

Original Article

In silico Design and Immunoinformatic Evaluation of a Chimeric mRNA Vaccine Candidate against Ebola Virus

Amir Rezaei^{1,2} , Hossein Samiei-Abianeh^{3,4} , Seyed Akbar Arianzad⁵ , Gholamreza Olad⁶ , Jafar Salimian^{7*} 

1. Ph.D. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
2. Instructor, Department of Convergent Technologies, Faculty of Advanced Materials and Nanotechnology, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3. Ph.D. Student, Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Instructor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
5. Ph.D., Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
6. Ph.D., Nanotechnology Research Center, Research Institute for Pharmaceutical Sciences and Health Technologies, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7. Professor, Applied Virology Research Center, Research Institute for Biomedical Technologies, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Article history:

Received: June 3, 2025

Revised: November 4, 2025

Accepted: December 16, 2025

e-Published: September 06, 2026



***Corresponding author:** Jafar Salimian, Applied Virology Research Center, Research Institute for Biomedical Technologies, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: jafar.salimian@gmail.com

Background and Aim: Several Ebola outbreaks have been recorded worldwide, with most occurring in Central Africa. Given the 50-90% mortality rate among infected individuals and the lack of a specific treatment, there is an urgent need for an effective vaccine to control this disease. In this study, we focus on designing an mRNA vaccine, conducting bioinformatics analyses, predicting structural features, and evaluating the immunological response of a chimeric protein.

Materials and Methods: The Ebola virus genome encodes various proteins. Given the functional and protective roles of the glycoprotein (GP) and nucleoprotein (NP), they were used to design a chimeric immunogen, whereas other studies have primarily focused on GP alone. In this study, the conservation of protein and nucleotide sequences was evaluated across different species. Additionally, the allergenicity, antigenicity, toxicity, and physicochemical properties of a recombinant fusion protein resulting from the fusion of these two proteins were analyzed using bioinformatics, and its secondary structure was predicted. Linear and conformational epitopes for B cells, MHC-I, MHC-II, and TCD4 cells were identified using immunoinformatics approaches, and the immune response in a mammalian host was simulated. An mRNA vaccine construct corresponding to the Recombinant Fusion protein was designed, its secondary structure was analyzed, and its sequence was optimized.

Results: The designed recombinant fusion protein is an immunogenic molecule with suitable physicochemical properties and secondary structure and exhibits no allergenicity or toxicity. With its multiple epitopes, it can effectively stimulate both humoral and cellular immune responses in the host for at least one month. The designed mRNA vaccine is stable, has a high transcription rate, and, due to the inclusion of the NP protein alongside GP, can be used against various viral strains.

Conclusion: Considering the capabilities and advantages of fourth-generation vaccines, the designed mRNA chimera vaccine could be a promising candidate for laboratory studies targeting the Ebola virus.

Keywords: Ebola Virus, Immunoinformatics, mRNA Vaccine, Recombinant Fusion Protein

Please cite this article as follows: Rezaei A, Samiei-Abianeh H, Arianzad SA, Olad Gh, Salimian J. In silico Design and Immunoinformatic Evaluation of a Chimeric mRNA Vaccine Candidate against Ebola Virus. SJKUMS. 2026;31(3):191-203

طراحی و ارزیابی درون سیلیکویی یک واکسن mRNA کایمریک علیه ویروس ابولا

امیر رضایی^۱، حسین سمیعی ابیانه^۲، سیداکبر آریان زاد^۳، غلامرضا اولاد^۴، جعفر سلیمیان^{۵*}

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران
۲. مربی، گروه فناوری‌های همگرا، دانشکده مواد پیشرفته و نانوفناوری، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌فناوری و نانوفناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران
۵. دکترای تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۶. دکترای تخصصی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، پژوهشکده علوم دارویی و فناوری‌های سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
۷. استاد، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: موارد متعددی از شیوع ابولا در جهان ثبت شده که بیشتر آن‌ها برای آفریقای مرکزی بوده است. با توجه به مرگ‌ومیر ۵۰ تا ۹۰ درصدی مبتلایان و نبود داروی اختصاصی برای بیماری، نیاز مبرم به واکسن کارآمد برای کنترل این بیماری وجود دارد. در این مطالعه، به طراحی واکسن mRNA، بررسی بیوانفورماتیک، پیش‌بینی ساختار و بررسی پاسخ‌های ایمنولوژی نوعی پروتئین کایمر پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها: ژنوم ویروس ابولا پروتئین‌های مختلفی را کد می‌کند. با توجه به نقش عملکردی و حفاظتی گلیکوپروتئین (GP) و نوکلئوپروتئین (NP) از آن‌ها برای طراحی ایمونوژن کایمر استفاده شد، در صورتی که مطالعات دیگر صرفاً بر GP تأکید کرده‌اند. حفاظت‌شدگی توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی در گونه‌های مختلف بررسی شد. همچنین، آلرژی‌سیسته، آنتی‌ژنیسیسته، سمیت و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین کایمر حاصل از تلفیق این دو پروتئین تحت مطالعات بیوانفورماتیک قرار گرفت و ساختار دوم پروتئین کایمر پیش‌بینی شد. اپی‌توپ‌های خطی و فضایی سلول B، MHC-I، MHC-II و TCD4 cell با مطالعات ایمونوآفورماتیک مشخص و پاسخ ایمنی در میزبان پستاندار شبیه‌سازی شد. سازه واکسن mRNA متناسب با پروتئین کایمر طراحی، ساختار دوم آن بررسی و توالی آن بهینه‌سازی شد.

یافته‌ها: پروتئین کایمر طراحی‌شده نوعی مولکول ایمونوژن با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و ساختار دوبعدی مناسب است و آلرژن و سمی نیست و با داشتن اپی‌توپ‌های متعدد می‌تواند سیستم ایمنی هومورال و سلولی میزبان را حداقل به مدت یک ماه به‌طور مؤثر تحریک کند. واکسن mRNA طراحی‌شده پایدار است، نرخ رونویسی بالا دارد و به‌دلیل وجود پروتئین NP در کنار GP، می‌تواند علیه بسیاری از سویه‌ها استفاده شود.

نتیجه‌گیری: واکسن mRNA کایمر طراحی‌شده در محیط کامپیوتری مناسب و مؤثر است و می‌تواند کاندیدای مناسبی برای مطالعات پیش‌بالین علیه ویروس ابولا باشد.

واژگان کلیدی: ابولا، ایمونوآفورماتیک، پروتئین کایمر، واکسن mRNA

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۱۳

ویرایش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۳

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۵

انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۱۵

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی کردستان محفوظ است.

*نویسنده مسئول: جعفر سلیمیان، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

ایمیل: jafar.salimian@gmail.com

استناد: رضایی، امیر؛ سمیعی ابیانه، حسین؛ آریان زاد، سیداکبر؛ اولاد، غلامرضا؛ سلیمیان، جعفر. طراحی و ارزیابی درون سیلیکویی یک واکسن mRNA کایمریک علیه ویروس ابولا. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، بهار ۱۴۰۵؛ ۳۱(۳): ۱۹۱-۲۰۳.

مقدمه

تشکیل می‌دهد. جنس ابولاویروس شامل پنج گونه مختلف است: بوندیویگیو (BDBV)، رستون (RESTV)، سودان (SUDV)،

جنس ابولاویروس یکی از اعضای خانواده فیلوویریده است که همراه با جنس ماربورویروس و سروپورویروس، این خانواده را

کوشش‌های متعددی در زمینه پیش‌بالین و کارآزمایی بالینی در حال اجراست. در اکثر مطالعات، پروتئین GP، با توجه به نقش عملکردی خود، برای طراحی ایمونوژن کاندیدای واکسن به‌تنهایی استفاده شده است [۱۰]، اما در مطالعه حاضر، با توجه به اینکه پروتئین NP نیز می‌تواند به‌عنوان کاندیدای واکسن نقش حفاظتی داشته باشد [۱۱، ۱۲]، از این پروتئین نیز در طراحی واکسن استفاده شد. با توجه به نقش واکسن‌های کایمر در افزایش ایمنی‌زایی و حفاظت گسترده‌تر در برابر سویه‌های مختلف، به نظر می‌رسد طراحی واکسن کایمر با استفاده از این دو پروتئین بر پایه پلتفرم mRNA بتواند راهگشا باشد. از طرفی، اکثر واکسن‌های معرفی‌شده علیه ویروس ابولا بر پایه پلتفرم‌های ادنوویروس، ویروس ضعیف‌شده و DNA است و تحقیقات کمی برای توسعه واکسن mRNA صورت گرفته است [۹]. لذا، هدف این تحقیق، مطالعه‌ای ایمونوآنتی‌ژناتیک و طراحی یک واکسن کایمر متشکل از پروتئین‌های GP و NP بر پایه پلتفرم mRNA است.

