



# การคาดคะเน Epitopes ของไวรัสนิปาห์สำหรับเซลล์ลิมโฟไซท์ชนิดบีและทีที่จำเพาะกับประชากรไทยโดยวิธี Immunoinformatics

## Prediction of Nipah Virus Epitopes for T and B lymphocytes Restricted to Thai Population Using Immunoinformatics Approaches

นีรนุช แสนกล้า และ นุชสุภา สุนทมาลา\*

Neeranuch Sankla and Nuchsupha Sunthamala\*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Biology Department, Faculty of Science, Mahasarakham University

Received : 14 November 2019

Revised : 9 January 2020

Accepted : 2 February 2020

### บทคัดย่อ

ไวรัสนิปาห์เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนโดยมีค้างคาวผลไม้เป็นพาหะที่สำคัญ ก่อให้เกิดการติดเชื้อและเกิดโรคไข้สมองอักเสบในคนและสัตว์ซึ่งอันตรายถึงชีวิต การตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันทำได้ยากทั้งยังไม่มียาต้านไวรัสและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสำหรับการติดเชื้อไวรัสนิปาห์ ประเทศไทยมีความเสี่ยงต่อการระบาดเนื่องจากมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสนิปาห์ในสายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกันกับที่มีการติดเชื้อในมาเลเซีย และมีการตรวจพบ RNA ของไวรัสนิปาห์จากตัวอย่างปัสสาวะของค้างคาวแม่ไก่ภาคกลาง โดยพบว่ามีไวรัสนิปาห์ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์บังกลาเทศและสายพันธุ์ที่พบการระบาดในประเทศมาเลเซีย ดังนั้นวัคซีนสำหรับการป้องกันการติดเชื้อจึงมีความจำเป็นอย่างมาก เนื่องจากเมื่อมีการติดเชื้อการนำเสนอแอนติเจนของ antigen-presenting cell (APC) ต่อเซลล์ที จะนำเสนอผ่านโมเลกุลของ HLA ซึ่งมีความจำเพาะของ HLA ผู้วิจัยจึงนำโปรตีนโครงสร้าง ได้แก่ โปรตีน fusion glycoprotein F0 (F) และ glycoprotein (G) ที่เป็นแอนติเจนของไวรัสที่พบบนอนุภาคของไวรัสและมีบทบาทสำคัญในกระบวนการติดเชื้อ ในการศึกษาความสามารถในการนำเสนอแอนติเจน โดยผ่านการนำเสนอแอนติเจนด้วย APC ซึ่งจะสามารถเชื่อมโยงไปยังระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยการคาดคะเนตำแหน่ง epitope ของโปรตีนที่สามารถถูกนำเสนอต่อเซลล์บีและเซลล์ทีที่จำเพาะต่อ HLA class I และ class II ของประชากรไทย จากงานวิจัยนี้พบว่า HLA ที่พบในประชากรไทยส่วนใหญ่สามารถนำเสนอโปรตีน F และ G ให้กับเซลล์บีและเซลล์ทีผ่านทาง HLA class I และ class II ได้โดยมี epitope หลายตำแหน่งด้วยกัน และครอบคลุมถึงไวรัสนิปาห์สายพันธุ์อินเดีย บังกลาเทศ และมาเลเซีย ซึ่งสามารถนำไปใช้สำหรับการออกแบบและพัฒนาเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสไวรัสนิปาห์ ที่มีความจำเพาะกับประชากรไทยได้ และส่งเสริมให้มีแนวทางในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อไวรัสนิปาห์ต่อไป นอกจากนี้จะส่งผลให้เพิ่มการยกระดับระบบด้านสุขภาพ สังคม รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย และสร้างระบบในการรองรับผู้ป่วย ทั้งด้านการเฝ้าระวัง การรักษา การวินิจฉัย และการป้องกันควบคุมโรคไม่ให้แพร่ระบาดในวงกว้างได้

