

Editora Dra. Gislaine Fongaro

TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS SUSTENTÁVEIS PARA FINS DE SAÚDE ÚNICA

**PROSPECÇÃO DE
MOLÉCULAS BIOATIVAS**

**PATÓGENOS VIRAIS
E PARASITÁRIOS**

**CULTIVO CELULAR
*IN VITRO***

CITOTOXICIDADE

**INTELIGÊNCIA
ARTIFICIAL**



Vacinologia reversa: um novo paradigma para o desenvolvimento de imunizantes destinados à saúde única

DOI: 10.56041/9786599841859-7

DE OLIVEIRA, Miguel De Abreu

Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis/SC

<https://orcid.org/0000-0002-6907-189X>

BELTRÃO, Gabriel Salles

Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

<https://orcid.org/0009-0005-4262-4705>

PINTO, Aguinaldo Roberto*

Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis/SC

<https://orcid.org/0000-0002-0991-8876>

SILVEIRA, Douglas Bardini

Laboratório de Imunologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

<https://orcid.org/0000-0002-2212-9564>

RESUMO

A universalização da vacinação constitui uma das políticas de saúde pública mais bem-sucedidas da história da humanidade, diminuindo sobremaneira a incidência, a morbidade e a mortalidade de doenças imunopreveníveis. Para tanto, a primeira geração de imunizantes se baseou na atenuação ou inativação do respectivo patógeno-alvo para induzir uma resposta imune protetora. Tal abordagem possui a desvantagem de demandar o cultivo e propagação *in vitro* do agente infeccioso em laboratórios de elevado nível de biossegurança e complexidade operacional. Alternativamente, avanços na área da biotecnologia vêm possibilitando o desenvolvimento de novas vacinas por meio da integração das ciências ômicas, permitindo uma maior compreensão a nível molecular da fisiologia do patógeno-alvo. Diante desse panorama, a vacinologia reversa emerge como uma abordagem promissora ao prospectar antígenos sem a necessidade do cultivo *in vitro* de patógenos, utilizando ferramentas computacionais para o reconhecimento e triagem de potenciais alvos vacinais. O presente capítulo irá transcorrer sobre as principais etapas aplicadas na vacinologia reversa, suas limitações e as perspectivas de avanço para as próximas décadas.

Palavras-chave: Vacinas; Bioinformática; Imunoinformática; Biologia computacional.

INTRODUÇÃO

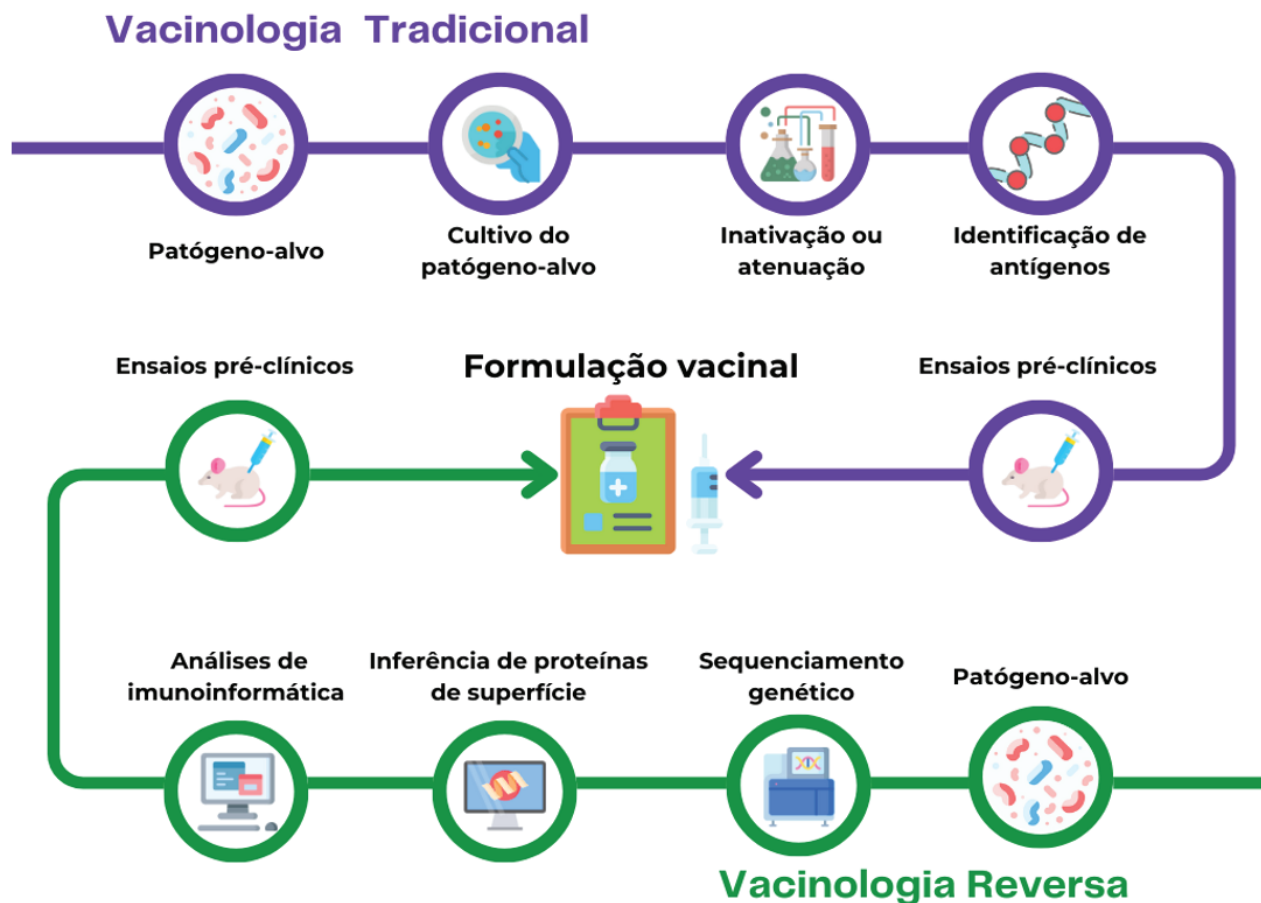
Ao longo da história da humanidade, doenças infecciosas moldaram profundamente a formação de sociedades e culturas. À medida que a população mundial se expandiu em tamanho e complexidade, a disseminação dessas doenças promoveu impacto direto sobre a expectativa de vida, fundamentando a necessidade de uma maior compreensão acerca de sua etiologia, profilaxia e tratamento (Excler et al., 2021; Friedler, 2020; World Health Organization, 2012; Iacono; Nichols 2017). A Teoria Microbiana das Doenças emergiu nesse contexto como um marco notável ao determinar o papel patogênico dos microrganismos, além de fomentar o surgimento de práticas assépticas, promover o saneamento e estruturar bases teóricas para o desenvolvimento de outras ferramentas profiláticas, como as vacinas (The Lancet, 2022; Riedel, 2005).