روش کار

انتخاب آنتی ژن هدف

در میان پنج زیرگونه ویروس ابولا، سویه ژئیر (EBOV-Z) بیشترین میزان شیوع و مرگ‌ومیر را داشته است [۱۳]. ازجمله شیوع‌های این سویه سال ۱۹۷۶ در منطقه ماینگا بود که ۲۸۰ کشته با ۸۸ درصد مرگ‌ومیر گزارش شده است [۱۴]. لذا، توالی سویه نام‌برده از پایگاه داده NCBI استخراج شد. با مرور منابع و مطالعه نقش هر کدام از پروتئین‌ها در بیماری‌زایی و حیات ویروس، پروتئین GP به‌دلیل نقش حیاتی آن در ورود به سلول میزبان و پروتئین NP به‌دلیل توانایی در ایجاد ایمنی سلولی و حفاظت‌شدگی در گونه‌های مختلف برای طراحی پروتئین کایمر انتخاب شدند [۱۵-۱۷].

تأیید توالی‌های حفاظت‌شده

توالی‌های نوکلئوتیدی در سایت NCBI با تمام توالی‌های این پایگاه همگام‌سازی شد (BLAST). همگام‌سازی توالی میزان معتبر بودن توالی را تأیید می‌کند. توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ترجمه‌شده از ژنوم ویروس ابولا سویه ژئیر (EBOV-Z) از سایت NCBI با کد دسترسی NC_002549.1 به فورمت FASTA استخراج شد (جدول ۱).

جنگل تایی (TAFV)، ژئیر (EBOV) و بومبالی (BOMV) [۱-۲]. اولین گونه‌هایی که کشف شدند ویروس ژئیر و سودان بودند که در دو شیوع مختلف در سال ۱۹۷۶ در سودان جنوبی و جمهوری دموکراتیک کنگو مشاهده شدند. تمامی این گونه‌ها، به‌جز گونه رستون، در انسان بیماری ایجاد می‌کنند و گونه‌های سودان و ژئیر بیش‌ترین آسیب و عمده‌ترین علت همه‌گیری‌های بیماری ابولا هستند.

ویروس ابولا نوعی ویروس غلاف‌دار است که ژنوم RNA تک‌ رشته‌ای منفی به طول ۱۹ کیلوباز دارد و پروتئین‌های مختلفی را کد می‌کند. گلیکوپروتئین (GP) واسطه ورود ویروس از طریق اتصال به گیرنده و هم‌جوشی در داخل اندوزوم است [۲، ۴]. ویروس ابولا با اتصال به انواع مولکول‌های اتصال سلولی، ازجمله مولکول‌های نوع لکتین، سلول‌ها را آلوده می‌کند و نهایتاً ویروس با ماکروپینوسیتوز و تا حدی با اندوسیتوز با واسطه کلاترین وارد سلول‌ها می‌شود. پروتئین‌های GP تحت تأثیر کاتپسین‌ها و NPC1 قرار می‌گیرند که به ادغام غشای ویروس با غشای اندوزوم منجر می‌شود و ریبونوکلو پروتئین (RNP) در سیتوپلاسم آزاد می‌شود که به‌دنبال آن، رونویسی و تکثیر ژنوم ویروسی انجام می‌شود. سپس ژنوم‌های ویروسی جدید به‌شکل نوکلئوکپسیدها به سطح سلول منتقل می‌شوند و هم‌زمان با گلیکوپروتئین وارد شده در غشای پلاسمایی، در ذرات ویروسی بسته‌بندی می‌شوند [۵، ۶]. لذا، به نظر می‌رسد پروتئین GP کاندیدای مناسبی برای طراحی واکسن علیه این ویروس باشد. نوکلئوپروتئین (NP) پروتئینی است که ژنوم را محصور می‌کند، از RNA در برابر تخریب محافظت می‌کند و جزء اصلی مجموعه ریبونوکلو پروتئین ویروسی (RNP) است. به نظر می‌رسد این پروتئین، به‌دلیل تحریک قوی پاسخ ایمنی سلولی T و حفاظت زیادش در سویه‌های مختلف ابولا، برای واکسن‌های چند سویه مناسب است [۷، ۸].

با توجه به اینکه شیوع ویروس ابولا به مرگ‌ومیر بین ۵۰ تا ۹۰ درصدی مبتلایان منجر خواهد شد و از طرفی، یک داروی اختصاصی ضد ویروسی برای درمان این بیماری وجود ندارد، برای کنترل بیماری نیاز مبرم به واکسن کارآمد وجود دارد. در حال حاضر، تلاش‌های گسترده‌ای برای ساخت واکسن در جریان است که می‌توان به پلتفرم‌های ذرات شبه ویروس (VLP)، واکسن DNA، واکسن نو ترکیب ویروس کامل و واکسن بر پایه ادنوویروس اشاره کرد [۹]. با این حال، هنوز نیاز به واکسنی که بتواند تمام سروتیپ‌های این ویروس را پوشش دهد احساس می‌شود و

جدول ۱. عدد دسترسی توالی آمینواسیدی ژنوم ویروس دنگی و محدوده آنتی‌ژن‌های انتخاب‌شده در ژنوم ویروس

سروتیپ ویروس	سویه توالی‌یابی‌شده	عدد دسترسی	آنتی‌ژن هدف	ناحیه
Zaire ebolavirus	Yambuku-1976 Mayinga	NP_066243.1	NP	۴۷۰-۲۶۸۹
		NP_066246.1	GP	اتصال ۸۰۶۸-۶۹۲۳ و ۶۰۳۷-۶۹۲۳

بررسی آلرژنیسیته آنتی‌ژن‌های انتخاب‌شده

به‌منظور بررسی آلرژنیسیته و حذف بخش‌های آلرژن، پروتئین‌های کایمر با دو نرم‌افزار AllerTOP v.2.0 و AlgPred بررسی شدند. این نرم‌افزارها آب‌گریز بودن اسید آمینه، اندازه مولکولی، تمایل به شکل‌دهی مارپیچ، فراوانی نسبی اسیدهای آمینه و تمایل به تشکیل رشته β را توصیف کرده‌اند و براساس الگوریتم k-nearest بررسی مشابهت توالی‌ها با ۲۴۲۷ آلرژن شناخته‌شده از گونه‌های مختلف و تقریباً ۲۵۰۰ توالی غیرحساسیت‌زا، پیش‌بینی خود را در قالب احتمال آلرژن بودن یا نبودن پروتئین ارائه می‌دهند [۱۸].