คำสำคัญ : Immunoinformatics ; ไวรัสนิปาห์ ; โปรตีน G ; โปรตีน F

\*Corresponding author. E-mail : nuchsupha.s@msu.ac.th



## Abstract

Nipah virus (NiV) causes a zoonotic disease by transmission from fruit bats as an important carrier to human. The infections lead to life-threatening encephalitis in humans and animals. Diagnosis is currently difficult, and there are no effective antiviral drugs and vaccines for NiV infection. Thailand is at risk of the outbreak because of a report of the detection of NiV specific antibodies in a strain similar to the infection in Malaysia. Viral RNA of NiV from urine sample of *Pteropus lylei* in Thailand are detected and viral strains resemble to Bangladesh and Malaysia strains. Therefore, vaccines for the prevention of infections are crucial necessary. During viral infection, the viral antigens are presented to T cells by the presentation of antigen-presenting cells (APCs) via HLA molecules, which are specific to HLA alleles. Therefore, the structural proteins are fusion glycoprotein F0 (F) and glycoprotein (G) proteins were subjected to target molecules for study. These proteins are antigenic molecules on the viral particle and involve in the infection process. To determine the immunogenic capacity of F and G protein by presenting of APCs, which can be linked to enhance adaptive immunity. The epitope position of proteins that can be presented to B cells and T cells via specific HLA class I and class II-restricted to Thai population were predicted. In this study, the most common HLA alleles found in Thai population can present F and G proteins to B cells and T cells with several epitopes. These epitopes from both proteins were also conserved in NiV strain from India, Bangladesh, and Malaysia. Suggest that the F and G protein of NiV can be used for design and developed as a vaccine to prevent NiV specific infection in Thai people. Furthermore, this will able to increase the health quality, social and environmental systems in Thailand and establish a system to support patients including surveillance, treatment, diagnosis, and prevention of disease outbreaks in a wide range.

**Keywords :** immunoinformatics ; Nipah virus ; glycoprotein ; Fusion Glycoprotein F0

## บทนำ

ไวรัสนิปาห์ (nipah virus หรือ NiV) เป็นโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คน (zoonotic diseases) เช่น ค้างคาวผลไม้ สุนัข ม้า แมว แพะ หรือแกะ เป็นต้น โดยมีค้างคาวผลไม้เป็นพาหะที่สำคัญ ก่อให้เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงในระบบทางเดินหายใจและเกิดโรคใช้สมองอักเสบในคนและสัตว์ซึ่งอันตรายถึงชีวิต (Aditi & Shariff, 2019) ไวรัสนิปาห์สามารถติดต่อได้จากการสัมผัสหรือรับประทานสิ่งที่ปนเปื้อนปัสสาวะ อุจจาระ และน้ำลายของค้างคาวหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ (Broder *et al.*, 2015; Thakur & Bailey, 2019) การตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันทำได้ยาก อีกทั้งยังไม่มียาต้านไวรัสและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและรักษาการติดเชื้อไวรัสนิปาห์ (Pickering *et al.*, 2016) โดยองค์การอนามัยโลกจัดให้ไวรัสนิปาห์อยู่ใน 10 อันดับแรกของโรคที่อาจมีการแพร่ระบาดครั้งใหญ่ในอนาคต และมีแนวโน้มที่จำเป็นต้องมีการวิจัยและพัฒนาอย่างเร่งด่วน (World Health Organization, 2018) จากการรายงานของกรมควบคุมโรค ณ วันที่ 2 มิถุนายน พ.ศ. 2561 (Department of Disease Control,



