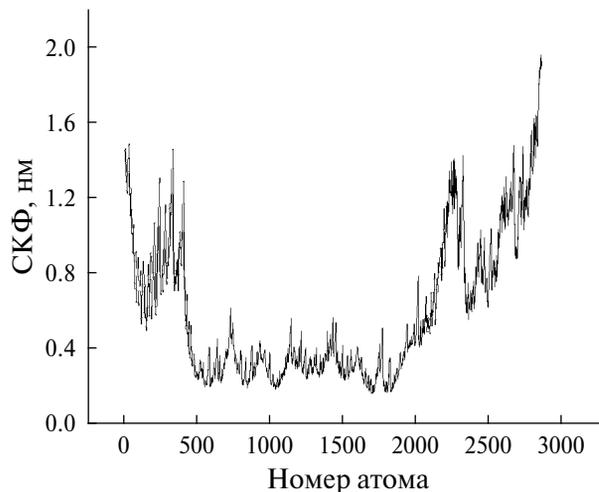


Рис. 7. Среднеквадратичная флуктуация аминокислотных остатков вакцины-кандидата в процессе молекулярной динамики.

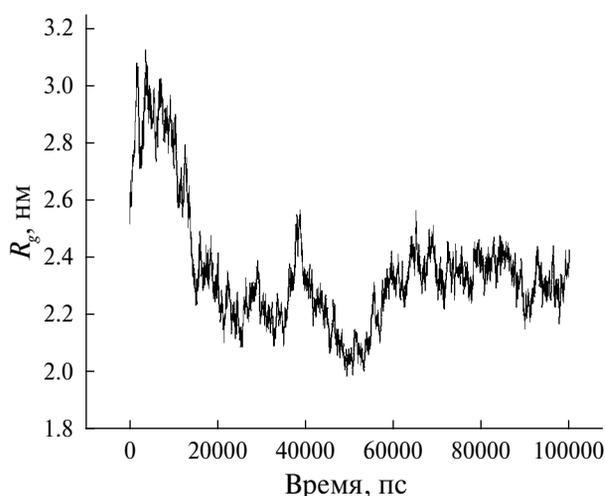


Рис. 8. Радиус гирации вакцины-кандидата в процессе молекулярной динамики.

В данном исследовании описан *in silico*-алгоритм разработки рекомбинантной субъединичной вакцины, основанный на сочетании детального структурного анализа кристаллической структуры поверхностного домена вируса и последних достижений иммуноинформатических методов прогнозирования вакцин с помощью искусственного интеллекта и структурного моделирования.

Предложенная вакцина-кандидат представляет собой небольшой мономерный полипептид (~100 аминокислот), оптимальный для рекомбинантной экспрессии в виде слитого белка с использованием технологии рДНК. Предложенный белок обладает высокой структурной стабильностью, обеспечивающей его эффективное продуцирование в системе бактериальной экспрессии, а также демонстрирует