طراحی پروتئین کایمر

استفاده از پروتئین‌های کایمر در مقایسه با واکسن‌های تک ظرفیتی میزان کارایی بالاتری از ایمنی‌زایی از خود نشان داده‌اند [۱۹]. همچنین، در تولید واکسن‌های mRNA، اندازه پروتئینی روی بازده آن، محدودیت چندانی ایجاد نمی‌کند. برای مثال، واکسن mRNA شرکت فایزر، ضد کووید-۱۹، حاوی توالی کامل پروتئین اسپایک ویروس است که وزن مولکولی معادل ۱۸۰ کیلو دالتون دارد. با توجه به مزیت واکسن‌های کایمر، محدودیت‌نداشتن در اندازه واکسن‌های mRNA و نقش‌های متفاوت و مهم هریک از پروتئین‌های انتخابی در مکانیسم بیماری‌زایی، در این مطالعه، کاندیدای واکسن مدنظر به‌صورت کایمر طراحی و به‌عنوان کاندیدای ایمونوژن در مدل دلخواه ارزیابی شده است. پروتئین GP دارای دو زیرواحد GP1 با نقش اتصال به گیرنده سطح سلول و GP2 با نقش ادغام غشای ویروس با غشای سلول است که با توجه به اهمیت بیشتر، بخش GP1 از توالی این پروتئین و تمامی توالی NP انتخاب شد و با لینکر AAKEAAKA، که هم در مقالات مربوط به پروتئین‌های ویروس‌ها استفاده شده است و هم فعالیت زیستی را افزایش می‌دهد [۲۰] به هم متصل شدند و طراحی پروتئین کایمر بدین ترتیب صورت گرفت.

بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین کایمر

از سرور Prot-param در پایگاه ExPASy استفاده شد. در این سرور خواصی از جمله PI نظری، ضریب انقراض، شاخص ناپایداری، وزن مولکولی شاخص آلیفاتیک، ترکیب اسید آمینه و میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) محاسبه شدند. آنتی‌ژنیسیته پروتئین کایمر با Vaxijen v.2.0 با آستانه ویروسی ۰/۴ تخمین زده شد. این سرور براساس ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی پروتئین میزان آنتی‌ژنیسیته را پیشنهاد می‌دهد. برای پیش‌بینی میزان سمیت از سرور ToxinPred استفاده شد. این سرور ۱۸۰۵ پپتید سمی را در پایگاه داده خود ذخیره دارد و با مقایسه توالی پروتئینی با پپتیدهای سمی و میزان هم‌پوشانی با پپتیدهای سمی، سمیت پروتئین را مشخص می‌کند.

پیش‌بینی و اعتبارسنجی ساختارهای دوم و سوم پروتئین
برای پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین از سرورهای GOR4 و PSIPRED استفاده شد. این سرورهای با اتکا بر سرورهای قدرتمند همگام‌سازی جامع و چندتایی، همانند BLAST در پایگاه داده NCBI، ClustalW، Multalin، MPSA و سرورهای پیش‌بینی لیگاندها نظیر DPM و DSSP و سیستم یادگیری ماشینی، ساختارهای ثانویه را در پروتئین‌ها پیش‌بینی می‌کنند [۲۱]. به‌منظور پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین از سرورهای ttrsetta و Robetta استفاده شد که سرورهایی به‌روزرند و از هوش مصنوعی و یادگیری ماشین بهره می‌برند.

بررسی اپی‌توپ‌های خطی و فضایی سلول B

بخشی از آنتی‌ژن که ایمونوگلوبولین یا آنتی‌بادی‌ها به آن متصل می‌شوند، اپی‌توپ سلول B نام دارد. پروتئین کایمر به چهار نرم‌افزار IEDB، BepiPred، BCEpred و ABC-pred ارائه شد. اپی‌توپ‌هایی که سه یا چهار سرور به‌صورت مشترک تأیید کردند، به‌عنوان مهم‌ترین اپی‌توپ‌های خطی در نظر گرفته شدند و در جدول ۳ معرفی شدند. ارزیابی آنتی‌ژنیسیته، حساسیت‌زایی و سمی بودن روی آن‌ها صورت گرفت. سرور IEDB چندین روش پیش‌بینی را ارائه می‌کند و به‌صورت گرافیکی، موقعیت اپی‌توپ‌های سلول B را برای توالی پروتئین نشان می‌دهد. سرور BepiPred، با ترکیب نوعی مدل پنهان مارکوف و روش مقیاس تمایل، مکان اپی‌توپ‌های سلول B خطی را پیش‌بینی می‌کند. سرور ABC-pred، اپی‌توپ‌های ۱۶ آمینواسیدی را پیش‌بینی و در آخر، سرور BCEpred، اپی‌توپ‌های سلول B را براساس ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اسیدهای آمینه پیش‌بینی می‌کند.

اپی‌توپ‌های فضایی را سرور CBtope ارزیابی کرد. این سرور از روش مبتنی بر SVM با استفاده از ترکیب اسید آمینه تولیدشده از دنباله (های) توالی استفاده می‌کند. در نهایت، اپی‌توپ‌های فضایی هم‌مکان با اپی‌توپ‌های خطی به‌عنوان اپی‌توپ‌های مؤثر انتخاب شدند و سپس آلرژنیسیته و سمیت آن‌ها نیز بررسی و در جدول ۴ گزارش شد.

بررسی اپی‌توپ‌های MHC-I و MHC-II و TCD4 Cell

با استفاده از سرور IEDB، اپی‌توپ‌های MHC-I و MHC-II پیش‌بینی شد. سرور IEDB به‌طور پیش‌فرض متد سرور NetMHCpan را برای ارزیابی انتخاب می‌کند. در این سرور، اتصال پپتیدها به مولکول MHC، با استفاده از شبکه‌های عصبی مصنوعی (Artificial Neural Networks) پیش‌بینی می‌شود. سرور IEDB پیش‌بینی اتصال اپی‌توپ‌ها به CD4T Cell با ترکیب دو روش، بررسی فعالیت‌های سلول T و اتصال به ۷ آلل انسانی MHC،

پیش‌بینی آنتی‌ژنیسته را انجام می‌دهد. در این روش، با انتخاب حداکثر آستانه ۵۰ از ۱۰۰، اپی‌توپ‌ها ارزیابی و در نهایت، اپی‌توپ‌های مرتبط با آل‌های غالب و دارای امتیاز بالا انتخاب شدند.

شبیہ سازی یا سخ ایمنی یروئتین کایمر

پیش‌بینی سطوح و موارد ایمنی‌زایی آنتی‌ژن مورد مطالعه یکی از روش‌های مؤثر و کارآمد در طراحی دارو و واکسن‌هاست. C- ImmSim نوعی ابزار محاسباتی است که برای شبیه‌سازی پاسخ سیستم ایمنی پستانداران به آنتی‌ژن‌ها طراحی شده است. این نرم‌افزار مدل Celada-Seiden را پیاده‌سازی می‌کند. این مدل پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی را توصیف می‌کند. به همین منظور، شبیه‌سازی ایمنی برای پروتئین کایمر در بازه زمانی شصت‌روزه و دوبار تزریق به فاصله دو هفته صورت گرفت.

انتخاب آنتی ژن هدف

mRNA طراحی، سازه و اکسپن

توالی نوکلئوتیدی پروتئین‌های GP و NP با مراجعه به سایت NCBI دریافت شد، سپس توالی DNA را به توالی mRNA تبدیل و برای طراحی نهایی سازهٔ واکسن mRNA، کلاهِک (7mGpppN) به سازه افزوده شد، کلاهِک ۵' mRNA از تخریب نوکلئولیتیک محافظت و ترجمه را با جذب کمپلکس ریبوزومی تسهیل می‌کند. 5'UTR و 3'UTR بتاگلوبین انسانی در ابتدا و انتهای سازه قرار داده شد که ۵' UTR ترجمه وابسته به کلاهِک را پهنه‌سازی می‌کند و 3' UTR پایداری mRNA و بیان پروتئین را افزایش می‌دهد [۲۲]. حدود ۱۲۰ نوکلئوتید آدنین به انتهای سازه افزوده شد که به پایداری سازه و بیان بیشتر پروتئین منجر خواهد شد [۲۳].

بررسی ساختار دوم mRNA

صحت توالی آمینواسیدی انتخاب‌شده پروتئین‌های GP و NP در پایگاه داده BLAST Ref-Seq انجام شد (شکل ۱). برای به‌دست‌آوردن ناحیه حفاظت‌شده در هر آنتی ژن، سروتیپ‌های *سودان* (S)، *جنگل‌های تایی* (T)، *بوندیبوگیو* (B)، *رستون* (R) و *سویه* (E) با یکدیگر هم‌تراز شدند (شکل ۱ فایل پیوست). نتایج نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی بیشتری در پروتئین NP در مقایسه با GP در سروتیپ‌های مختلف ویروس ابولا بود (شکل ۲). این قسمت شامل توالی‌های ۱۳۰ تا ۴۲۰ در ابتدا و اواسط پروتئین است.

