

## *Design of a Multi-epitope Peptide Vaccine against SARS-CoV-2 based on Immunoinformatics Data*

Seyed Alireza Habibi<sup>1</sup>,  
Amin Azizan<sup>1</sup>,  
Yahya Ehteshaminia<sup>1</sup>,  
Farhad Jadidi-Niaragh<sup>2</sup>,  
Seyed Ehsan Enderami<sup>3</sup>,  
Esmail Akbari<sup>4</sup>,  
Saeid Abediankenari<sup>5</sup>,  
Hadi Hassannia<sup>3</sup>

<sup>1</sup> BSc Student in Medical Laboratory, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 17, 2020 ; Accepted September 22, 2020)

### **Abstract**

**Background and purpose:** In 2019, the world has witnessed the emergence of a virus that caused acute respiratory distress syndrome in human with high mortality rates (approximately 3.7%). So far, no effective treatment has been proven against COVID-19. This study aimed at designing a multi-epitope vaccine combining several T-cell and B-cell epitopes of the SARS-CoV-2.

**Materials and methods:** Based on immunoinformatics strategies, B-cell and T-cell epitopes were predicted using immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB). Then, the appropriate predicted epitopes were joined to each other by suitable linkers, and the multi-epitope vaccine constructed was suggested as a vaccine candidate against SARS-CoV-2.

**Results:** In this study, 28 B-cell epitopes and 33 T-cell epitopes were predicted. Then, to design the multi epitope vaccine, 5 epitopes were used from the virion surface of spike protein and one epitope was used from intravirion region of the Envelope, Membrane, and Nucleocapsid proteins that later on were joined with flexible glycine linker.

**Conclusion:** Based on the immunoinformatics results obtained, it seems that different epitopes from SARS-CoV-2 structural proteins have high ability to stimulate humoral and cellular immune responses, so the multi-epitope vaccine designed with these epitopes, can help to accelerate the production of effective vaccines against COVID-19.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, vaccine, epitope, Immunoinformatics

**J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (190): 126-132 (Persian).**

\* Corresponding Author: Hadi Hassannia - Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: Hadi3977@yahoo.com)

# طراحی واکسن پپتیدی مولتی اپی توپ علیه SARS-CoV-2 مبتنی بر داده های ایمونوفورماتیک

سید علیرضا حبیبی<sup>1</sup>امین عزیزان<sup>1</sup>یحیی احتشامی نیا<sup>1</sup>فرهاد جدیدی نیارق<sup>2</sup>سید احسان اندرامی<sup>3</sup>اسماعیل اکبری<sup>4</sup>سعید عابدیان کناری<sup>5</sup>هادی حسن نیا<sup>3</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** در سال 2019، جهان شاهد ظهور ویروسی تنفسی در انسان بود که سبب بروز سندرم حاد تنفسی با میزان مرگ و میر بالا شد. SARS-CoV-2 به سرعت در جهان منتشر شد و تاکنون درمان موثری برای آن پیدا نشده است. در این مطالعه، ما قصد داریم یک واکسن مولتی اپی توپ با ترکیب چندین اپی توپ سلول T و سلول B ویروس COVID-19 طراحی کنیم.

**مواد و روش ها:** جهت بررسی های ایمونوفورماتیک، اپی توپ های سلول B و سلول T با استفاده از سرور IEDB پیش بینی شدند. سپس اپی توپ های برتر به وسیله لینکر مناسب به یکدیگر متصل شدند و توالی مولتی اپی توپ حاصل به عنوان کاندید ساخت واکسن علیه SARS-CoV-2 پیشنهاد شد.

**یافته ها:** در این مطالعه، 28 اپی توپ سلول B و 33 اپی توپ سلول T پیش بینی شدند، سپس برای طراحی واکسن مولتی اپی توپ از 5 اپی توپ با بیش ترین میزان ایمونوژنیسیته در ناحیه خارج ویرونی پروتئین Spike و یک اپی توپ از هر کدام از پروتئین های Envelope، Membrane، Nucleocapsid استفاده از لینکرهای انعطاف پذیر گلایسینی به هم متصل شدند.