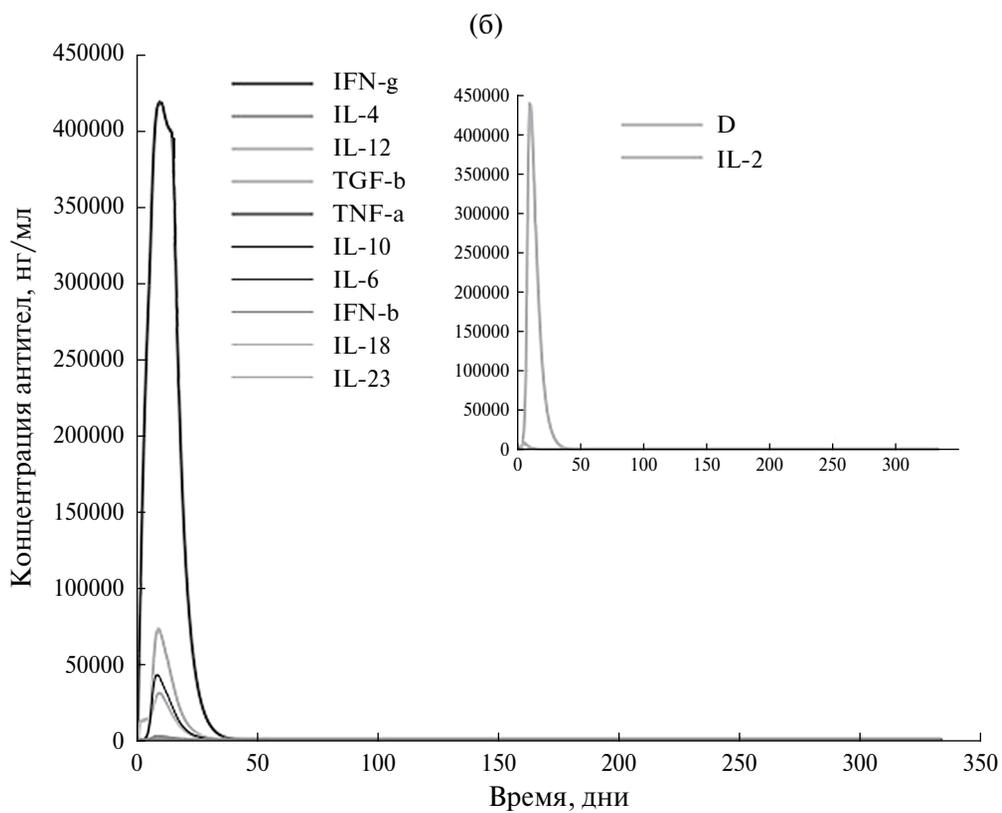
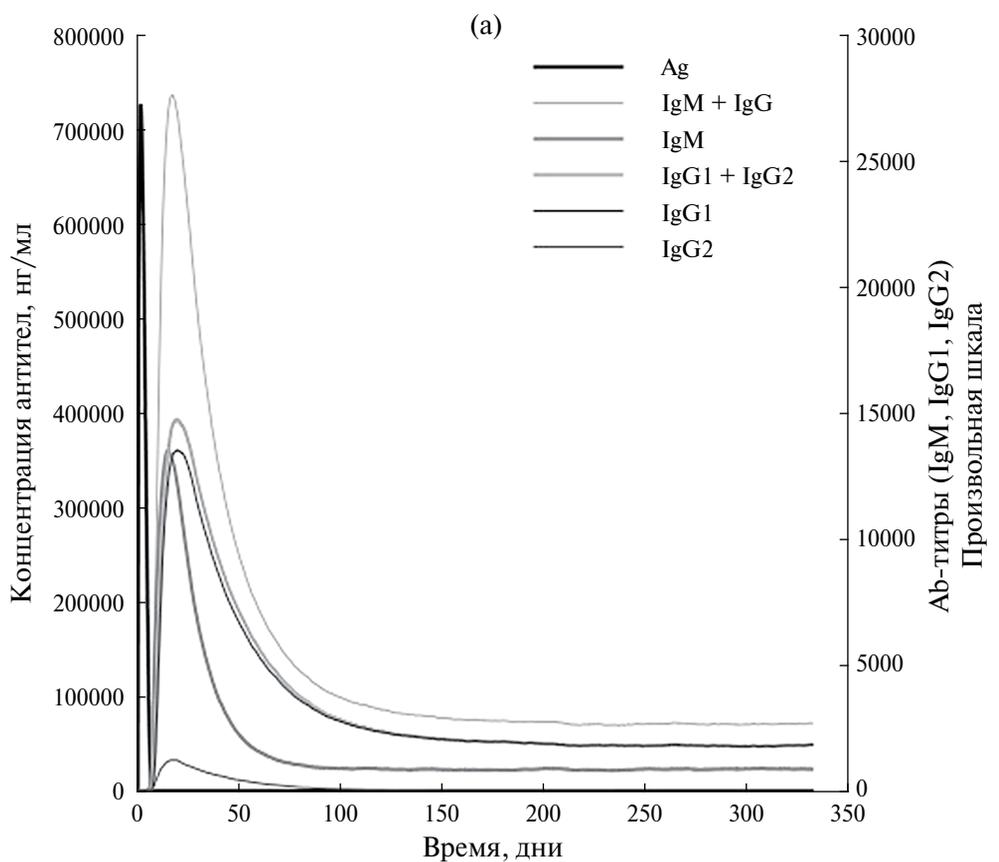


Рис. 9.