ساختار ثانویه mRNA و دیگر پارامترهای مختلف سازه

[illegible]

شکل ۱. بررسی حفاظت‌شدگی پروتئین‌های NP و GP در گونه‌های مختلف

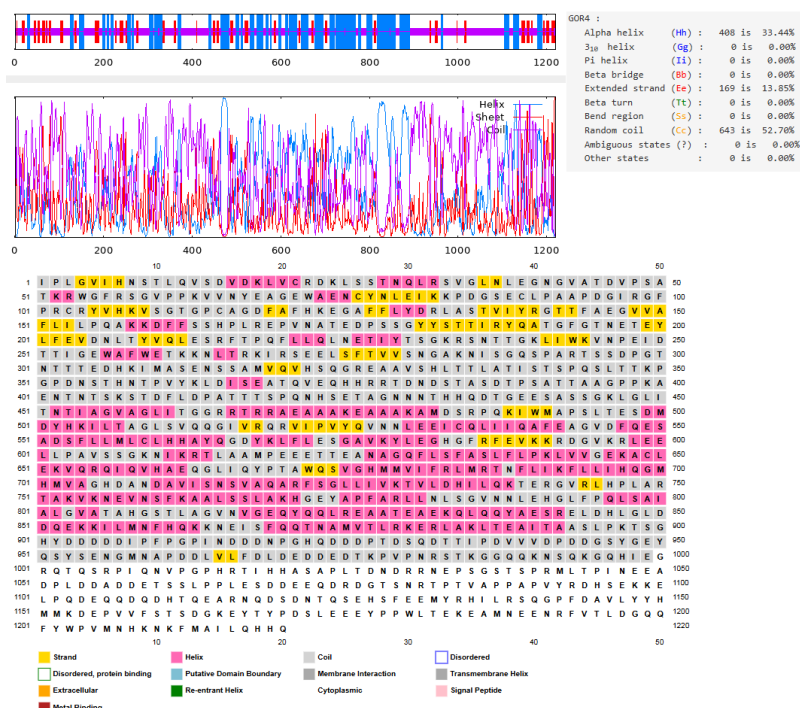
ATEDPS	GP1	173	0.97	Negative	Negative
TGFGTNE	GP1	191	0.89	Negative	Negative
TIYTSGKRSNTT	GP1	227	0.94	Negative	Negative
SGQSPARTSSDPG	GP1	287	0.98	Negative	Negative
KIMASENSSAMVQVHSQGR	GP1	308	0.95	Negative	Negative
TSPQSLTTKPGPDN	GP1	341	1.01	Negative	Negative
QHHRRTDNDSTA	GP1	374	0.9	Negative	Negative
PKAENTNTSKSTDF	GP1	398	0.99	Negative	Negative
TTSP	GP1	417	0.98	Negative	Negative
KAMDSR	NP	480	0.98	Negative	Negative
PEEET	NP	619	0.91	Negative	Negative
DPTDSQD TTIP	NP	926	0.94	Negative	Negative
GQHIEGRQTQS	NP	995	0.96	Negative	Negative
APLTDNDRRNEPSGSTS	NP	1023	0.89	Negative	Negative
DDADDETS	NP	1054	0.95	Negative	Negative
ESDDEEQDRDGTSNRT	NP	1067	0.91	Negative	Negative
TQEARNQSDSN	NP	1112	0.9	Negative	Negative
VVFSTSDG	NP	1157	0.95	Negative	Negative

اپی‌توپ‌های خطی مورد تأیید چهار نرم‌افزار پیش‌بینی‌کننده اپی‌توپ در جدول ۳ گزارش شد. تعداد ۱۹ اپی‌توپ شناسایی شد. همچنین، نمودارهای اپی‌توپ‌های خطی و آنتی‌ژنیسیته دریافت‌شده از سرور IEDB در شکل ۴ گزارش شده است. ارزیابی‌ها نشان داد که این اپی‌توپ‌ها آنتی‌ژنیسیته مناسبی (به‌طور میانگین ۰/۹) دارند و فاقد آلرژنیسیته و سمیت هستند. نتایج نشان داد پراکندگی اپی‌توپ‌ها در میان دو پروتئین توزیع تقریباً برابری دارند. اپی‌توپ‌های فضایی هم‌مکان با اپی‌توپ‌های خطی در جدول ۴ گزارش شد. ارزیابی‌ها نشان داد که این اپی‌توپ‌ها فاقد آلرژنیسیته و سمیت‌اند و توزیع اپی‌توپ‌های فضایی در پروتئین NP بیشتر از پروتئین GP1 است.

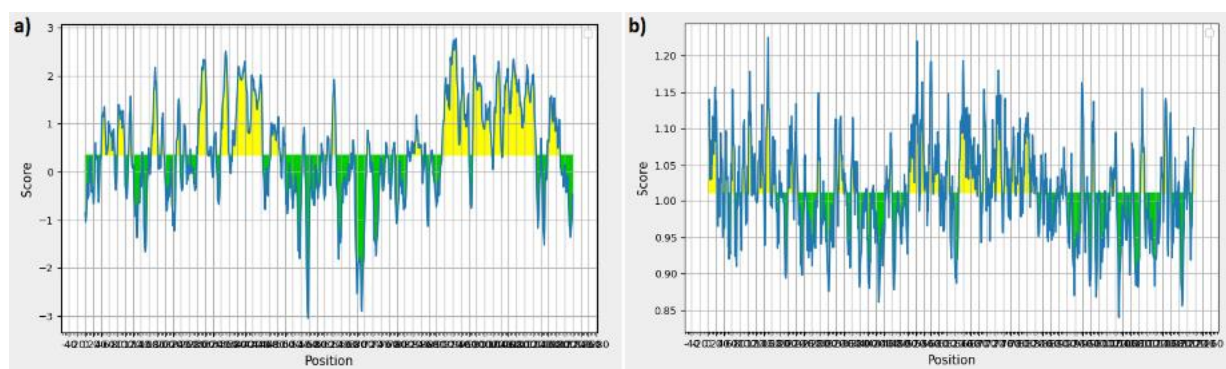
پیش‌بینی و اعتبارسنجی ساختارهای دوم و سوم پروتئین

نتایج بررسی ساختار دوم نشان داد که ساختارهای آلفا هلیکس (۳۳/۴۴ درصد)، رشته توسعه‌یافته (۱۳/۸۵ درصد) و رندوم کوئل (۵۲/۷۰ درصد) درصد مناسبی از ساختار پروتئین کایمر را تشکیل می‌دهند (شکل ۳). سرورهای Robetta و trrosetta به دلیل کامل‌نبودن ساختارهای این پروتئین‌ها در پایگاه داده‌ها، قادر به شکل‌دهی مناسب این پروتئین نبودند و سرور I-TASSER نیز شکل مناسبی ارائه نداد. لذا به دلیل نداشتن ساختار سوم پروتئین، ترسیم نمودارهای رامچاندوران و prosa امکان‌پذیر نبود.

بررسی اپی‌توپ‌های خطی و فضایی سلول B



شکل ۳. نمایش گرافیکی و ساختار ثانویه پروتئین کایمر (ارزیابی ساختار ثانویه با سرور GOR4 نشان داد که ساختار شامل ۳۳/۴۴ درصد آلفاهلیکس، ۱۳/۸۵ درصد رشته توسعه یافته و ۵۲/۷۰ درصد رندوم کوئل است).