Vacinas integram uma gama de bioprodutos capazes de induzir uma resposta imune protetora frente a um agente infeccioso, estabelecendo uma defesa duradoura, capaz de prevenir a instauração de determinadas doenças infecciosas em caso de exposição subsequente ao respectivo patógeno (Khan et al., 2022a). A capilarização da vacinação como estratégia de saúde pública contou com a seminal contribuição de Edward Jenner, que imunizou o primeiro indivíduo contra a varíola humana a partir do fluido obtido de lesões cutâneas ocasionadas pelo vírus da varíola bovina. Devido à sua origem, a etimologia do termo vacina deriva da palavra latina “*vaccā*”, cujo significado se refere ao léxico “vaca” na língua portuguesa. O sucesso dos programas de vacinação frente à varíola humana resultou em 1980 na sua erradicação, conforme anunciado pela Organização Mundial da Saúde (Depelseñaire et al., 2017; World Health Organization, 1980).

Para tal finalidade, a vacinologia clássica empregou a inativação e atenuação de patógenos como pilar basilar no desenvolvimento de imunizantes. Essas abordagens contribuíram substancialmente no controle do sarampo, poliomielite, caxumba, rubéola, difteria, raiva e coqueluche (Rodrigues; Plotkin, 2020; Kallerup; Foged, 2014). Destaca-se como vantagens dessa plataforma vacinal o seu baixo custo de produção e sua elevada efetividade. No entanto, algumas limitações inerentes ao seu processo produtivo constituem um desafio em situações que envolvam uma alta demanda por determinados imunizantes, como diante da pandemia ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2 (Abu-Raya et al., 2020). Nesse cenário, faz-se necessário estabelecer plantas industriais com elevado nível de biossegurança e complexidade operacional para o cultivo e propagação viral, objetivando a produção de vacinas inativadas. No que se refere a produção de vacinas atenuadas, é imperativo um amplo sistema de controle de qualidade para certificar a sua segurança e garantir que o vírus não apresente reativação após sua administração em seres humanos (Van Riel; De Wit, 2020; Stauffer et al., 2006; Abu-Raya et al., 2020).

Em paralelo aos últimos avanços no âmbito da biologia molecular e da bioinformática, novas plataformas vacinais vêm sendo desenvolvidas, como é o caso das vacinas feitas de ácidos nucleicos ou baseadas em peptídeos recombinantes (Braz et al., 2014; Diniz; Ferreira, 2010). Tais estratégias possibilitaram a ascensão de um novo paradigma para o desenvolvimento de imunizantes: a vacinologia reversa. Essa abordagem visa utilizar dados genômicos, através de simulações computacionais (*in silico*), na triagem de potenciais alvos vacinais, como por exemplo, fatores de virulência e proteínas de superfície do patógeno-alvo (Figura 1). Em contraposição com a vacinologia tradicional, a vacinologia reversa não necessita da expansão e do cultivo do patógeno-alvo e apresenta como vantagens a aceleração do processo de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, personalização de antígenos, assim como a redução de efeitos adversos relacionados a esses imunizantes (Nandy; Basask, 2019; He, 2015; Tselis, 2014; Khalid; Poh, 2023; Rappuoli, 2001).