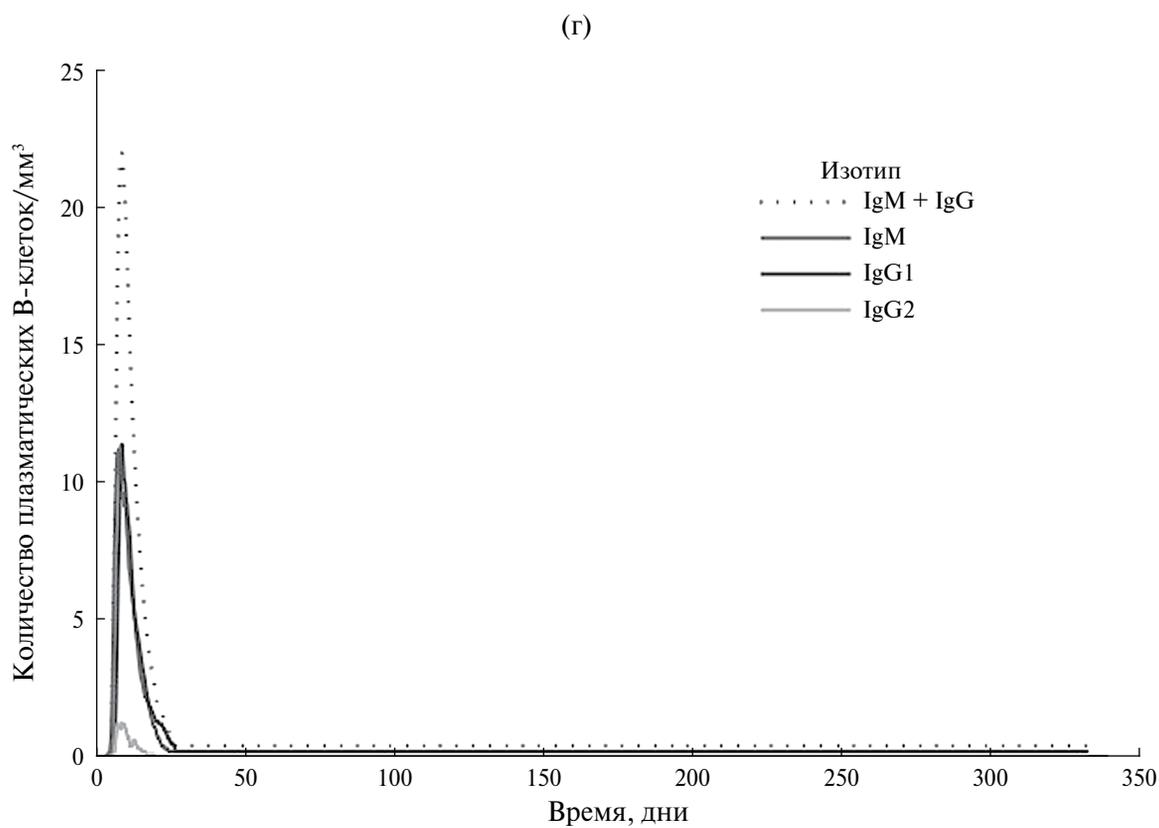