شکل ۴. (a) نمودار اپی توپ‌های خطی پروتئین کایمر؛ (b) نمودار آنتی‌ژنیسته پروتئین کایمر

جدول ۴. مهم‌ترین اپی توپ‌های فضایی مشترک با اپی توپ‌های خطی

Epitopes	ZONE	Start Position	Allergenicity	Toxicity
QHHRRTDNDS	GP1	374	Negative	Negative
PKAENTNTSK	GP1	398	Negative	Negative
GQHIEGRQTQS	NP	995	Negative	Negative
APLTDNDRRNEPSGSTSPRMLTPINEEA	NP	1023	Negative	Negative
DDADDETSSLPPLESDDDEEQDRD	NP	1054	Negative	Negative
ESDDEEQDRDGTSNRTPTV	NP	1067	Negative	Negative
DSDNTQSEH	NP	1119	Negative	Negative

اپی توپ‌ها نشان داد (جدول‌های ۵ و ۶). اپی توپ‌های ۱۵ آمینواسیدی فعال‌کننده CD4 با امتیاز بالای ۰/۸ برای آل‌های غالب انسانی در ایران با سرور IEDB با حداکثر آستانه ۵۰ پیش‌بینی شد که پروتئین NP توزیع بهتری در اپی توپ‌ها نشان داد (جدول ۷).

بررسی اپی توپ‌های MHC-I و MHC-II و TCD4 Cell

اپی توپ‌های فعال‌کننده MHC-I و MHC-II با امتیاز بالای ۰/۸ برای آل‌های غالب انسانی در ایران با سرور IEDB برای پروتئین کایمر پیش‌بینی شد که پروتئین NP توزیع بهتری در

جدول ۵. اپی توپ‌های MHC-I

Epitopes	Alleles	zone	Start	End	Peptide score
FLYDRLASTV	HLA-A*02:03	GP1	128	137	0.973
GLFPQLSAI	HLA-A*02:03	NP	792	800	0.968
RLEELLPAV	HLA-A*02:01	NP	597	605	0.943
KLTEAITAA	HLA-A*02:03	NP	885	893	0.842
YQVNNLEEI	HLA-A*02:06	NP	525	533	0.814
FLLQLNETI	HLA-A*02:01	GP1	220	228	0.8
YPDSLEEEY	HLA-B*35:01	NP	1169	1177	0.992
TVAPPAPVY	HLA-B*35:01	NP	1084	1092	0.963
HAEQGLIQY	HLA-B*35:01	NP	660	668	0.956
GPFDVAVLYY	HLA-B*35:01	NP	1141	1149	0.955
FPQLSAIAL	HLA-B*35:01	NP	794	802	0.939
MASENSSAM	HLA-B*35:01	GP1	310	318	0.938

جدول ۶. اپی توپ‌های MHC-II

Epitopes	Alleles	zone	Start	End	Peptide score
ASENSSAMVQVHSQG	HLA-DQA1*01:02	GP1	311	325	0.85
LGVIHNSTLQVSDVD	HLA-DQA1*01:02	GP1	3	17	0.825
HRTIHHASAPLTDND	HLA-DQA1*01:01	NP	1015	1029	0.861
EEMYRHILRSQGPFD	HLA-DRB1*11:01	NP	1130	1144	0.972
GHGFRFEVKKRDGVK	HLA-DRB1*11:01	NP	582	596	0.965

FEEMYRHILRSQGP	HLA-DRB1*11:01	NP	1129	1143	0.953
HGEYAPFARLLNLSG	HLA-DRB1*11:01	NP	771	785	0.897
SSGYYSTTIRYQATG	HLA-DRB1*11:01	GP1	178	192	0.844

جدول ۷. اپی توپ‌های CD4

Peptide	ZONE	Start	End	Immunogenicity Score	Alleles
SVQQGIVRQRVIPVY	NP	511	525	97.0466	
AFFLYDRLASTVIYR	GP1	126	140	95.8534	
FTPQFLQLNETIYT	GP1	216	230	94.1759	
NEVNSFKAALSSSLAK	NP	756	770	93.8981	
AVKYLEGHGFRFEVK	NP	576	590	91.599	HLA-DRB1:03:01
IKFLLIHQGMHVMVAG	NP	691	705	91.5099	HLA-DRB1:07:01
PFARLLNLSGVNNLE	NP	776	790	91.1408	HLA-DRB1:15:01
RGVRLHPLARTAKVK	NP	741	755	90.4833	HLA-DRB3:01:01
MNHKNKFMALQHHQ	NP	1206	1220	90.2989	HLA-DRB3:02:02
GDYKLFLESGAVKYL	NP	566	580	89.313	HLA-DRB4:01:01
ANAGQFLSFASLFLP	NP	626	640	88.7078	HLA-DRB5:01:01
EISFQQTNAMVTLRK	NP	866	880	88.5067	
IPLGVIHNSTLQVSD	GP1	1	15	88.2979	
AGDFAFHKEGAFFLY	GP1	116	130	86.5947	
NLTYYVQLESRFTPQF	GP1	206	220	86.4198	

شبیه‌سازی پاسخ ایمنی پروتئین کایمر

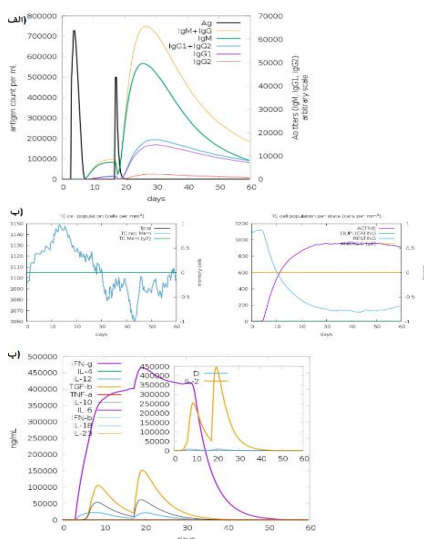
شبیه‌سازی پاسخ ایمنی هومورال و ترشح کلاس‌های آنتی‌بادی علیه پروتئین کایمر در شکل ۵ نشان داده شده‌اند. براساس گزارش‌های نموداری، پروتئین کایمر موجب افزایش تیتراژ آنتی‌بادی‌های مختلف تا سی روز اول شده است که در این میان، آنتی‌بادی‌های IgM و IgG بیشترین افزایش و آنتی‌بادی IgG2 کمترین افزایش را داشتند. براساس نمودار فعال‌شدن سلول‌های T می‌توان دریافت که به احتمال بسیار قوی، پروتئین کایمر توانایی تحریک ایمنی سلولی را نیز دارد، به‌طوری که تزریق آن به فعال‌شدن سریع سلول‌های T منجر شده است و از طرفی، تیتراژ جمعیت سلول‌های T را نیز تا حدی ثابت نگه داشته است. در ادامه نتایج، القای پاسخ ایمنی با پروتئین کایمر به‌خوبی صورت گرفته است که در این میان، INF- γ بیشترین تیتراژ افزایش و IL-12 کمترین تیتراژ افزایش را از خود نشان دادند.

طراحی واکسن mRNA

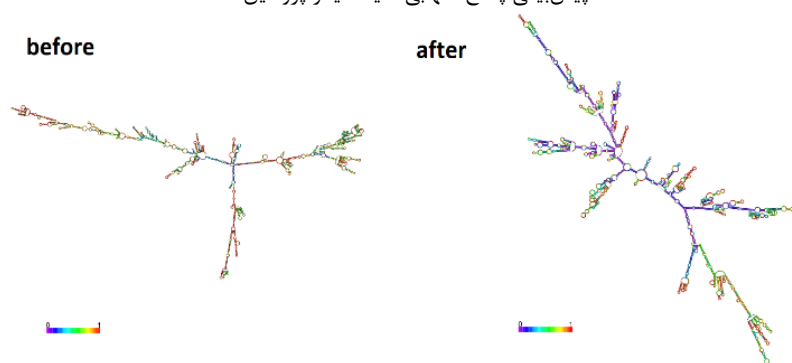
توالی mRNA هر دو پروتئین از نرم‌افزارهای ترجمه معکوس به دست آمده است و سازه mRNA با قراردادن کلاهی (7mGppp)، 5'UTR و 3'UTR توالی بتاگلوبین انسانی در ابتدا و انتهای سازه و توالی دم پلی A در انتهای سازه طراحی شد (جدول ۴ فایل پیوست). توالی‌های اضافه‌شده به سازه، mRNA را از تخریب آنزیمی حفظ می‌کنند و طول عمر و سرعت ترجمه mRNA را بهبود می‌بخشند.