2018) ยังไม่พบรายงานผู้ป่วยจากการติดเชื้อไวรัสชิคาโกในประเทศไทย แต่ทั้งนี้ก็มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เนื่องจากการสำรวจในค้างคาวไทยจากหลายภูมิภาคพบที่มีความชุกของการติดเชื้อไวรัสชิคาโก 6.29% (Wiwanitkit, 2017) มีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสชิคาโก ในค้างคาวหลายชนิด ได้แก่ ค้างคาวแม่ไก่เกาะ (*Pteropus hypomelanus*) ค้างคาวแม่ไก่ป่าฝน (*Pteropus vampyrus*) ค้างคาวแม่ไก่ภาคกลาง (*Pteropus lylei*) และค้างคาวหน้ายักษ์สามหลืบ (*Hipposideros larvatus*) เป็นต้น ซึ่ง 2 สายพันธุ์แรกเป็นสายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงกันกับที่มีการติดเชื้อในประเทศมาเลเซีย (Wacharapluesadee *et al.*, 2005) และจากรายงานการตรวจสอบ RNA ของไวรัสชิคาโกด้วยวิธี duplex nested RT-PCR (nRT-PCR) จากตัวอย่างปัสสาวะของค้างคาวแม่ไก่ภาคกลาง พบว่ามีไวรัสชิคาโก 2 สายพันธุ์ในประเทศไทย คือ สายพันธุ์บังกลาเทศและสายพันธุ์ที่พบการระบาดในประเทศมาเลเซีย (Wacharapluesadee & Hemachudha, 2007) อีกทั้งขณะนี้ประเทศไทยมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อไวรัสชิคาโก ที่เป็นโรคอุบัติใหม่ทั้งภายในประเทศและในประเทศที่มีการระบาด และได้มีการประกาศว่าเป็นโรคติดต่ออันตรายตามพระราชบัญญัติโรคติดต่อ พ.ศ. 2558 จากกระทรวงสาธารณสุขเพื่อยกระดับให้มีการเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง (Ministry of Public Health, 2015) ดังนั้นจึงต้องมีการสร้างระบบในการรองรับผู้ป่วย ทั้งด้านการเฝ้าระวัง การรักษา การวินิจฉัย และการป้องกันควบคุมโรคเพื่อไม่ให้แพร่ระบาดในวงกว้าง

ไวรัสชิคาโกอยู่ในวงศ์ *Paramyxoviridae* สกุล *Henipavirus* เป็นไวรัสที่มี enveloped รูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) มีจีโนมที่เข้ารหัสโปรตีนแบ่งได้เป็นโปรตีนแบบเป็นโครงสร้าง (structural proteins) และโปรตีนแบบไม่เป็นโครงสร้าง (nonstructural proteins) โดยโปรตีนแบบเป็นโครงสร้างของไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ matrix protein (M) nucleoprotein (N) fusion glycoprotein F0 (F) และ glycoprotein (G) ส่วนของโปรตีนแบบไม่เป็นโครงสร้าง ได้แก่ phosphoprotein (P) nonstructural protein (V) protein (W) และ protein (C) (De Wit & Munster, 2015; Mazzola & Kelly-Cirino, 2019; Ojha *et al.*, 2019) ไวรัสชิคาโกเป็นไวรัสที่จัดอยู่ในความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 4 (Biosafety Level 4 pathogens) ที่มีอัตราการเสียชีวิตสูง (Pickering *et al.*, 2016) ยังไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อ ทำได้เพียงหลีกเลี่ยงการสัมผัสสัตว์ที่มีโอกาสติดเชื้อและการรักษาตามอาการ ได้แก่ การใช้ยาต้านไวรัสโรบาไวรัส (Ribavirin) ที่มีฤทธิ์ในการแทรกแซงการทำงานของ RNA ทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และช่วยให้อัตราการตายลดลง 36% (Chong *et al.*, 2001) มีการศึกษาเพื่อพัฒนาวัคซีนสำหรับไวรัสชิคาโกเป็นจำนวนมากแต่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการผลิตวัคซีน (Broder *et al.*, 2015) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสชิคาโก จึงเป็นสิ่งที่ท้าทายอย่างมาก เนื่องจากเมื่อมีการติดเชื้อการนำเสนอแอนติเจนของ antigen-presenting cell (APC) ต่อเซลล์ที (T cell) ในรูปแบบสายเปปไทด์และจะนำเสนอผ่านโมเลกุลของ HLA โดย CD4<sup>+</sup> T cells จะจับกับแอนติเจนที่ถูกนำเสนอผ่าน HLA class II ส่วน CD8<sup>+</sup> T cells จะจับแอนติเจนที่ถูกนำเสนอผ่าน HLA class I (Yatim & Lakkis, 2015) ซึ่งมีความจำเพาะของ HLA และยังไม่มีการศึกษาใน HLA ที่จำเพาะในคนไทย ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสชิคาโกจะส่งผลให้สามารถที่จะยกระดับระบบด้านสุขภาพ สังคม รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมในประเทศไทยได้