Figura 1 - Principais etapas utilizadas para o desenvolvimento de potenciais imunizantes através da vacinologia tradicional ou reversa.

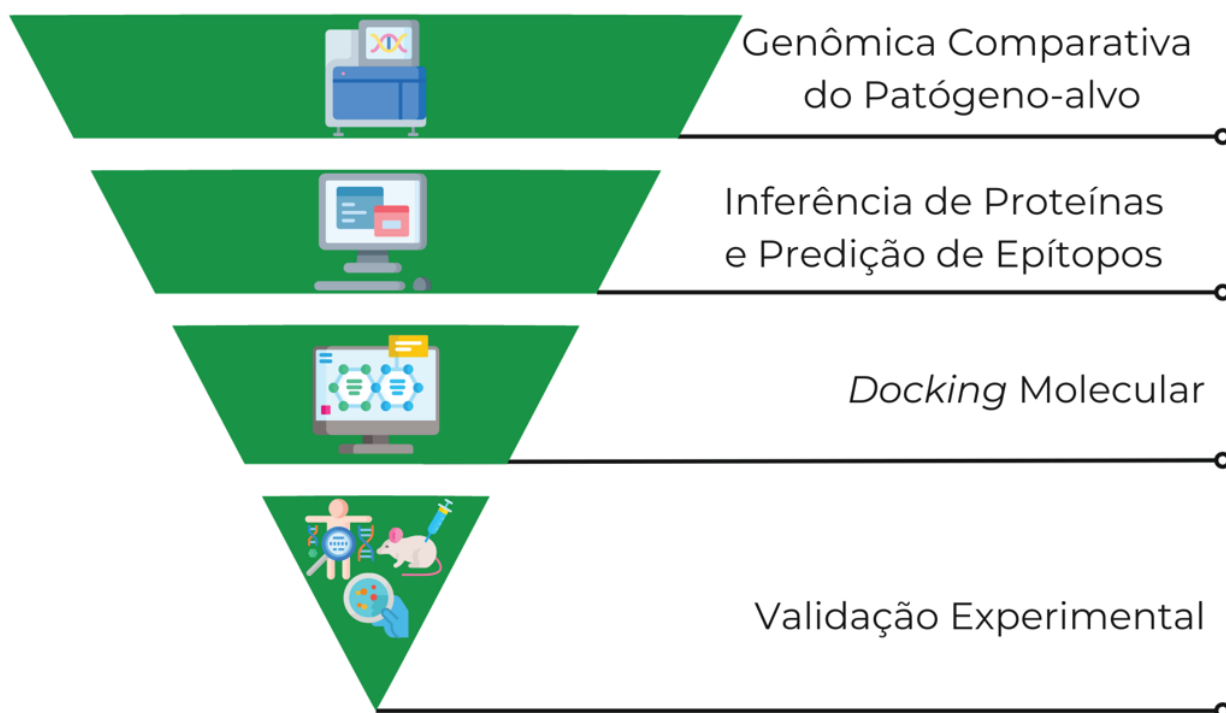


A vacina 4CMenB (Bexsero®), desenvolvida pela companhia multinacional britânica GlaxoSmithKline, apresenta-se como exemplo emblemático da aplicação da estratégia de vacinologia reversa no desenvolvimento de imunizantes. Essa vacina foi aprovada pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* no ano de 2015 e constitui uma importante ferramenta profilática contra a bactéria *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B, elencada como uma das principais causadoras de meningite bacteriana e sepse pediátrica (*Food and Drug Administration*, 2015; Davide et al., 2012). A concepção dessa vacina se tornou possível após o sequenciamento completo do genoma da *N. meningitidis* cepa MC58, evidenciando a expressão de cerca de 2.000 proteínas (Tettelin et al., 2000). Com o intuito de realizar a triagem dos possíveis alvos vacinais, foram empregados algoritmos de bioinformática para inferência de proteínas presentes na superfície bacteriana, as quais foram posteriormente clonadas, expressas e submetidas a ensaios para avaliação da resposta humoral. A formulação final da vacina licenciada é composta por quatro antígenos: a proteína de ligação ao fator H (fHbp), o antígeno de ligação à heparina (NHBA), adesina A (NadA) e a vesícula de membrana externa contendo a proteína PorA. (Rappuoli et al., 2018; Giuliani et al., 2006). Ao final dos ensaios clínicos a vacina 4CMenB se mostrou segura e com uma efetividade de 71% contra a doença meningocócica sorogrupo B em indivíduos que receberam a administração das duas doses (Castilla et al., 2023).