بررسی ساختار دوم mRNA

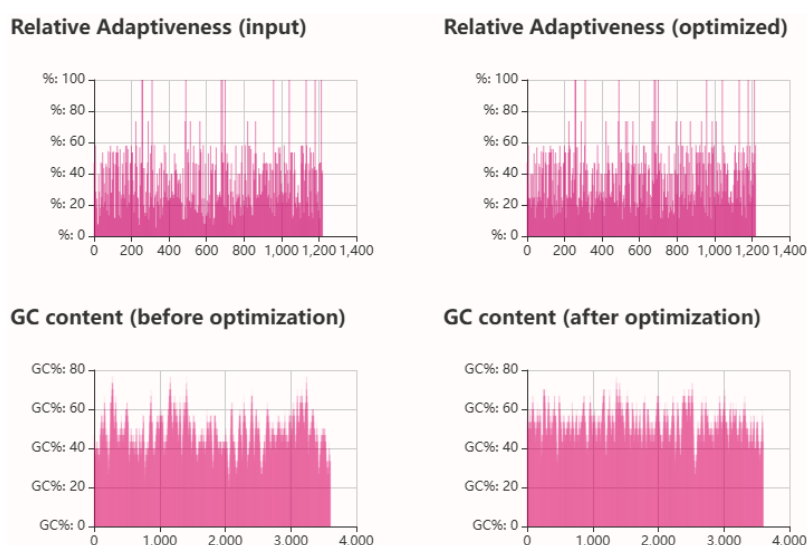
ساختار دوم mRNA ارزیابی شد و از لحاظ میزان حداقل انرژی (نشانه پایداری ساختار) $(-1187/60 \text{ kcal/mol})$ و نداشتن ساختارهای نامناسب ارزیابی شد. همچنین، در ساختار پیش‌بینی‌شده در نقطه شروع ۵' (آغاز ترجمه)، ساختارهای گره ساختگی و یا لوپ‌های بلند، که در شروع ترجمه تأثیر دارند، دیده نمی‌شود (شکل ۶).



شکل ۵. الف. نمودار پیش‌بینی پاسخ ایمنی هومورال علیه کایمر پروتئین؛ ب. نمودارهای پیش‌بینی پاسخ ایمنی سلولی علیه کایمر پروتئین؛ پ. نمودار پیش‌بینی پاسخ التهابی علیه کایمر پروتئین



شکل ۶. ارزیابی ساختار دوم mrna پیش‌بینی‌شده با سرور RNAfold پیش و پس از بهینه‌سازی



شکل ۷. نمودارهای بهینه‌سازی و محتوای GC پروتئین کایمر، پیش و پس از بهینه‌سازی

یکی از راه‌های مؤثر مقابله با بیماری‌های پاندمیک و کشنده، استفاده از واکسن‌هاست، اما طراحی واکسن‌ها زمان‌بر و دشوار است. امروزه، واکسن‌های mRNA توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده‌اند؛ زیرا خطرهای واکسن‌های کشته‌شده یا ضعیف‌شده را ندارند و ایمن‌تر از آن‌ها هستند. همچنین، برخلاف واکسن‌های نوترکیب، نیازی نیست وقت و هزینه زیادی در آزمایشگاه برای تولید پروتئین نوترکیب صرف شود. لذا، طراحی واکسن‌های mRNA مورد استقبال جوامع علمی قرار گرفته است و پیشرفت روزافزونی دارد [۲۶]، به‌گونه‌ای که برای ویروس‌های مختلفی همچون زیکا [۲۷] و سارس [۲۸] و همچنین سرطان‌هایی مانند ملانوما [۲۹] واکسن‌های mRNA طراحی شده است.

یکی از راه‌های موجود برای دست‌یافتن به واکسن مؤثر، به‌کارگیری مطالعات بیوانفورماتیک در طراحی واکسن‌هاست که هم موجب صرفه‌جویی بسیار در زمان و هزینه‌ها شده است و هم می‌تواند عملکرد آنتی‌ژن‌های مختلف پاتوژن را بررسی کند. لذا، ما نیز در ابتدا، پروتئین‌های مختلف ویروس ابولا را بررسی و آنتی‌ژن‌های GP و NP را انتخاب کردیم که در بیماری‌زایی ویروس نقش مهمی

بهینه‌سازی توالی mRNA

پس از بهینه‌سازی، میزان CAI برای پروتئین کایمر از ۰/۷۳ به ۰/۸۲ ارتقا یافت و محتوای GC آن نیز از ۴۸/۰۸ درصد به ۵۲/۷۳ درصد رسید (شکل ۷). توالی‌های قبل و بعد از بهینه‌سازی در جدول‌های ۴ و ۵ فایل پیوست آمده است.

بحث

بیماری ویروس ابولا (EVD) یکی از تهدیدکننده‌ترین بیماری‌های شناخته‌شده برای حیات بشر است. EVD از طریق تماس با حیوانات آلوده، مانند خفاش میوه، یا از طریق انتقال انسان به انسان از طریق مایعات بدن به انسان منتقل می‌شود. این بیماری با علائمی مانند تب، درد عضلانی، استفراغ، اسهال و در موارد شدید، خون‌ریزی داخلی و خارجی ظاهر می‌شود [۲۴]. بدون مداخله به‌موقع، EVD می‌تواند به نارسایی چندعضوی و مرگ منجر شود. همه‌گیری‌ها عمدتاً در آفریقا رخ داده‌اند، با بزرگ‌ترین شیوع ثبت‌شده بین سال‌های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۶ در غرب آفریقا که جان بیش از ۲۸۰۰۰ نفر را گرفت [۲۵].

سلولی نیز نسبتاً مناسب عمل می‌کند. این اثر می‌تواند به دلیل وجود پروتئین NP در سازه کاندیدای کایمر باشد. به نظر می‌رسد این شبیه‌سازی می‌تواند نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی میزبان در مطالعات پیش‌بالین و بالینی باشد.

در مطالعات طراحی واکسن نشان داده شد که توالی‌های بتاگلوبین در مقایسه با آلفا گلوبین و آلبومین موجب رونوشت‌برداری بیشتر mRNA و نیز بیان بیشتر پروتئین می‌شود. لذا، در طراحی این واکسن از 5'UTR و 3'UTR بتاگلوبین انسانی استفاده شد [۳۸]. قرارداد دم پلی A با تعداد مشخص در انتهای واکسن طراحی‌شده در حفاظت mRNA مؤثر است. لذا، یکی از چالش‌های طراحی واکسن mRNA تعیین تعداد آدنین و دستیابی دقیق به این تعداد در آزمایشگاه است. برطبق مطالعات صورت‌گرفته، طراحی و قرارداد دم پلی A در ساختار پلاسمید، در مقایسه با اضافه کردن آدنین با آنزیم در هنگام رونوشت‌برداری، نتایج دقیق‌تر و درست‌تری را در پی دارد [۳۹]. لذا، ما نیز در طراحی واکسن از همان ابتدا دم پلی A با حدود ۱۲۰ نوکلئوتید را لحاظ کردیم که به پایداری و رونویسی بیشتر سازه منجر می‌شود. مطالعه صورت‌گرفته به دلیل وجود محدودیت‌ها، صرفاً اینفورماتیکی است و تأییدات آزمایشگاهی ندارد، ولی می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات و تحقیقات پیش‌بالین و بالینی برای توسعه واکسن علیه ویروس ابولا و مطالعات تخصصی‌تر و گسترده‌تر در رسانش هدفمند این ایمونوژن و استفاده از نانوحامل‌ها باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات صورت‌گرفته در این تحقیق، به نظر می‌رسد سازه پروتئینی و mRNA طراحی‌شده خواص فیزیکی‌شیمیایی مناسب، عدم آلرژی‌زایی و سمیت، پتانسیل آنتی‌ژنیسته بالا و ایمنی‌زایی مناسبی دارند و پتانسیل خوبی برای مطالعات پیش‌بالین دارند. باوجود اینکه این مطالعه به‌صورت *in silico* انجام شده و فاقد تأییدات آزمایشگاهی است، نتایج آن می‌تواند پایه‌ای برای تحقیقات آینده فراهم کند. پیشنهاد می‌شود ارزیابی ایمنی، کارایی و پاسخ ایمنی واقعی در مدل‌های حیوانی و انسانی انجام شود تا پتانسیل این واکسن در پیشگیری از همه‌گیری‌های ابولا تأیید شود. از طرفی، این رویکرد بیوانفورماتیکی می‌تواند الگویی برای طراحی واکسن‌های سریع و ایمن علیه دیگر پاتوژن‌های نوظهور باشد.