**استنتاج:** براساس نتایج ایمونوفورماتیک ب آدست آمده به نظر می رسد اپی توپ های مختلفی از پروتئین های ساختاری SARS-CoV-2 توانایی بالایی در تحریک پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی داشته باشند، لذا واکسن مولتی اپی توپ طراحی شده با این اپی توپ ها می تواند کمک شایانی در تسریع تولید واکسن موثر علیه COVID-19 داشته باشد.

**واژه های کلیدی:** SARS-CoV-2، COVID-19، واکسن، اپی توپ، ایمونوفورماتیک

## مقدمه

نوپدید، اپیدمی ویروس SARS-CoV-2 در شهر ووهان چین و انتقال سریع آن به سراسر جهان بود که منجر شد

ظهور قرن بیستم همراه با پیدایش ویروس های جدید بوده است، آخرین مورد از ظهور ویروس های

E-mail: Hadi3977@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** هادی حسن نیا<sup>1</sup>؛ خیابان فیاض بخش، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پیراپزشکی آمل

1. دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استادیار، مرکز تحقیقات ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

3. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1399/2/28 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/2/31 تاریخ تصویب: 1399/7/1

سازمان جهانی بهداشت (WHO) در دسامبر 2019، شرایط اضطراری جهانی را اعلام کند (2،1). از آنجایی که تا کنون درمان موثری برای ویروس COVID-19 یافت نشده است تاکنون میلیون‌ها انسان در سراسر جهان به این بیماری مبتلا شده‌اند و متأسفانه حدود 4 درصد افراد مبتلا جان خود را از دست داده‌اند و این آمارها رو به افزایش است. SARS-CoV-2، ویروسی پوشش دار دارای RNA تک رشته‌ای مثبت و متعلق به خانواده کروناویروس است (3،2). ژنوم ویروس SARS-CoV-2 به طول 29/8 کیلوباز دارای 14 قالب خواندن باز (ORF) می‌باشد که 27 پروتئین را کد می‌کند. در انتهای 3' ژنوم، چهار پروتئین ساختمانی شامل پروتئین سطحی (Spike (S)، Envelope (E)، Membrane (M) و Nucleocapsid (N) کد می‌شود (4). پروتئین S در اتصال و ورود ویروس به سلول میزبان نقش دارد، پروتئین N ژنوم ویروس را در ریونوکلئوکسپید مارپیچی بسته‌بندی می‌کند، پروتئین M نقش اساسی در شکل‌دهی و مونتاژ ویروس دارد و پروتئین E نیز با ایجاد منفذ در انتقال یون‌ها و ایجاد ویرون نقش دارد (5،6). در حال حاضر هیچ واکسن یا درمان ضد ویروسی اختصاصی تایید شده‌ای توسط WHO برای SARS-CoV-2 وجود ندارد، به طوری که شناسایی گزینه‌های دارویی در اسرع وقت برای پاسخ به شیوع این ویروس بسیار مهم است (7). لذا هدف از این مطالعه بررسی داده‌های ایمونوفورماتیک برای یافتن اپی توپ‌های موثر و ایمونژن جهت طراحی واکسن می‌باشد (8).

## مواد و روش‌ها

ابتدا جهت بررسی ایمونوفورماتیکی توالی آمینواسیدی پروتئین‌های ساختاری S، E، M و N از پایگاه اطلاعات ژنی NCBI استخراج شد. سپس، موقعیت نواحی خارج ویرونی، درون غشایی و داخل ویرونی توسط ابزار UniProt به دست آمد.