PRINCIPAIS ETAPAS DA VACINOLOGIA REVERSA

O processo de pesquisa e desenvolvimento de imunizantes por meio da vacinologia reversa destaca-se por aplicar diversas ferramentas computacionais, objetivando a identificação e análise de potenciais alvos vacinais (Quadro 1). Nesse sentido, o sequenciamento de genomas, caracterização proteômica e a utilização de bases de dados biológicos constituem uma etapa fundamental ao fornecer um vasto repertório sobre o patógeno-alvo. Conjuntamente, essas abordagens possibilitam a inferência de antígenos proteicos de superfície, direcionando a formulação de um imunizante adaptado às especificidades do patógeno-alvo em questão (Quiroz-Castañeda, 2018; Rappuoli, 2001; Bentley; Lo, 2021; Lu et al., 2020; Tsolakos et al., 2014; Bambini; Rappuoli, 2009). As principais etapas envolvidas na triagem e seleção de antígenos na vacinologia reversa estão indicadas na Figura 2.

Figura 2 - Fluxo de trabalho utilizado na triagem e seleção de proteínas imunogênicas na vacinologia reversa



Quadro 1 - Ferramentas frequentemente utilizadas na vacinologia reversa.

Ferramenta	Etapa	Fonte
VISTA	Genômica comparativa	https://genome.lbl.gov/vista/
PipMaker	Genômica comparativa	http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/
BepiPred 2.0	Predição de epítipo de células B	https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/

DiscoTope	Predição de epítopo de células B	http://www.cbs.dtu.dk/
Ellipro	Predição de epítopo de células B	http://tools.immuneepitope.org/ tools/ElliPro/iedbinput
IEDB (<i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i>)	Predição de epítopos de células B e T	http://tools.iedb.org/
NetCTL	Predição de epítopo d de células T	http://www.cbs.dtu.dk/services/ NetCTL/
Propred	Predição de epítopo d de células T	http://www.imtech.res.in/raghava/ propred1
EpiMatrix	Predição de epítopo de células T	http://www.epivax.com/
SwissDock	Docking molecular	http://www.swissdock.ch/
Autodock	Docking molecular	https://autodock.scripps.edu/

GENÔMICA COMPARATIVA DO PATÓGENO-ALVO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

A genômica comparativa é um campo de pesquisa utilizado para identificar diferenças entre o genoma de duas ou mais espécies. Neste campo a técnica de genômica subtrativa possui o objetivo de encontrar sequências nucleotídicas presentes em um organismo e ausentes em outro (Barh et al., 2011; Lin et al., 2020). Na vacinologia reversa, a genômica subtrativa permite identificar genes exclusivos do patógeno, servindo como alvos vacinais com baixas chances de reações cruzadas (Ashraf et al., 2022; Khan et al., 2022b). Em paralelo, as rotas físico-químicas e metabólicas desses alvos vacinais, assim como a estrutura das proteínas envolvidas, tendem a ser diferentes daquelas encontradas no hospedeiro e sua inibição ou bloqueio podem ser virtualmente letais ao patógeno (Martínez-Carranza et al, 2018).

Após a identificação dos genes de interesse é realizada a inferência da localização celular de suas respectivas proteínas, buscando selecionar potenciais antígenos secretados e/ou presentes na superfície do patógeno. Quanto mais exposto ao sistema imunológico do hospedeiro, melhor estes atuarão como alvo vacinal. Para isso, algoritmos computacionais se baseiam na identificação de sequências de aminoácidos que servem como peptídeo sinal com a finalidade de se determinar o endereçamento das proteínas ao seu compartimento celular

(Jorge & Dellagostin, 2017; Rappuoli, 2000; Rappuoli, 2001; Sette; Rappuoli, 2010).

PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE LINFÓCITOS B E T

Após a seleção das proteínas secretadas e/ou presentes na superfície do patógeno, segue-se a análise estrutural/conformacional de tais antígenos para a predição de epítomos, comumente empregando modelagens por homologia (Sanchez-Trincado et al., 2017; Yurina; Adianingsih, 2022; Jing & Dong, 2017). A predição de epítomos para linfócitos T tem como objetivo identificar os menores peptídeos de antígenos com caráter imunogênico, ou seja, que podem gerar uma resposta de linfócitos CD8 ou CD4. Essa identificação é realizada através da previsão de ligação de peptídeos às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Ullah et al., 2023). A previsão de ligação ao MHC do tipo I geralmente considera peptídeos de tamanho fixo, enquanto para o MHC do tipo II são considerados peptídeos de tamanhos variáveis (Sanchez-Trincado et al., 2017).