تشکر و قدردانی

از عزیزانی که در تهیه این مقاله همکاری کرده‌اند، قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه، با افراد و دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

داشتند. در مطالعات مختلف، آگنولون و همکاران [۳۰]، لینلینگ و همکاران [۳۱] و بهاتیا و همکاران [۳۲] نیز پروتئین GP را به‌عنوان کاندیدای مناسب واکسن ابولا انتخاب کرده‌اند. در مطالعه مایر و همکاران [۳۳]، زو و همکاران [۳۴]، علیزاده و همکاران [۳۵]، رومیرز و همکاران [۳۶] و آگنولون و همکاران [۳۰]، که جزو مطالعات اخیر در طراحی واکسن علیه ابولا بوده‌اند، پروتئین GP به‌تنهایی به‌عنوان کاندید واکسن مورد مطالعه و طراحی قرار گرفت که مؤثر بود، ولی در واکسن مورد مطالعه ما علاوه بر پروتئین GP، پروتئین NP نیز استفاده شده است که به دلیل وجود پروتئین NP، این کاندیدای کایمر می‌تواند ایمنی‌زایی بیشتر ایجاد کند و علیه سویه‌های مختلف ایمنی به وجود آورد.

ایجاد ایمنی در برابر گونه‌های مختلف پاتوژن، مزیتی ویژه برای واکسن محسوب می‌شود. لذا، در مرحله اول، حفاظت‌شدگی پروتئین‌های انتخابی، با مطالعات همگام‌سازی در گونه‌های مختلف ابولا تأیید شد. با مطالعه دقیق‌تر آنتی‌ژن GP، بخش ایمونوژن‌تر و غیرآلرژن آن برای طراحی پروتئین کایمر انتخاب شد که ناحیه ۳۳ تا ۵۰۱ از توالی آمینواسیدی را در بر می‌گیرد و با استفاده از لینکر مناسب (AEAAAKEAAKA) به پروتئین کامل NP متصل شد و واکسن کایمر به‌جای واکسن‌های تک‌واحدی طراحی شد. از ویژگی‌های مهم این واکسن کایمر، توانایی حفاظت‌بخشی علیه سویه‌های مختلف ابولا است. یکی از ضعف‌های مطالعات بیوانفورماتیک کندی به‌روزرسانی اطلاعات ژنومی و پروتئومی پاتوژن نوظهور در پایگاه داده‌هاست که به دلیل ناقص بودن اطلاعات ساختاری پروتئین‌های منتخب در پایگاه داده‌هایی همچون PDB، مطالعات ساختار سوم پروتئین کایمر و ترسیم تصویر آن با مشکل مواجه شد. با تکمیل اطلاعات ساختاری این پایگاه‌های داده در آینده، می‌توان به این موضوع در مطالعات بعدی توجه کرد.

شناسایی بخش‌های اپی‌توپیک یک آنتی‌ژن (Epitope Mapping) در حوزه‌های ایمنی‌شناسی، طراحی واکسن و توسعه درمان‌های مبتنی بر آنتی‌بادی اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه، اپی‌توپ‌های خطی و فضایی با چهار نرم‌افزار قوی تحت مطالعه قرار گرفتند و ۱۹ بخش که با تمامی نرم‌افزارها به‌عنوان اپی‌توپ معرفی شده بودند، به‌عنوان مهم‌ترین اپی‌توپ‌ها فهرست شدند که می‌توانند برای واکسن‌های زیرواحدی یا درمان‌های مبتنی بر آنتی‌بادی استفاده شوند.

از طرفی، با توجه به موقعیت خاص جغرافیایی کشورمان، که در چهارراه جهانی قرار دارد و امکان شیوع این بیماری در ایران نیز محتمل به نظر می‌رسد، برای معرفی اپی‌توپ‌های MHC-I و MHC-II و TCD4 از بانک آلل‌های غالب این مولکول‌ها در ایران استفاده شد که در مطالعه عابدینی و همکاران گزارش شده است [۳۷].

با ارائه پروتئین کایمر به یکی از معتبرترین سرورهای شبیه‌سازی ایمنی، مشاهده شد که این پروتئین ایمنی هومورال را در حدود یک ماه به‌طور مؤثری تحریک کرده است و در القای ایمنی