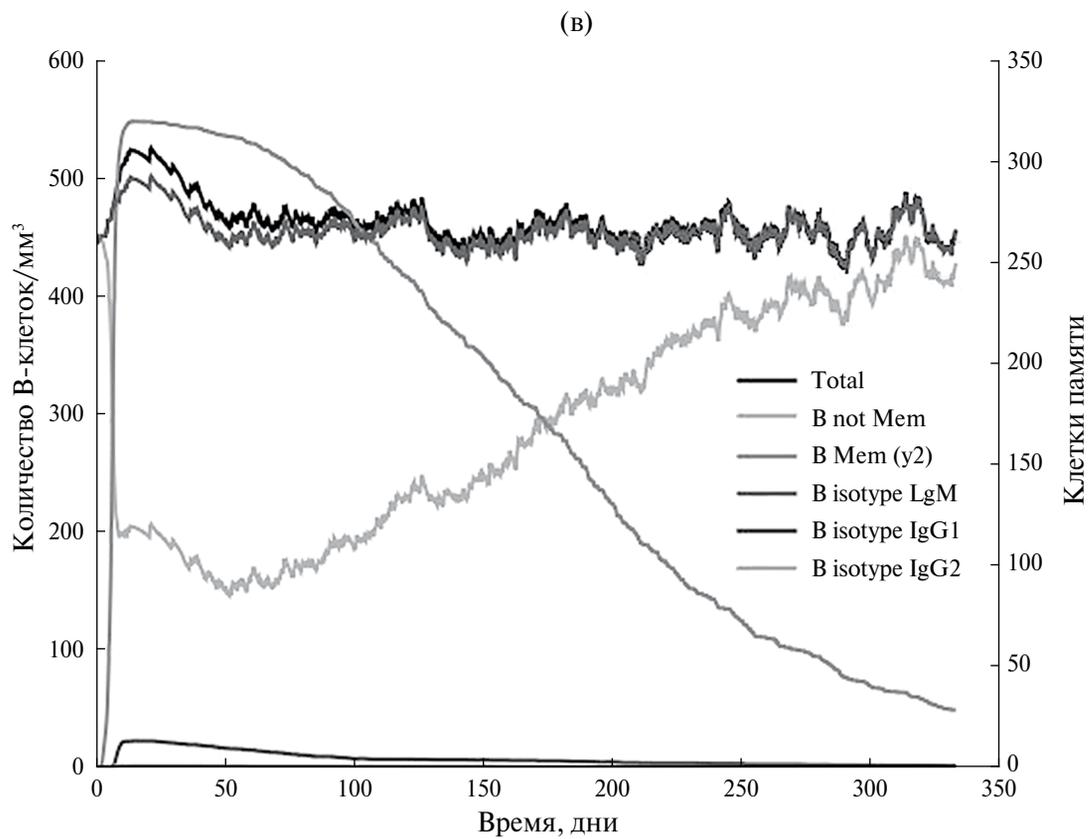