A predição de epítomos pra linfócitos B tem busca identificar estruturas que levam à produção de anticorpos (Ras-Carmona et al., 2022). Os epítomos conformacionais são estruturalmente mais complexos, formados por regiões não sequenciais e geralmente em estruturas tridimensionais (Cia; Pucci; Rooman, 2023). Para prever esses epítomos são utilizadas diversas técnicas, como a análise de acessibilidade ao solvente, identificação de regiões proeminentes na superfície da proteína e análise das propriedades físico-químicas dos aminoácidos (Sanchez-Trincado et al., 2017; Yurina; Adianingsih, 2022). A previsão de epítomos conformacionais necessita de validação experimental e é mais trabalhosa que a predição de epítomos lineares. Enquanto os linfócitos T reconhecem epítomos lineares e processados, os linfócitos B reconhecem antígenos conformacionais e sem a necessidade de processamento.

DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular é um método *in silico* utilizado para simular interações entre pequenos compostos ou macromoléculas com um receptor e prever suas interações moleculares. Consiste, portanto, em prever a melhor posição e orientação de um ligante em relação à outra molécula (Meng et al., 2011). Na vacinologia reversa essa abordagem tem o objetivo de validar as predições de epítomos realizadas anteriormente. O processo de *docking* envolve duas etapas básicas: previsão da conformação molecular e avaliação da afinidade de ligação.

A previsão da conformação molecular determina como um ligante se encaixa e interage com o sítio ativo de uma proteína. Esse processo inicia com a exploração de diferentes conformações do ligante, ou seja, as várias disposições tridimensionais que a molécula pode assumir (Agu et al., 2023). Uma vez que um ligante pode adotar múltiplas conformações devido à flexibilidade das moléculas, almeja-se aqui identificar aquela que melhor se ajusta ao sítio de ligação da proteína. Isso é feito por meio de algoritmos de amostragem, que exploram o espaço conformacional do ligante dentro do sítio ativo da proteína, considerando tanto a orientação quanto a posição do ligante (Morris & Lim-Wilby, 2008; Meng et al., 2011).

A avaliação da afinidade de ligação ocorre após a geração de várias conformações

possíveis do ligante no sítio ativo da proteína, quando uma função de pontuação é aplicada para estimar a afinidade da ligação. Essa função leva em conta fatores como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e efeitos eletrostáticos, fornecendo uma pontuação numérica que reflete a favorabilidade da interação ligante-receptor (Meng et al., 2011; Bender et al., 2021; Agu et al., 2023). Embora essas funções de pontuação busquem prever as conformações mais prováveis sob condições biológicas, também possuem limitações e tendem a simplificar as complexas interações moleculares, bem como a termodinâmica de ligação. A precisão das previsões de *docking*, portanto, depende da qualidade da função de pontuação e da validação experimental subsequente (Shivanika et al., 2020).

VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL

A validação experimental consiste em uma etapa central no desenvolvimento de uma vacina, independente da abordagem vacinológica empregada. Contudo, a diferença fundamental entre os métodos aqui discutidos é o tempo necessário para se chegar neste passo. Na vacinologia tradicional o processo requer o cultivo do patógeno e diversos ensaios em modelos *in vivo* para seleção de candidatos vacinais, sendo que tal processo requer consideravelmente mais recursos e tempo. Ao se utilizar a estratégia da vacinologia reversa, a identificação e análise de epítomos-alvo é realizada *a priori* por meio de ferramentas de imunoinformática e análise computacional, seguindo posteriormente para ensaios *in vitro* e em seres vivos (Rappuoli, 2000; Rappuoli, 2001).

A abordagem *in silico* de descoberta de alvos vacinais oferece ainda a grande vantagem de minimizar o uso de animais de experimentação, alinhando-se assim ao princípio dos '3Rs' (Reduzir, Refinar e Substituir) proposto por Russel e Burch em 1959. Esta abordagem não só atenua considerações éticas ao reduzir o número de animais sujeitos a procedimentos experimentais, mas também proporciona velocidade na obtenção de resultados e uma economia de custos significativa. Ademais, é possível dedicar maior atenção à qualidade e precisão dos dados obtidos, reduzindo o número de modelos animais necessários e garantindo assim resultados mais confiáveis e reproduzíveis (Shi et al., 2019; Danchin, 2022).

LIMITAÇÕES ATUAIS E PERSPECTIVAS PARA A VACINOLOGIA REVERSA

A vacinologia reversa constitui uma abordagem metodológica em plena ascensão. Por meio dela já é possível acelerar o processo de desenvolvimento de vacinas, a customização de antígenos, a diminuição do número de animais em testes vacinais e a redução de possíveis efeitos adversos (Khalid; Poh, 2023; Rappuoli, 2001). Entretanto, essa abordagem metodológica apresenta também algumas limitações, dentre elas a complexidade de se identificar antígenos glicosilados, assim como a existência de proteínas que não são previstas por meio dos dados genômicos. As perspectivas para as próximas décadas no âmbito da vacinologia reversa incluem uma maior compreensão das fases de leitura aberta não-canônicas e a potencial relevância de suas respectivas proteínas codificadas na formulação de vacinas (Bruno et al., 2015). Outrossim, à medida que a compreensão acerca das interações celulares e moleculares

relacionadas ao sistema imunológico avançam, as ferramentas computacionais permitirão uma resposta cada vez mais rápida, precisa e adaptável ao desenvolvimento de novos imunizantes destinados à saúde única.