REFERENCES

- Goldstein T, Anthony SJ, Gbakima A, Bird BH, Bangura J, Tremeau-Bravard A, et al. The discovery of a new Ebolavirus, Bombali virus, adds further support for bats as hosts of Ebolaviruses. *Int J Infect Dis*. 2019;79:4-5. [DOI: [10.1016/j.ijid.2019.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.02.005)]
- Malvy D, McElroy AK, de Clerck H, Günther S, van Griensven J. Ebola virus disease. *Lancet*. 2019;393(10174):936-948. [DOI: [10.1016/S0140-6736\(18\)33132-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33132-5)]
- Baseler L, Chertow DS, Johnson KM, Feldmann H, Morens DM. The pathogenesis of Ebola virus disease. *Annu Rev Pathol*. 2017;12:387-418. [DOI: [10.1146/annurev-pathol-052016-100506](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100506)]
- Kuhn JH, Bao Y, Bavari S, Becker S, Bradfute S, Brister JR, et al. Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for natural variants of viruses assigned to the family Filoviridae. *Arch Virol*. 2013;158(1):301-311. [DOI: [10.1007/s00705-012-1454-0](https://doi.org/10.1007/s00705-012-1454-0)]
- Hoenen T, Feldmann H. Reverse genetics systems as tools for the development of novel therapies against filoviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(10):1253-1263. [DOI: [10.1586/14787210.2014.948848](https://doi.org/10.1586/14787210.2014.948848)]
- Banadyga L, Dolan MA, Ebiara H. Rodent-adapted filoviruses and the molecular basis of pathogenesis. *J Mol Biol*. 2016;428(17):3449-3466. [DOI: [10.1016/j.jmb.2016.05.008](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.008)]
- Jain S, Baranwal M. Conserved peptide vaccine candidates containing multiple Ebola nucleoprotein epitopes display interactions with diverse HLA molecules. *Med Microbiol Immunol*. 2019;208(2):227-238. [DOI: [10.1007/s00430-019-00584-y](https://doi.org/10.1007/s00430-019-00584-y)]
- Kupke A, Volz A, Dietzel E, Freudenstein A, Schmidt J, Shams-Eldin H, et al. Protective CD8+ T cell response induced by modified vaccinia virus ankara delivering Ebola virus nucleoprotein. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(4):533. [DOI: [10.3390/vaccines10040533](https://doi.org/10.3390/vaccines10040533)]
- Malik S, Kishore S, Nag S, Dhasmana A, Preetam S, Mitra O, et al. Ebola virus disease vaccines: development, current perspectives & challenges. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(2):268. [DOI: [10.3390/vaccines11020268](https://doi.org/10.3390/vaccines11020268)]
- Marzi A, Feldmann H. Ebola virus vaccines: an overview of current approaches. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(4):521-531. [DOI: [10.1586/14760584.2014.885841](https://doi.org/10.1586/14760584.2014.885841)]
- Herst CV, Burkholz S, Sidney J, Sette A, Harris PE, Massey S, et al. An effective CTL peptide vaccine for Ebola Zaire based on survivors' CD8+ targeting of a particular nucleocapsid protein epitope with potential implications for COVID-19 vaccine design. *Vaccine*. 2020;38(28):4464-4475. [DOI: [10.1016/j.vaccine.2020.04.034](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.034)]
- Vanderzanden L, Bray M, Fuller D, Roberts T, Custer D, Spik K, et al. DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology*. 1998;246(1):134-144. [DOI: [10.1006/viro.1998.9176](https://doi.org/10.1006/viro.1998.9176)]
- Kadanali A. An overview of Ebola virus disease. *North Clin Istanbul*. 2016;2(1):81-86. [DOI: [10.14744/nci.2015.97269](https://doi.org/10.14744/nci.2015.97269)]
- Babalola MO. The strengths, weaknesses, opportunities, and threats (SWOTS) analyses of the Ebola virus—paper retracted. *Afr J Infect Dis*. 2016;10(2):69-88. [DOI: [10.21010/ajid.v10i2.2](https://doi.org/10.21010/ajid.v10i2.2)]
- Ning YJ, Deng F, Hu Z, Wang H. The roles of ebolavirus glycoproteins in viral pathogenesis. *Viral Sin*. 2017;32(1):3-15. [DOI: [10.1007/s12250-016-3850-1](https://doi.org/10.1007/s12250-016-3850-1)]
- Jain S, Martynova E, Rizvanov A, Khaiboullina S, Baranwal M. Structural and functional aspects of Ebola virus proteins. *Pathogens*. 2021;10(10):1330. [DOI: [10.3390/pathogens10101330](https://doi.org/10.3390/pathogens10101330)]
- Watanabe S, Noda T, Kawaoka Y. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol*. 2006;80(8):3743-3751. [DOI: [10.1128/JVI.80.8.3743-3751.2006](https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3743-3751.2006)]
- Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. *J Mol Model*. 2014;20:2278. [DOI: [10.1007/s00894-014-2278-5](https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5)]
- Lopes KF, Freire ML, Murta SMF, Oliveira E. Efficacy of vaccines based on chimeric or multiepitope antigens for protection against visceral leishmaniasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024;18(12):e0012757. [DOI: [10.1371/journal.pntd.0012757](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012757)]
- Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(10):1357-1369. [DOI: [10.1016/j.addr.2012.09.039](https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039)]
- Buchan DWA, Moffat L, Lau A, Kandathil SM, Jones DT. Deep learning for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(W1):gkae328. [DOI: [10.1093/nar/gkae328](https://doi.org/10.1093/nar/gkae328)]
- Liang Y, Huang L, Liu T. Development and delivery systems of mRNA vaccines. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:718753. [DOI: [10.3389/fbioe.2021.718753](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.718753)]
- Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*. 2006;108(13):4009-4017. [DOI: [10.1182/blood-2006-04-015024](https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015024)]
- Kasarla RR, Verma A, Bhandari N, Pathak L. Ebola haemorrhagic fever: an overview. *Janaki Med Coll J Med Sci*. 2024;12(1):71-77. [DOI: [10.3126/jmcjms.v12i01.65247](https://doi.org/10.3126/jmcjms.v12i01.65247)]
- El Ayoubi LEW, Mahmoud O, Zakhour J, Kanj SS. Recent advances in the treatment of Ebola disease: a brief overview. *PLoS Pathog*. 2024;20(3):e1012038. [DOI: [10.1371/journal.ppat.1012038](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012038)]
- Gote V, Bolla PK, Kommineni N, Butreddy A, Nukala PK, Palakurthi SS, et al. A comprehensive review of mRNA vaccines. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):2700. [DOI: [10.3390/ijms24032700](https://doi.org/10.3390/ijms24032700)]
- Manelli A, Pace R, Leone M. The financial derivatives market and the pandemic: BioNTech and Moderna volatility. *J Risk Financ Manag*. 2023;16(10):420. [DOI: [10.3390/jrfm16100420](https://doi.org/10.3390/jrfm16100420)]
- Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*. 2020;586(7830):589-593. [DOI: [10.1038/s41586-020-2639-4](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4)]
- Bidram M, Zhao Y, Shebardina NG, Baldin AV, Bazhin AV, Ganjalikhan MR, et al. mRNA-based cancer vaccines: a therapeutic strategy for the treatment of melanoma patients. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(10):1060. [DOI: [10.3390/vaccines9101060](https://doi.org/10.3390/vaccines9101060)]
- Agnolon V, Kiseljak D, Wurm MJ, Wurm FM, Foissard C, Gallais F, et al. Designs and characterization of subunit Ebola GP vaccine candidates: implications for immunogenicity. *Front Immunol*. 2020;11:586595. [DOI: [10.3389/fimmu.2020.586595](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.586595)]
- He L, Chaudhary A, Lin X, Sou C, Alkutkar T, Kumar S, et al. Single-component multilayered self-assembling nanoparticles presenting rationally designed glycoprotein trimers as Ebola virus vaccines. *Nat Commun*. 2021;12(1):2633. [DOI: [10.1038/s41467-021-22867-w](https://doi.org/10.1038/s41467-021-22867-w)]
- Bhatia B, Furuyama W, Hoenen T, Feldmann H, Marzi A. Ebola virus glycoprotein domains associated with

- protective efficacy. *Vaccines* (Basel). 2021;9(6):630. [DOI: [10.3390/vaccines9060630](https://doi.org/10.3390/vaccines9060630)]
33. Meyer M, Huang E, Yuzhakov O, Ramanathan P, Ciaramella G, Bukreyev A. Modified mRNA-based vaccines elicit robust immune responses and protect guinea pigs from Ebola virus disease. *J Infect Dis*. 2018;217(3):451-455. [DOI: [10.1093/infdis/jix592](https://doi.org/10.1093/infdis/jix592)]
 34. Xu D, Powell AE, Utz A, Sanyal M, Do J, Patten JJ, et al. Design of universal Ebola virus vaccine candidates via immunofocusing. *bioRxiv* [Preprint]. 2023 Oct 14. [DOI: [10.1101/2023.10.14.562364](https://doi.org/10.1101/2023.10.14.562364)]
 35. Alizadeh M, Amini-Khoei H, Tahmasebian S, Ghatrehsamani M, Ghatreh Samani K, Edalatpanah Y, et al. Designing a novel multi-epitope vaccine against Ebola virus using reverse vaccinology approach. *Sci Rep*. 2022;12(1):7757. [DOI: [10.1038/s41598-022-11851-z](https://doi.org/10.1038/s41598-022-11851-z)]
 36. Lara-Ramírez D, Santacruz-Tinoco CE, Ramón-Gallegos E, Muñoz-Medina JE. In silico design of Ebola virus glycoprotein antigenic peptides as vaccine candidates. *PLoS One*. 2025;20(3):e0319496. [DOI: [10.1371/journal.pone.0319496](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0319496)]
 37. Abedini F, Rahmanian N, Heidari Z, Feizi A, Sherkat R, Rezaei M. Diversity of HLA class I and class II alleles in Iran populations: systematic review and meta-analysis. *Transpl Immunol*. 2021;69:101472. [DOI: [10.1016/j.trim.2021.101472](https://doi.org/10.1016/j.trim.2021.101472)]
 38. Ma Q, Zhang X, Yang J, Li H, Hao Y, Feng X. Optimization of the 5' untranslated region of mRNA vaccines. *Sci Rep*. 2024;14(1):19845. [DOI: [10.1038/s41598-024-70792-x](https://doi.org/10.1038/s41598-024-70792-x)]
 39. Kim SC, Sekhon SS, Shin WR, Ahn G, Cho BK, Ahn JY, et al. Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Mol Cell Toxicol*. 2022;18(1):1-8. [DOI: [10.1007/s13273-021-00171-4](https://doi.org/10.1007/s13273-021-00171-4)]