การติดเชื้อไวรัสชิคาโกนั้นข้อสันนิษฐานว่าไวรัสสามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ โปรตีนของไวรัสชิคาโก สามารถยับยั้งการผลิต interferon (IFN) แต่ยังไม่ทราบกลไกในการหลบหลีกที่ชัดเจนและข้อมูลเกี่ยวกับการตอบสนอง



ของภูมิคุ้มกันมีไม่มาก ทั้งนี้เนื่องจากเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงเป็นอย่างมาก เมื่อมีการติดเชื้อแล้วทำให้ยากต่อการรักษา (Prescott *et al.*, 2012) ดังนั้นวัคซีนสำหรับการป้องกันการติดเชื้อจึงมีความจำเป็นอย่างมาก โปรตีนแบบเป็นโครงสร้างจึงเป็นแอนติเจนที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกัน โดยมีการพัฒนาวัคซีนจาก glycoprotein หรือจากโปรตีนแบบเป็นโครงสร้าง และมีการศึกษาในสัตว์ทดลอง (Satterfield *et al.*, 2016) แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จสำหรับการนำมาใช้ในมนุษย์และในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเพื่อพัฒนาวัคซีนสำหรับคนไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงคิดค้นการนำโปรตีนแบบเป็นโครงสร้าง ได้แก่ โปรตีน F และโปรตีน G ที่เป็นแอนติเจนของไวรัสที่พบบนอนุภาคของไวรัสและมีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อ มาศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะซึ่งจะสามารถเชื่อมโยงไปถึงระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป

การฉีดวัคซีน เป็นการฉีดสารชนิดหนึ่งเข้าไปในร่างกายเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคต่าง ๆ แบบจำเพาะเจาะจง ซึ่งวัคซีนรูปแบบดั้งเดิมจะเป็นการลดความรุนแรงของเชื้อโดยวิธีทางกายภาพหรือทางเคมี เมื่อมีความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์เพิ่มมากขึ้นจึงได้มีการพัฒนาวัคซีนชนิด subunit vaccines ที่เป็นการนำชิ้นส่วนของเชื้อโรคมาพัฒนาเป็นวัคซีน (Lei *et al.*, 2019) ในปัจจุบันมีการพัฒนา epitope-based vaccines ที่มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการวิจัยวัคซีน เนื่องจากความรู้เกี่ยวกับกลไกการรับรู้ของเซลล์ภูมิคุ้มกันและการเกิดปฏิสัมพันธ์กับแอนติเจนของเชื้อก่อโรคในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์ และมีการคาดการณ์ต่อ epitopes ของเซลล์บีและเซลล์ที ที่เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (Hajissa *et al.*, 2019) epitope-based vaccines เป็นวัคซีนที่มีการระบุ epitope ของแอนติเจนที่จะทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างมีประสิทธิภาพสูง (Ojha *et al.*, 2019) มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ มีความจำเพาะสูง มีความปลอดภัย สะดวกในการผลิตและการเก็บรักษา เป็นต้น โดยทั่วไป subunit vaccines ที่ใช้ epitope (epitope-based subunit vaccines) จะประกอบด้วย epitopes หลายชนิด (multiple epitopes) (Lei *et al.*, 2019) ซึ่งเป็น epitopes ที่มี antigenic สูง ที่จะสามารถกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และด้านสารน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ojha *et al.*, 2019)

การวิจัยนี้จะเป็นศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยการคาดคะเนหาตำแหน่ง epitope ของโปรตีนที่สามารถถูกนำเสนอต่อเซลล์บีเพื่อการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส และนำเสนอต่อเซลล์ทีผ่านทาง HLA class I และ class II ที่จำเพาะต่อประชากรไทย เพื่อนำไปพัฒนาให้เป็นวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดต่อไป อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมให้มีแนวทางในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสร้างระบบในการรองรับผู้ป่วยทั้งด้านการเฝ้าระวัง การรักษา การวินิจฉัย และการป้องกันควบคุมโรคไม่ให้แพร่ระบาดในวงกว้างได้