در این مطالعه ناحیه اکتودومین پروتئین‌های ساختاری SARS-CoV-2، برای پیش‌بینی اپی توپ‌های سلول B انتخاب شدند و برای غربالگری، پارامترهایی نظیر میزان آنتی‌ژنیسیته، هیدروفیلی، در دسترس بودن و سطحی بودن پپتیدها، انعطاف‌پذیری و قطبیت در نظر گرفته شد. ابتدا برای پیش‌بینی اپی توپ‌های خطی سلول B از الگوریتم BepiPred 2.0 که در سرور IEDB در دسترس می‌باشد، استفاده شد و اپی توپ‌های پیش‌بینی شده با استفاده از حد آستانه 0/55، مشخص شدند و توالی‌هایی بیش‌تر از 7 آمینواسید، انتخاب شدند. در آخر امتیاز آنتی‌ژنیسیته اپی توپ‌های مورد نظر از سرور VaxiJen v2.0 بازیابی شدند و اپی توپ‌هایی با امتیاز بیش‌تر از حد آستانه 0/4، به عنوان اپی توپ‌های مناسب سلول B انتخاب شدند. برای پیش‌بینی اپی توپ‌های لئوسیت‌های T کشنده و T یاریگر به ترتیب از ابزار MHC کلاس I و کلاس II سرور IEDB استفاده شد. از آنجایی که سلول‌های T برخلاف سلول‌های B محدود به ناحیه اکتودومین نیستند کل توالی‌های پروتئینی M، N، S، E بررسی شدند و برای این منظور از الگوریتم NetMHCpan 4.0، برای پیش‌بینی اپی توپ‌هایی به طول 9 آمینواسید برای آلل‌های رایج MHC کلاس I انسانی (HLA-A، B، C) و از الگوریتم 2.22 recommended IEDB برای پیش‌بینی اپی توپ‌هایی به طول 15 آمینواسید برای آلل‌های رایج MHC کلاس II انسانی (HLA-DR) استفاده شد. برای پیش‌بینی اپی توپ سلول T یاریگر، پپتیدهایی با صدک اجماع متوسط  $\geq 20$  درصد و از سوی دیگر برای پیش‌بینی اپی توپ‌های سلول T کشنده، پپتیدهایی با امتیاز  $\geq 0/5$  انتخاب شد. همچنین برای پیش‌بینی آلرژنیسیته پپتیدها از سرور AllergenFP v.1.0 و برای بررسی سمیت پپتیدها از سرور ToxinPred که برای مشخص کردن پپتیدهای کوتاه سمی یا غیرسمی می‌باشد، استفاده شد.

1- Median consensus percentile

موثر سلول T کشنده و 43 اپی توپ موثر سلول T یاریگر شناسایی شد (جدول شماره 2).

محل اتصال آنتی‌بادی با پروتئین‌های سطحی ویروس بر توانایی بدن در مقاومت در برابر بیماری بسیار موثر است لذا با در نظر گرفتن معیارهای مختلفی همچون آنتی‌ژنیسیته، آلرژنیسیته، سمیت و میزان همپوشانی اپی‌توپ‌ها با اپی‌توپ‌های سلول T در نهایت 5 اپی‌توپ مناسب از پروتئین S، 2 اپی‌توپ از ناحیه NTD، یک اپی‌توپ از نواحی (RBD، HR و S1 cleavage) جهت استفاده در واکسن مولتی اپی‌توپ انتخاب شدند.

ناحیه NTD و RBD نقش مهمی در شناسایی سلول هدف برای ویروس دارند به طوری که اتصال آنتی‌بادی به ناحیه RBD از زیر واحد S1 پروتئین اسپایک موجب مسدود کردن میانکنش ویروس با گیرنده میزبان (ACE2) می‌شود (9). از میان دو اپی‌توپ انتخاب شده از ناحیه NTD، یک اپی‌توپ بیشترین آنتی‌ژنیسیته سلول B و یک اپی‌توپ حداکثر همپوشانی بین سلول T و سلول B را داشت. اپی‌توپ انتخاب شده از ناحیه RBD آلرژن شناسایی شد اما به دلیل اهمیت بالای این ناحیه، با استفاده از لینکر "KK" آلرژنیسیته توالی مذکور خنثی شد.

