

***Елбоева Полина Игоревна***

аспирант, младший научный сотрудник  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
г. Казань, Республика Татарстан

***Андреева Наталья Юрьевна***

аспирант, младший научный сотрудник  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
г. Казань, Республика Татарстан

***Степанкова Дарья Андреевна***

аспирант, младший научный сотрудник  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
г. Казань, Республика Татарстан

***Баталин Алексей Денисович***

студент  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
г. Казань, Республика Татарстан

***Мартынова Екатерина Владимировна***

канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
г. Казань, Республика Татарстан

***Кабве Эммануэль***

канд. биол. наук, старший научный сотрудник  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
г. Казань, Республика Татарстан

***Давидюк Юрий Николаевич***

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник  
Научно-клинический центр прецизионной и регенеративной медицины  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
г. Казань, Республика Татарстан  
ведущий научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных  
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии  
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный  
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

**Хайбуллина Светлана Францевна**

д-р мед. наук, главный научный сотрудник

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

DOI 10.31483/r-167194

## МУЛЬТИЭПИТОПНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: КОНЦЕПЦИЯ И ДИЗАЙН ВАКЦИННОЙ КОНСТРУКЦИИ IN SILICO

**Аннотация:** мультиэпитопные вакцины представляют собой перспективный инструмент профилактики вирусных инфекций, способный индуцировать комплексный гуморальный и клеточный иммунный ответ. В статье рассмотрены современные подходы к проектированию *in silico* химерных вакцинных конструкций: критерии отбора эпитопов, методы прогнозирования перспективных Т- и В-клеточных эпитопов, выбор линкеров и адъювантов, структурное моделирование, молекулярный докинг и симуляция иммунного ответа. Интеграция иммуноинформатических методов и молекулярного моделирования существенно ускоряет разработку вакцинных кандидатов и повышает точность прогнозирования до начала экспериментальной проверки.

**Ключевые слова:** мультиэпитопные вакцины, иммуноинформатика, эпитопы, молекулярный докинг, структурное моделирование, дизайн *in silico*.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (Приоритет 2030).

Разработка мультиэпитопных вакцин признана перспективной стратегией создания безопасных средств профилактики инфекционных заболеваний. Уникальный потенциал мультиэпитопных вакцинных конструкций обусловлен возможностью объединять в единой химерной конструкции множественные иммунодоминантные эпитопы, обеспечивая активацию как гуморального, так и клеточного иммунитета [17]. Ключевым этапом дизайна мультиэпитопных вакцинных конструкций является анализ *in silico*, позволяющий отбирать оптимальные эпитопы, проектировать стабильные конструкции и прогнозировать их взаимодействие с иммунной системой [2].

У вирусных патогенов в качестве мишеней для иммунной системы, как правило, выступают поверхностные белки, обеспечивающие связывание с клеточными рецепторами. Эффективность иммунного ответа на мультиэпитопные вакцины напрямую зависит от правильного выбора эпитопов по следующим ключевым критериям [2; 3]:

1) иммуногенность. Т-клеточные эпитопы должны стимулировать цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты и/или CD4<sup>+</sup> Т-хелперы. Для их предсказания применяется раздел NetMHCpan, входящий в IEDB Analysis Resource [18]. В-клеточные эпитопы, которые дифференцируются на линейные и конформационные, обеспечивают продукцию антител; линейные эпитопы предсказываются с помощью инструментов ABCpred и VeriPred-2.0, а конформационные – с помощью ElliPro и DiscoTope [2];

2) консервативность. Отбор высококонсервативных вирусных эпитопов повышает вероятность перекрёстной защиты между близкородственными патогенами. Анализ проводится методом множественного выравнивания последовательностей, например, с помощью программы MEGA X [7], и с использованием баз данных аминокислотных последовательностей геномов [12; 14];

3) безопасность. Эпитопы должны обладать минимальным аллергенным и токсическим потенциалом. Для оценки применяются инструменты ToxinPred и AllerTop, а также проводится анализ гомологии с белками хозяина для снижения риска аутоиммунных реакций [2];

4) поверхностная доступность. Эпитоп должен быть доступен для взаимодействия с иммунной системой. Для оценки применяются методы трёхмерного моделирования (AlphaFold2, I-TASSER, PEP-FOLD3.0), анализ RSA (NetSurfP-3.0, порог RSA > 0,25) и расчёт доступных сайтов (CASTp) [5; 9; 16; 18];

5) популяционное покрытие. При отборе эпитопов необходимо учитывать их способность связываться с широким спектром аллелей главного комплекса гистосовместимости (МНС) I и II классов. Для расчёта популяционного охвата используется инструмент IEDB Population Coverage [1; 18];

6) релевантность и перекрёстная реактивность. Предпочтение отдаётся эпитопам, локализованным в функционально значимых участках вирусных белков, отвечающих за рецепторное связывание, мембранное слияние. Перекрёстная реактивность оценивается с помощью IEDB Epitope Cluster Analysis и филогенетического анализа (MEGA X, IQ-TREE), что особенно важно для ортохантавирусов, коронавирусов и филовирусов [7; 18].