Financiamento: Aguinaldo R. Pinto é bolsista de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Miguel de Abreu de Oliveira é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Gabriel Salles Beltrão é bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/UFSC/CNPq).

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Abu-Raya, B., Gantt, S., & Sadarangani, M. (2020). Challenges in evaluating SARS-CoV-2 vaccines during the COVID-19 pandemic. *CMAJ*, 192(34), E982-E985. doi: 10.1503/cmaj.201237
- Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezeh, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I. & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports*, 13(1), 13398. doi: 10.1038/s41598-023-40160-2
- Ashraf, B., Atiq, N., Khan, K., Wadood, A., & Uddin, R. (2022). Subtractive genomics profiling for potential drug targets identification against *Moraxella catarrhalis*. *Plos one*, 17(8), e0273252. doi: 10.1371/journal.pone.0273252
- Bambini, S., & Rappuoli, R. (2009). The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug discovery today*, 14(5-6), 252-260. doi: 10.1016/j.drudis.2008.12.007
- Barh, D., Tiwari, S., Jain, N., Ali, A., Santos, A. R., Misra, A. N., Azevedo, V. & Kumar, A. (2011). In silico subtractive genomics for target identification in human bacterial pathogens. *Drug Development Research*, 72(2), 162-177. doi: 10.1002/ddr.20413
- Bender B. J., Gahbauer S., Luttens A., Lyu J., Webb C. M., Stein R. M., Fink E. A., Balius T. E., Carlsson J., Irwin J. J., & Shoichet B.K. (2021). A practical guide to large-scale docking. *Nature protocols*, 16(10), 4799–4832. doi: 10.1038/s41596-021-00597-z
- Bentley, S. D., & Lo, S. W. (2021). Global genomic pathogen surveillance to inform vaccine strategies: a decade-long expedition in pneumococcal genomics. *Genome Medicine*, 13(1), 1-12. doi: 10.1186/s13073-021-00901-2
- Braz, L. C. C., Guimarães, D. T., Vaz, M. R. F., & de Farias Nóbrega, F. F. (2014). Contribuições da biotecnologia no desenvolvimento e produção de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. *Revista Saúde & Ciência*, 3(3), 189-206. doi: 10.35572/rscv3i3.324
- Bruno, L., Cortese, M., Rappuoli, R., & Merola, M. (2015). Lessons from Reverse

Vaccinology for viral vaccine design. *Current opinion in virology*, 11, 89-97. doi: 10.1016/j.coviro.2015.03.001

Castilla, J., García Cenoz, M., Abad, R., Sánchez-Cambronero, L., Lorusso, N., Izquierdo, C., Llabrés S., Roig J., Malvar A., González Carril F., Boone A. L. D., Pérez Martín J., Rodríguez Recio M. J., Galmés A., Caballero A., García Rojas A., Juanas F., Nieto M., Vitoria Raymundo L. J., Martínez Ochoa E., Rivas A. I., Castrillejo D., Moreno Pérez D., Martínez A., Borràs E., Sánchez Gómez A., Pastor E., Nartallo V., Arteagoitia J. M., Álvarez-Fernández B., García Pina R., Fernández Arribas S., Vanrell J., García Hernández S., Mendoza R. M., Méndez M., López-Tercero M. M., Fernández-Rodríguez Á., Blanco Á., Carrillo de Albornoz F. J., Ruiz Olivares J., Ruiz-Montero R., Limia A., Navarro-Alonso J. A., Vázquez J. A. & Barricarte, A. (2023). Effectiveness of a meningococcal group B vaccine (4CMenB) in children. *New England Journal of Medicine*, 388(5), 427-438. doi: 10.1056/NEJMoa2206433

Cia, G., Pucci, F., & Rooman, M. (2023). Critical review of conformational B-cell epitope prediction methods. *Briefings in bioinformatics*, 24(1), bbac567. doi: 10.1093/bib/bbac567

Danchin, A. (2022). In vivo, in vitro and in silico: an open space for the development of microbe-based applications of synthetic biology. *Microbial Biotechnology*, 15(1), 42-64. doi:10.1111/1751-7915.13937

Del Tordello, E., Rappuoli, R., & Delany, I. (2017). Chapter 3 - Reverse vaccinology: exploiting genomes for vaccine design. *Human Vaccines* (pp. 65-86). doi: 10.1016/B978-0-12-802302-0.00002-9

Depelseñaire, A. C. I., Kendall, M. A. F., Young, P. R., & Muller, D. A. (2017). Introduction to vaccines and vaccination. In *Micro and nanotechnology in vaccine development* (pp. 47-62). William Andrew Publishing. doi: 10.1016/B978-032339981-4.00003-8

Diniz, M. D. O., & Ferreira, L. C. D. S. (2010). Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos avançados*, 24, 1930. doi: 10.1590/S0103-40142010000300003

Excler, J. L., Saville, M., Berkley, S., & Kim, J. H. (2021). Vaccine development for emerging infectious diseases. *Nature medicine*, 27(4), 591-600. doi: 10.1038/s41591-021-01301-0

Friedler, A. (2021). Sociocultural, behavioural and political factors shaping the COVID-19 pandemic: the need for a biocultural approach to understanding pandemics and (re) emerging pathogens. *Global public health*, 16(1), 1735. doi: 10.1080/17441692.2020.1828982

Food and Drug Administration. Bexsero (meningococcal serogroup B vaccine), Approval Letter dated January 23, 2015. 2015.