پس از انتخاب پپتیدهای مناسب که دارای بیشترین میزان همپوشانی اپی‌توپ‌های سلول‌های B و T (کشنده و یاریگر) بودند، پپتیدهای مذکور توسط انواع توالی‌های اتصال‌دهنده پپتید (لینکر) با موقعیت‌های متفاوت در کنار هم قرار گرفته و میزان آنتی‌ژنیسیته بر اساس سرور VaxiJen v2.0 ارزیابی گردید. توالی‌های مولتی اپی‌تویی که حداکثر آنتی‌ژنیسیته را در میان موقعیت‌های متفاوت قرار گیری پپتیدها در کنار هم داشتند، انتخاب شدند. همچنین میزان ضریب پایداری و نیمه عمر در شرایط *in vitro* و *in vivo* با استفاده از ابزار ProtParam از سرور ExpASy محاسبه شد.

## یافته‌ها و بحث

نتایج بررسی ساختار توالی پروتئین‌های SARS-CoV-2 به دست آمده از سرور UniProt در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

بر همین اساس جهت انتخاب اپی‌توپ سلول B، از میان 37 اپی‌توپ پیش‌بینی شده، 28 اپی‌توپ که در ناحیه خارج ویرونی قرار داشتند انتخاب شدند. همچنین از توالی پروتئین‌های N، M، S و E تعداد 72 اپی‌توپ

جدول شماره 1: تقسیم بندی نواحی پروتئین‌های ساختاری و تعداد اپی‌توپ‌های هر ناحیه

تعداد اپی‌توپ‌های سلول T		تعداد اپی‌توپ‌های خطی سلول B	جایگاه	نواحی پروتئینی	تعداد کل آمینو اسید	پروتئین
MHC II	MHC I					
19	48	28	13-1213	خارج ویرونی	1273	Spike glycoprotein
1	1	1	1214-1234	درون غشایی		
0	0	0	1235-1273	داخل ویرونی		
0	2	0	2-19 72-79	خارج ویرونی	222	Membrane glycoprotein
2	1	0	20-40 51-71 80-100	درون غشایی		
6	9	3	41-50 101-222	داخل ویرونی		
1	0	0	16-1	خارج ویرونی	75	Envelope protein
4	0	0	17-37	درون غشایی		
3	2	1	38-75	داخل ویرونی		
0	0	0	0	خارج ویرونی	418	Nucleocapsid phosphoprotein
0	0	0	0	درون غشایی		
7	9	4	1-418	داخل ویرونی		

جایگاه 1-12 از توالی spike glycoprotein ناحیه تنظیمی می‌باشد که فاقد اپی‌توپ موثر می‌باشد.