Рис. 9.

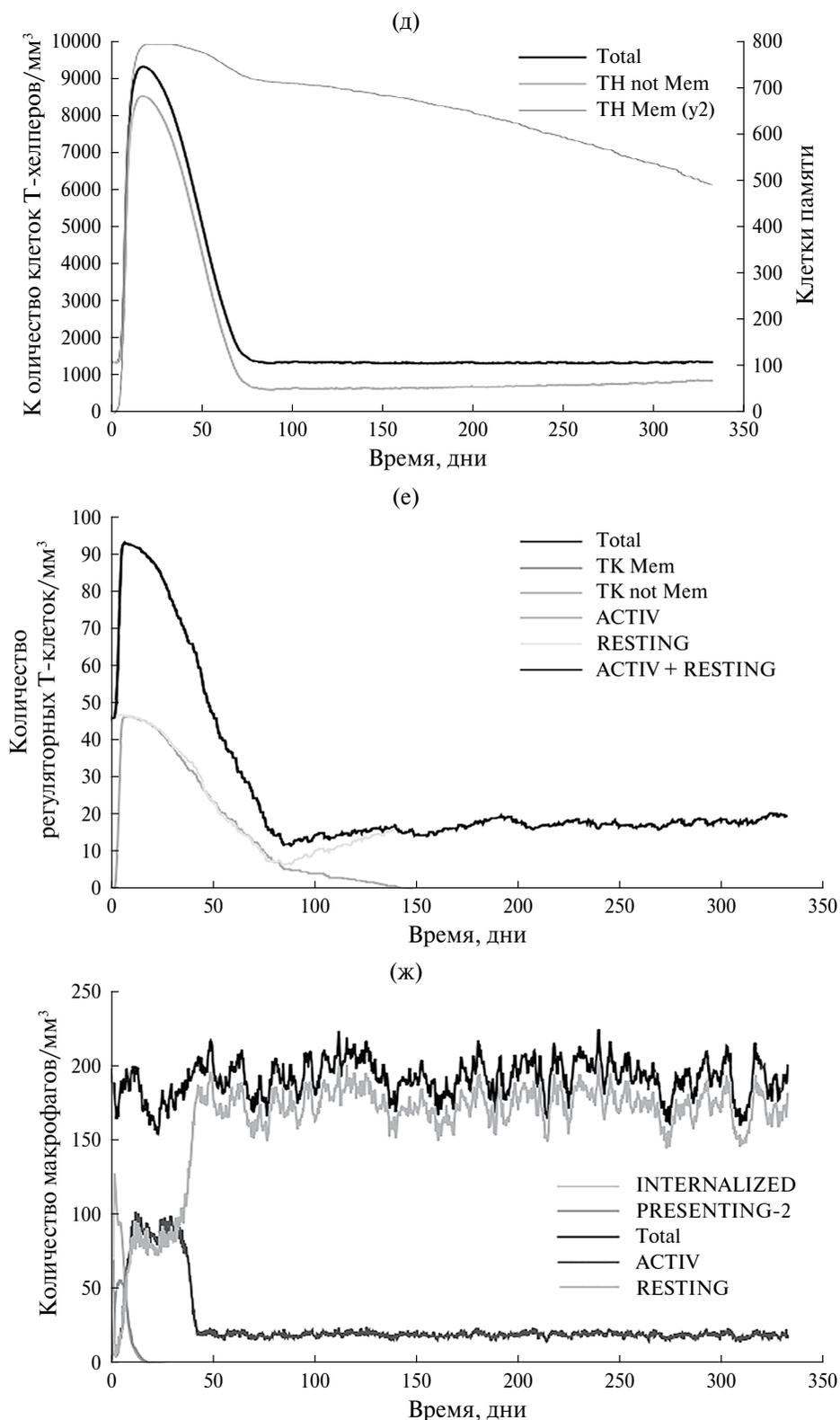


Рис. 9. Иммунный ответ на вакцину. Антитела подразделяются по изотипу (а). Концентрация цитокинов и интерлейкинов (б). D на врезке – сигнал опасности цитокинового шторма. Общее количество В-лимфоцитов, клеток памяти и их разделение на изотипы (в). Количество В-лимфоцитов в плазме крови, разделенное по изотипам (г). Общее количество Т-хелперных лимфоцитов и клеток памяти (д). Общее количество Т-регуляторных лимфоцитов, активных клеток и клеток памяти (е). Общее количество макрофагов, интернализованные, представляющие главный комплекс гистосовместимости класса II, активные и покоящиеся макрофаги (ж).