Giuliani, M. M., Adu-Bobie, J., Comanducci, M., Aricò, B., Savino, S., Santini, L., Brunelli, B., Bambini, S., Biolchi, A., Capecci, B., Cartocci, E., Ciocchi, L., Di Marcello, F., Ferlicca, F., Galli, B., Luzzi, E., Masignani, V., Serruto, D., Veggi, D., Contorni, M., Morandi M., Bartalesi A., Cinotti V., Mannucci D., Titta F., Ovidi E., Welsch JA., Granoff D., Rappuoli R., & Pizza, M. (2006). A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29), 10834–10839. doi: 10.1073/pnas.0603940103

- He, Y. (2015). Bacterial whole-genome determination and applications. In *Molecular medical microbiology* (pp. 357368). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12397169-2.00020-2
- Iacono, G. L., & Nichols, G. L. (2017). Modeling the impact of environment on infectious diseases. In *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*. doi: 10.1093/acrefore/9780199389414.013.339
- Jing, X., & Dong, Q. (2017). MQAPRank: improved global protein model quality assessment by learning-to-rank. *BMC bioinformatics*, 18, 1-8. doi: 10.1186/s12859-017-1691-z
- Jorge, S.; Dellagostin, O. A.. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, n. 1, p. 6-13, 2017. doi: 10.1016/j.biori.2017.10.001
- Kallerup, R. S., & Foged, C. (2014). Classification of vaccines. In *Subunit vaccine delivery* (pp. 15-29). New York, NY: Springer New York.
- Khalid, K., & Poh, C. L. (2023). The promising potential of reverse vaccinology-based next-generation vaccine development over conventional vaccines against antibiotic-resistant bacteria. *Vaccines*, 11(7), 1264. doi: doi.org/10.3390/vaccines11071264
- Khan, T., Abdullah, M., Toor, T. F., Almajhdi, F. N., Suleman, M., Iqbal, A., Ali L., Khan A., Waheed Y. & Wei, D. Q. (2022a). Evaluation of the Whole Proteome of *Achromobacter xylooxidans* to Identify Vaccine Targets for mRNA and Peptides-Based Vaccine Designing Against the Emerging Respiratory and Lung Cancer-Causing Bacteria. *Frontiers in Medicine*, 8, 825876. doi: 10.3389/fmed.2021.825876
- Khan, K., Jalal, K., Khan, A., Al-Harrasi, A., & Uddin, R. (2022b). Comparative Metabolic Pathways Analysis and Subtractive Genomics Profiling to Prioritize Potential Drug Targets Against *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 796363. doi: 10.3389/fmicb.2021.796363
- Lin, X., Li, X., & Lin, X. (2020). A review on applications of computational methods in drug screening and design. *Molecules*, 25(6), 1375. doi: 10.3390/molecules25061375
- Lu G., Shan S., Zainab B., Ayaz Z., He J., Xie Z., Rashid U., Zhang D., & Mehmood Abbasi A. (2021) Novel vaccine design based on genomics data analysis: A review. *Scandinavian journal of immunology*, 93(3), e12986. doi: 10.1111/sji.12986
- Martínez-Carranza, E., Barajas, H., Alcaraz, L. D., Servín-González, L., Ponce-Soto, G. Y., & Soberón-Chávez, G. (2018). Variability of bacterial essential genes among closely related bacteria: The case of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1059. doi: 10.3389/fmicb.2018.01059
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157. doi: 10.2174/157340911795677602
- Monterrubio-López, G. P., & Gutiérrez, K. D. (2021). Vacunología reversa: estrategia contra patógenos emergentes. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 59(3), 233-241.
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Molecular modeling of*

proteins, 365382. doi:10.1007/978-159745-177-2_19

Nandy, A., & Basak, S. C. (2019). Bioinformatics in design of antiviral vaccines. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 280. doi: 10.1016/B978-0-12-8012383.108785

Oyston, P.C.F. (2015) Vaccines. In: *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, 2015. (pp. 627-634). doi: 10.1016/B978-0-12397169-2.00035-4

Quiroz-Castañeda, R. E. (2018). Pathogenomics and molecular advances in pathogen identification. In *Farm Animals Diseases, Recent Omic Trends and New Strategies of Treatment*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen73695