جدول شماره 2: آنالیز ایمونوژنوماتیکی پروتئین های ساختاری SARS-CoV-2

آگزوسیت	Ab (Antigenicity score)	MHC2 (Median consensus percentile of CD4)	MHC1 (Score of CD8)	جایگاه	توالی	پروتئین
غیر آگزون غیر سعی	Yes (1.36)	No	Yes (0.58)	13-24	***NLTRRTQL *SQCVNLTTRT SQCVNLTTRTQL	S
غیر آگزون غیر سعی	Yes (0.88)	Yes (19)	Yes (0.80)	51-75	**TQDLFLPFNSVTFHAIHV ***LPPFSNVTW *FHAHVSGTNG TQDLFLPFNSVTFHAIHVSGTNG	
غیر آگزون غیر سعی	Yes (0.72)	Yes (14)	Yes (0.55)	109-130	**SLLVNNAITNVVIVK ***TLDSKTQSL *TLDSKTQSLLVNNAITNV TLDSKTQSLLVNNAITNVVIVK	
آگزون غیر سعی	No	Yes (13)	Yes (0.78)	191-205	**EFVFNIDGYFKIYS ***.FVFNIDGY EFVFNIDGYFKIYS	
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (18)	Yes (0.70)	231-245	**IGINTRFQTLALH ***INTRFQTL IGINTRFQTLALH	
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (9.2)	Yes (0.55)	236-250	**TRFQTLALHRSYLT ***LLALHRSYL TRFQTLALHRSYLT	
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (9.3)	Yes (0.75)	341-355	**VFNA TRFASVYAWNR ***NATRFASVY VFNA TRFASVYAWNR	
آگزون غیر سعی	Yes (1.24)	No	No	434-444	*IAWNSNNDLDSK IAWNSNNDLDSK	
غیر آگزون غیر سعی	Yes (0.41)	No	Yes (0.96)	673-713	***VSAQSIIAY *SYQTQTNsprrarsvasqsiiaytmslgaensvaySNNSIA SYQTQTNsprrarsvasqsiiaytmslgaensvaySNNSIA	
غیر آگزون غیر سعی	Yes (1.34)	No	Yes (0.79)	719-739	***TEILPVSMTK *TISVTEILPVSMTKTSVDCT TISVTEILPVSMTKTSVDCT	
آگزون غیر سعی	No	Yes (6.5)	Yes (0.98)	896-910	**IPFAMQMAYRFNGIG ***IPFAMQMAY IPFAMQMAYRFNGIG	
غیر آگزون غیر سعی	Yes (0.40)	Yes (13)	No	1016-1036	**AEIRASANLAATKMS *RASANLAATKMSECVLGQ AEIRASANLAATKMSECVLGQ	
غیر آگزون غیر سعی	Yes (1.04)	No	No	1171-1180	*GINASVVNIQ GINASVVNIQ	
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (18)	Yes (0.82)	1216-1230	**IWLGFHAGLIAIVMV ***IAGLIAIV IWLGFHAGLIAIVMV	
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (17)	Yes (0.86)	51-65	**LVKPSFYVSRVKNL ***YVSRVKNL LVKPSFYVSRVKNL	E
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (15)	Yes (0.86)	56-70	**FYVYSRVKLNSSRV ***YVSRVKNL FYVYSRVKLNSSRV	
غیر آگزون سعی	No	Yes (11)	Yes (0.86)	31-45	**WICLLQFAYANRNR ***FAYANRNR WICLLQFAYANRNR	M
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (13)	Yes (0.79)	96-110	**FIASFRLFARTRSMW ***RLFARTRSM FIASFRLFARTRSMW	
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (20)	Yes (0.91)	136-150	**SELVIGAVILRGHLR ***SELVIGAVIL SELVIGAVILRGHLR	
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (11)	Yes (0.79)	166-180	**KEITVATSRILSYK ***KEITVATSRIL KEITVATSRILSYK	
غیر آگزون غیر سعی	No	Yes (17)	Yes (0.84)	306-320	**QFAPSASAFFGMSRI ***ASAFFGMSRI QFAPSASAFFGMSRI	N

ایبی توپ های سلول B (\*) و ایبی توپ های سلول T (\*\* MHC II : \* و \*\*\* MHC I) مشخص شده است.

شرایط *in vivo* به عنوان کاندید ساخت واکسن مولتی اپی توپ پیشنهاد شد. بررسی این مولتی اپی توپ در سرورهای v.1.0, AllergenFP v.2.0, AllerTOP و ToxinPred نیز نشان داد که این توالی غیرسمی و غیر آلرژن است.

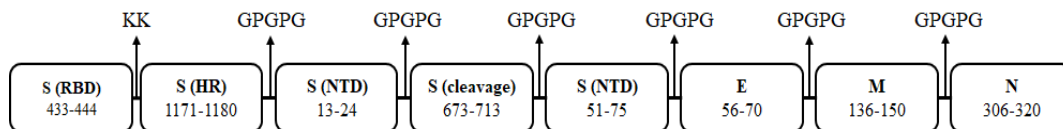
یافته‌های حاصل از آنالیز ایمونوفورماتیک SARS-CoV-2 در این مطالعه حاکی از وجود اپی توپ‌های متعدد در پروتئین‌های ساختاری با توانایی بالا در تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی بوده است و این قابلیت را دارند که از آن‌ها به عنوان کاندید واکسن COVID-19 استفاده شود. در نهایت اگر واکسن طراحی شده بتواند در مراحل پیش بالینی عملکرد مورد انتظار را داشته باشد، انتظار می رود که بتوان از آن برای مقابله با COVID-19 استفاده کرد.

## سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران برای حمایت از این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی شماره 7995 و کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1399.7995 تشکر می‌شود.