значительный антигенный потенциал для активации как клеточного, так и гуморального иммунного ответа.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования “Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса” НИЦ “Курчатовский институт”, <http://ckp.nrcki.ru/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Некоммерческое партнерство “Национальное научное общество инфекционистов”. Клинические рекомендации Лихорадка денге у взрослых. http://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/Lih_Denge_adult.pdf
2. *World Health Organization*. “Dengue and severe dengue”. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
3. *Keelapang P., Sriburi R.* // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 2367. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17067286/>
4. Роспотребнадзор. Памятка: “Лихорадка Денге. Что это такое?”. <https://71.rospotrebnadzor.ru/content/596/85820/>
5. Роспотребнадзор. О ситуации с лихорадкой Денге в мире. http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=10432&phrase_id=1490042
6. *Хохлова Н.И., Краснова Е.И., Позднякова Л.Л.* // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7. № 1. С. 65. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-1-65-69>
7. *Сайфуллин М.А., Келли Е.И., Базарова М.В. и др.* // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20. № 2. С. 49.
8. *Abass O.A., Timofeev V.I., Sarkar B. et al.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2022. V. 40. № 16. P. 7283. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1896387>
9. *Adekunle B.R., Angus N.O., Mercy T.A. et al.* // *Veterinary Vaccine.* 2023. V. 2. № 1. P. 2772. <https://doi.org/10.1016/j.vetvac.2023.100013>
10. *Rakitina T.V., Smirnova E.V., Podshivalov D.D. et al.* // *Crystals.* 2023. V. 13. P. 1416. <https://doi.org/10.3390/cryst13101416>
11. UniProtKB. A0A6B7HXR6. <https://www.uniprot.org/uniprotkb>
12. *Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al.* // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605803602>
13. *Jeppe H., Trigos K.D., Pedersen M.D. et al.* // *BioRxiv.* 2022. P. 487609. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
14. *Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al.* // *Nature.* 2021. V. 596. P. 583. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
15. *DeLano W.L.* // *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8; Schrödinger. New York: LLC, 2015.* <https://pymol.org/>
16. *Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K. et al.* // *BMC Bioinformatics.* 2007. V. 8. P. 424. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-424>
17. *Ponomarenko J., Bui H.H., Li W. et al.* // *BMC Bioinformatics.* 2008. V. 9. P. 514. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-514>
18. *Bangov I.P., Doytchinova I.A.* // *J. Mol. Model.* V. 20. № 6. P. 2278. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>
19. IEDB Solutions Center. Introducing the Antigen Summary Page. <https://help.iedb.org/hc/en-us/articles/29457536364443>
20. *Sharma N., Naorem L.D., Jain S., Raghava G.P.S.* // *Brief Bioinform.* 2022. V. 23. № 5. P. 174. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac174>
21. *Doytchinova I.A., Flower D.R.* // *BMC Bioinformatics.* 2007. V. 8. P. 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
22. *Carvalho L., Sano Gi., Hafalla J. et al.* // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 166. <https://doi.org/10.1038/nm0202-166>
23. *Rapin N., Lund O., Bernaschi M., Castiglione F.* // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 4. P. 9862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009862>
24. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al.* // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 79. P. 926. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
25. *Lemak A.S., Balabaev N.K.* // *Berendsen Thermostat.* <https://www.wellesu.com/10.1080/08927029408021981>
26. *Bender C.M., Orszag S.A.* // *Advanced Mathematical Methods for Scientists and Engineers I.* <https://www.sci-hub.ru/10.1007/978-1-4757-3069-2>
27. *Parrinello M., Rahman A.* // *Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method.* <https://www.sci-hub.ru/10.1063/1.1675789>
28. *Hockney R.W., Eastwood J.W.* // *Computer Simulation Using Particles (CRC Press, Boca Raton, 1988)*
29. *Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K. et al.* // *Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field.* <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2970904/>
30. RCSB PDB. About RCSB PDB: A Living Digital Data Resource That Enables Scientific Breakthroughs Across The Biological Sciences. <https://www.rcsb.org/pages/about-us/index>
31. *Rakitina T.V., Smirnova E.V.* // *Crystals.* 2023. V. 13. № 10. P. 1416. <https://doi.org/10.3390/cryst13101416>
32. *Компанец Г.Г.* // *Наука и образование: новое время.* 2018. Т. 1. № 2. С. 68. https://doi.org/10.12737/article_5b3a1b88f15189.21816642

DEVELOPMENT OF A SUBMIT CANDIDATE VACCINE FOR THE PREVENTION OF DENGUE FEVER USING IMMUNOINFORMAICS METHODS

A. A. Tulenev^{a,*}, A. A. Cherniavsky^a, A. S. Ivanovsky^a, V. I. Timofeev^a,
Y. V. Kordonskaya^a, Y. V. Pisarevsky^a, Y. A. Dyakova^a

^a*National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

**E-mail: tiulenev.aa@phystech.edu*

Abstract. The prediction of epitopes was carried out. The structural stability of the candidate vaccine was studied by the molecular dynamics method using the Gromacs-2023 software package. The results showed the preservation of the structural stability of all the studied subdomains. The final stage was the simulation of the cellular immune response using the C-IMMSIMM program. The results predict the ability of candidate vaccines to elicit both a vibrant primary and persistent secondary immune response.