Raoufi, E., Hemmati, M., Eftekhari, S., Khaksaran, K., Mahmodi, Z., Farajollahi, M. M., & Mohsenzadegan, M. (2020). Epitope prediction by novel immunoinformatics approach: a state-of-the-art review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 1155-1163. doi: 10.1007/s10989-019-09918-z

Rappuoli, R. (2000). Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology*, 3(5), 445-450. doi: 10.1016/S13695274(00)001193

Rappuoli, R. (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*, 19(17-19), 2688-2691. doi: https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)005545

Rappuoli, R., Pizza, M., Masignani, V., & Vadivelu, K. (2018). Meningococcal B vaccine (4CMenB): the journey from research to real world experience. *Expert Review of Vaccines*, 17(12), 1111-1121. doi: 10.1080/14760584.2018.1547637

Ras-Carmona, A., Lehmann, A. A., Lehmann, P. V., & Reche, P. A. (2022). Prediction of B cell epitopes in proteins using a novel sequence similarity-based method. *Scientific Reports*, 12(1), 13739. doi:10.1038/s41598-022-18021-1

Riedel, S. (2005, January). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. In *Baylor University medical center proceedings* (Vol. 18, No. 1, pp. 21-25). Taylor & Francis. doi: 10.1080/08998280.2005.11928028

Rodrigues, C. M., & Plotkin, S. A. (2020). Impact of vaccines; health, economic and social perspectives. *Frontiers in microbiology*, 11, 1526. doi: 10.3389/fmicb.2020.01526

Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen Publishing.

Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction. *Journal of immunology research*, 2017. doi:10.1155/2017/2680160

Serruto, D., Bottomley, M. J., Ram, S., Giuliani, M. M., & Rappuoli, R. (2012). The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*, 30, B87-B97. doi:10.1016/j.vaccine.2012.01.033

Sette, A., & Rappuoli, R. (2010). Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity*, 33(4), 530-541. doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.017

Shi, D., Mi, G., Wang, M., & Webster, T. J. (2019). In vitro and ex vivo systems at the forefront of infection modeling and drug discovery. *Biomaterials*, 198, 228-249. doi: https://doi.

org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.030

Stauffer, F., El-Bacha, T., & Da Poian, A. T. (2006). Advances in the development of inactivated virus vaccines. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 1(3), 291-296. doi: 10.2174/157489106778777673

The Lancet (2022). Pasteur's legacy in 21st century medicine. *Lancet* (London, England), 400(10369), 2157. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02573-9

Tselis, A. C. (2014). Neurologic Complications of Vaccination. In: AMINOFF, M.J.; JOSEPHSON, S.A. *Aminoff's Neurology and General Medicine*. Academic Press (pp. 969-983).

Tsolakos, N., Brookes, C., Taylor, S., Gorringer, A., Tang, C. M., Feavers, I. M., & Wheeler, J. X. (2014). Identification of vaccine antigens using integrated proteomic analyses of surface immunogens from serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Journal of proteomics*, 101, 63-76. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.013

Ullah, A., Shahid, F. A., Haq, M. U., Tahir ul Qamar, M., Irfan, M., Shaker, B., Ahmad S., Alrumaihi F., Allemailem K. S. & Almatroudi, A. (2023). An integrative reverse vaccinology, immunoinformatic, docking and simulation approaches towards designing of multi-epitopes based vaccine against monkeypox virus. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(16), 7821-7834. doi: 10.1080/07391102.2022.2125441

Tettelin H., Saunders N. J., Heidelberg J., Jeffries A. C. , Nelson K. E., Eisen J. A., Ketchum K. A., Hood D. W., Peden J. F., Dodson R. J., Nelson W. C., Gwinn M. L., DeBoy R., Peterson J. D., Hickey E. K., Haft D. H., Salzberg S. L., White O., Fleischmann R. D., Dougherty B. A., Mason T., Ciecko A., Parksey D. S., Blair E., Citti H., Clark E. B., Cotton M. D., Utterback T. R., Khouri H., Qin H., Vamathevan J., Gill J., Scarlato V., Massignani V., Pizza M., Grandi G., Sun L., Smith H. O., Fraser C. M., Moxon E. R., Rappuoli R., & Venter J. C. (2000). Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, 287(5459), 1809–1815. doi: 10.1126/science.287.5459.1809

Van Regenmortel, M. H. V. (2008). Antigenicity and immunogenicity of viral proteins. *Encyclopedia of Virology*. doi: 10.1016/B978-012374410-4.005835

Van Riel, D., & de Wit, E. (2020). Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature materials*, 19(8), 810-812. doi: 10.1038/s41563-020-0746-0

World Health Organization. (1980). *The global eradication of smallpox: final report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication*, Geneva, December 1979. World Health Organization.

World Health Organization. (2012). *Global report for research on infectious diseases of poverty 2012*.

Yurina, V., & Adianingsih, O. R. (2022). Predicting epitopes for vaccine development using bioinformatics tools. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 10, 25151355221100218. doi: 10.1177/25151355221100218