مطالعات نشان داده‌اند ناحیه HR از زیرواحد S2 پروتئین S شدیداً محافظت شده است و نقش موثری در ادغام غشای ویروس با سلول میزبان دارد (11). فلذا در مطالعه حاضر یک اپی توپ از ناحیه HR انتخاب شد. همچنین ناحیه S<sub>1</sub> cleavage نیز تاثیر به‌سزایی در ورود ویروس به اندوزوم سلول میزبان دارد و جزء نقاط حساس برای تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس می‌باشد (12)، لذا یک اپی توپ نیز از این ناحیه انتخاب شد. علاوه بر این هم راستا با نتایج سایر مطالعات (2,13,14) با توجه به عدم محدودیت فضایی سلول T در شناسایی اپی توپ‌های مشتق از ویروس، از هر کدام از پروتئین‌های E, M و N یک اپی توپ دارای همپوشانی بین سلول T کشنده و یاریگر انتخاب شد که در ناحیه داخل ویرونی قرار گرفته بودند. از لینکر "GPGPG" به عنوان لینکر مناسب جهت اتصال اپی توپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت توالی حاصل (تصویر شماره 1).

به طول 176 آمینو اسید، با آنتی ژنیسیته 0/5477 در سرور Vaxijen v2.0، وزن مولکولی 18275/49 دالتون، نیمه عمر 20 ساعت در شرایط *in vitro* و 30 دقیقه در



تصویر شماره 1: توالی مولتی اپی توپ مناسب جهت سنتز واکسن

## References

- Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MRJV. Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies. *Viruses* 2020; 12(3): 254.
- Rasheed MA, Raza S, Zohaib A, Yaqub T, Rabbani M, Riaz MI, et al. In Silico Identification of Novel B Cell and T Cell Epitopes of Wuhan Coronavirus (2019-nCoV) for Effective Multi Epitope-Based Peptide Vaccine Production. *Preprints* 2020.
- ul Qamar MT, Shahid F, Ali U, Aslam S, Fatima I, Fareed AZ, et al. Structural modeling and conserved epitopes prediction against SARS-COV-2 structural proteins for vaccine development. *Research Square* 2020.

4. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host & Microbe* 2020; 27(3): 325-328.
5. Huang X, Pearce R, Zhang YJb. Computational Design of Peptides to Block Binding of the SARS-CoV-2 Spike Protein to Human ACE2. 2020.
6. Zhang C, Zheng W, Huang X, Bell EW, Zhou X, Zhang YJJopr. Protein structure and sequence re-analysis of 2019-nCoV genome refutes snakes as its intermediate host or the unique similarity between its spike protein insertions and HIV-1. *J Proteome Res* 2020; 19(4): 1351-1360.
7. Lurie N, Saville M, Hatchett R, Halton J. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. *N Engl J Med* 2020; 382: 1969-1973.
8. Enayatkhani M, Hasaniazad M, Faezi S, Guklani H, Davoodian P, Ahmadi N, et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an in silico study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2020 (just-accepted): 1-19.
9. Skwarczynski M, Toth IJCs. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci* 2016; 7: 842-854.
10. Chi X, Yan R, Zhang J, Zhang G, Zhang Y, Hao M, et al. A potent neutralizing human antibody reveals the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2 as a site of vulnerability. *Biorexiv* 2020.
11. Elshabrawy HA, Coughlin MM, Baker SC, Prabhakar BSJPo. Human monoclonal antibodies against highly conserved HR1 and HR2 domains of the SARS-CoV spike protein are more broadly neutralizing. *Plos One* 2012; 7(11): e50366.
12. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular cell* 2020; 78(4): 779-784.e5.
13. Grifoni A, Sidney J, Zhang Y, Scheuermann RH, Peters B, Sette AJC-H-M-D-. Candidate targets for immune responses to 2019-Novel Coronavirus (nCoV): sequence homology-and bioinformatic-based predictions. *Cell Host & Microbe* 2020.
14. Fast E, Chen BJb. Potential T-cell and B-cell Epitopes of 2019-nCoV. *Biorexiv* 2020.