После отбора эпитопов следующим этапом является их рациональная организация в единую химерную конструкцию. Ключевую роль при этом играет выбор линкерных последовательностей – коротких аминокислотных мотивов, разделяющих эпитопы и структурные домены. Выбор линкеров определяет пространственную организацию, стабильность, эффективность антигенного процессинга и иммуногенные свойства белка [3; 9].

Гибкие линкеры (GGGGS, GP GPG, GGS, GSGSGS) обеспечивают конформационную подвижность эпитопов, повышают растворимость конструкции и снижают вероятность агрегации. Применяются преимущественно для разделения конформационно чувствительных В-клеточных и коротких Т-клеточных эпитопов [1].

Жёсткие линкеры (EAAAK, PAPAP) формируют стабильные  $\alpha$ -спиральные структуры, фиксируют пространственное расположение доменов и снижают нежелательные межэпитопные взаимодействия. Используются для разделения крупных функциональных модулей, включая адьювантные домены [1, 3].

Расщепляемые линкеры (AAY, KK, RVRR) содержат мотивы, распознаваемые протеасомами, что обеспечивает корректный протеолитический процессинг и снижает вероятность формирования нежелательных нефункциональных эпитопов. Применяются между CD8<sup>+</sup> Т-клеточными эпитопами для оптимизации презентации через молекулы МНС I класса [3].

Короткие пептидные эпитопы нередко обладают ограниченной иммуногенностью вследствие низкой способности активировать врождённый иммунитет. В связи с этим в состав мультиэпитопных вакцинных конструкций часто включают адьювантные молекулы, усиливающие активацию антиген-презентирующих клеток и формирование адаптивного иммунного ответа. Адьюванты, как правило, интегрируются на N-конце конструкции с использованием жёстких линкеров EAAAK [3]. Наиболее широко в качестве адьювантов используются агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR). Агонисты TLR3, TLR7/8 и TLR9 имитируют вирусные нуклеиновые кислоты, активируя интерфероновый ответ и усиливая противовирусный иммунитет, что особенно актуально для разработки вакцин против РНК-вирусов [3; 12]. Например,  $\beta$ -дефензин человека взаимодействует с TLR1, TLR2 и TLR4, индуцируя продукцию провоспалительных цитокинов и активацию дендритных клеток [3]. Другой адьювант флагеллин, агонист TLR5, активирует NF- $\kappa$ B-зависимые сигнальные пути, стимулирует созревание дендритных клеток и продукцию IL-6, TNF- $\alpha$  [3], а белки теплового шока (HSP70, HSP90) повышают эффективность захвата антигенов, усиливают кросс-презентацию и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов [3]. Кроме того, иногда используется синтетический пептидный адьювант PADRE (Pan HLA-DR-binding epitope) – универсальный Т-хелперный эпитоп, связывающийся с широким спектром HLA-DR-аллелей, – который позволяет преодолевать ограничения HLA-полиморфизма и повышать популяционный охват [12].

После сборки аминокислотной последовательности вакцины, моделирование её трёхмерной структуры осуществляется с помощью инструментов AlphaFold2, I-TASSER или trRosetta. Полученные модели визуализируются с

помощью программ PyMOL или UCSF Chimera для анализа пространственной ориентации эпитопов [4; 5; 12].

Для оценки стереохимического качества модели используется карта Рамачандрана (PROCHECK), по критериям которой качественная модель характеризуется наличием более 90% остатков в разрешённых областях. Энергетическая стабильность структуры (Z-оценка) оценивается с помощью инструмента ProSA-web, а ERRAT применяется для выявления аномалий межатомных взаимодействий (приемлемый показатель качества – выше 80–90%) [11; 12]. Расчёт относительной доступности растворителю (RSA) с помощью инструмента NetSurfP-3.0 позволяет оценить поверхностную экспозицию ключевых эпитопов [6], а конформационная гибкость белка анализируется с помощью CABS-flex 2.0 [8].

Проводимый на следующем этапе молекулярный докинг позволяет оценить способность вакцинной конструкции взаимодействовать с иммунными рецепторами (например, рецепторами из рода TLR) и прогнозировать аффинность и стабильность этих взаимодействий до начала экспериментальной валидации [13]. Необходимая для этого подготовка структур антигена и рецептора включает удаление воды, ионов и лигандов с помощью UCSF Chimera. Для молекул TLR4, TLR7/8 формируются координаты GridBox, ограничивающие область поиска [13]. Применяются два основных подхода: жёсткий докинг (фиксированные структуры) и гибкий докинг (учёт подвижности боковых цепей – AutoDockFR, Schrödinger Glide-Flex), который более точно описывает взаимодействия пептид-TLR [14].

Для подтверждения стабильности комплексов вакцинная конструкция -рецептор применяется молекулярно-динамическое моделирование (инструменты GROMACS, NAMD, AMBER). Данный подход является стандартом при исследовании вакцинных конструкций против норовируса, SARS-CoV-2 и вируса Денге [10, 13, 15]. Моделирование иммунного ответа позволяет прогнозировать эффективность вакцинной конструкции до начала экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Наиболее широко применяются инструменты C-ImmSim и UISS [16].

C-ImmSim моделирует молекулярные процессы адаптивного и врождённого иммунитета: динамику антител (IgM, IgG1/IgG2), дифференцировку плазматических клеток, активацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, продукцию цитокинов. Применение C-ImmSim для мультиэпитопных конструкций показано в работах по коронавирусам и другим вирусным патогенам [17].

UISS представляет собой платформу, моделирующую как врождённый (TLR-сигнальные пути, активность макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток), так и адаптивный иммунитет (клональная экспансия Т- и В-клеток, продукция цитокинов). Платформа применяется для прогнозирования схем вакцинации, эффективности Т-клеточного ответа, риска гиперцитокинемии и популяционного охвата [16; 18].

Таким образом, комплексный подход *in silico* к дизайну мультиэпитопных вакцин включает последовательные этапы: идентификацию антигенов и отбор эпитопов по критериям иммуногенности, консервативности, безопасности и популяционного покрытия; сборку конструкции с использованием линкеров и адъювантов; структурное моделирование и валидацию; молекулярный докинг и симуляцию иммунного ответа. Интеграция иммуноинформатических методов, молекулярного моделирования и биоинформатических платформ позволяет существенно ускорить разработку вакцинных кандидатов и повысить точность прогнозирования иммунного ответа, снижая ресурсные затраты до начала экспериментальной проверки.

### ***References***

1. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein / R. Arai, H. Ueda, A. Kitayama [et al.] // Protein Engineering. – 2001. – Vol. 14, No. 8. – P. 529–532. EDN: IVXQCJ

2. Design, Development and Immunogenicity Study of a Multi-Epitope Vaccine Prototype Against SARS-CoV-2 / M. Atanasova, I. Dimitrov, N. Ralchev [et al.] // Pharmaceuticals. – 2024. – Vol. 17, No. 11. – P. 1498. <https://doi.org/10.3390/ph17111498>. EDN: NMDMBE

3. Chen X. Fusion protein linkers: property, design and functionality / X. Chen, J.L. Zaro, W.C. Shen // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Vol. 65, No. 10. – P. 1357–1369.

4. DeLano W. L. PyMOL User's Guide / W. L. DeLano. – San Francisco: DeLano Scientific LLC, 2004.

5. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 596, No. 7873. – P. 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>. EDN: GEXUCN

6. NetSurfP-2.0: Improved prediction of protein structural features by integrated deep learning / M.S. Klausen, M.C. Jespersen, H. Nielsen [et al.] // *Proteins*. – 2019. – V. 87, No. 6. – P. 520–527.

7. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – Vol. 35, No. 6. – P. 1547–1549.

8. CABS-flex 2.0: a web server for fast simulations of flexibility of protein structures / A. Kuriata, A. M. Gierut, T. Oleniecki [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2018. – Vol. 46, W1. – P. W338-W343.

9. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex / A. Lamiable, P. Thévenet, J. Rey [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2016. – Vol. 44, W1. – P. W449-W454.

10. Mohammadipour, S. Designing a multi-epitope universal vaccine for concurrent infections of SARS-CoV-2 and influenza viruses using an immunoinformatics approach / S. Mohammadipour, H. Tavakkoli, S.N. Fatemi [et al.] // *BMC Inf. Dis.* – 2025. – Vol. 25. – P. 688. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11066-3>. EDN: XNCIFS

11. Ong Y.C. An Immunoinformatic Approach for Identifying and Designing Conserved Multi-Epitope Vaccines for Coronaviruses / Y.C. Ong, B.A. Tejo, W. B. Yap // *Biomedicines*. – 2024. – V. 12, No. 11. – P. 2530. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12112530>. EDN: VZOZEH

12. Integrated in-silico design and in vivo validation of multi-epitope vaccines for norovirus / J. Qiu, Y. Wei, J. Shu [et al.] // *Virol. J.* – 2025. – Vol. 22. – P. 166.

- 
13. Rapin N. Immune system simulation online / N. Rapin, O. Lund, F. Castiglione // *Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 27, No. 14. – P. 2013–2014.
14. Rehman Z. Sculpting multi-epitope vaccine against Monkeypox viral strains using immunoinformatics / Z. Rehman, A. Fahim, M. Irtash // *Acta Virologica*. – 2025. – Vol. 68. – P. 13542. <https://doi.org/10.3389/av.2024.13542>. EDN: NSUDWD
15. Designing a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach / A. Samad, F. Ahammad, Z. Nain [et al.] // *J. Biomol. Struct. Dynamics*. – 2022. – Vol. 40, No. 1. – P. 14–30. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1792347>. EDN: OZZRRH
16. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins / W. Tian, C. Chen, X. Lei [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2018. – V. 46, W1. – P. W363-W367.
17. Villanueva-Flores F. AI-driven epitope prediction: a systematic review, comparative analysis, and practical guide for vaccine development / F. Villanueva-Flores, J. I. Sanchez-Villamil, I. Garcia-Atutxa // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 10. – P. 207.
18. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update / R. Vita, S. Mahajan, J. A. Overton [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2019. – V. 47, D1. – P. D339-D343.