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเลือกโปรตีนและศึกษาโครงสร้างของไวรัสชนิดนี้

โปรตีนของไวรัสชนิดนี้แบ่งออกเป็นโปรตีนแบบเป็นโครงสร้างและโปรตีนแบบไม่เป็นโครงสร้าง โดยเลือกลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนแบบเป็นโครงสร้าง ได้แก่ โปรตีน G (QBQ56723) และ โปรตีน F (NP\_112026) จากฐานข้อมูล NCBI (National Centre for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ในรูปแบบ FASTA สำหรับศึกษา



โครงสร้างโปรตีนแบบ 3D โดยให้ฐานข้อมูล SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Waterhouse *et al.*, 2018) โดยคัดเลือกโปรตีน G จำนวน 1 ตัว ที่ได้จากตัวอย่างมนุษย์ 4 ราย และค้างคาวผลไม้ (*Pteropus medius*) 3 ตัว จากการระบาดในปี พ.ศ. 2561 ณ ประเทศอินเดีย (Yadav *et al.*, 2019) ที่มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ในบังกลาเทศ ที่มี accession number เป็น AEZ01397 AEZ01382 และ AEZ01389 มีระดับความคล้ายคลึง 98.84% 99.00% และ 99.00% ตามลำดับ และมีความคล้ายคลึงกับในประเทศมาเลเซีย ที่มี accession number เป็น CBM41034 ADN51995 และ AAK50554 ที่มีระดับความคล้ายคลึง 95.85% 95.85% และ 95.51% และคัดเลือกโปรตีน F จำนวน 1 ตัว ที่ได้จากตัวอย่างของผู้ป่วยจำนวน 265 ราย รวมถึงผู้เสียชีวิตจำนวน 105 ราย จากการระบาดในประเทศมาเลเซียในปี พ.ศ. 2541-2542 และผู้ป่วยที่เสียชีวิตจำนวน 11 ราย ในประเทศสิงคโปร์ (Chua *et al.*, 2000) ที่มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์มาเลเซีย ที่มี accession number เป็น AAK50553 CBM41033 และ AAK50544 ที่มีระดับความคล้ายคลึง 100.00% 99.45% และ 100.00% ตามลำดับ และสายพันธุ์ในบังกลาเทศ ที่มี accession number เป็น QCY59091 QCY59085 และ QCY59079 ที่มีระดับความคล้ายคลึง 98.90% 98.90% และ 98.90% ตามลำดับ และ ที่ได้รับการตรวจสอบความคล้ายคลึงจากโปรแกรม BLAST (ชนิด blastp) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

## 2. ศึกษาความถี่ของชนิด HLA class I และ class II ที่พบได้มากในประชากรไทย

สืบค้นชนิดของ HLA class I และ class II ที่พบได้มากในประชากรไทยจากฐานข้อมูลของ <http://www.allelefrequencies.net/default.asp>

## 3. คาดคะเนหาตำแหน่ง B-cell epitope ของโปรตีน F และ โปรตีน G ของไวรัสชิคาโก

คาดคะเนการย่อยและนำเสนอผ่านเซลล์บีของโปรตีน G (602 กรดอะมิโน) และโปรตีน F (564 กรดอะมิโน) โดยการสืบค้นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในรูปแบบของ FASTA มาคาดคะเนความเป็นไปได้ในการจับกับเซลล์บีโดยใช้ฐานข้อมูล BepiPred-2.0 และ IEDB analysis resource (Dhanda *et al.*, 2019; Fleri *et al.*, 2017; Jespersen *et al.*, 2017) และใช้เกณฑ์ (cut off) ของ epitope probability ที่ 0.5-1.0 ในการคัดเลือก

## 4. การคาดคะเนหาตำแหน่ง T-cell epitope ของ HLA class I และ class II ของโปรตีน F และ โปรตีน G ของไวรัสชิคาโก

ศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยการคาดคะเนการย่อยและนำเสนอผ่าน HLA class I และ class II โดยใช้เปปไทด์ขนาด 9 และ 15 กรดอะมิโนตามลำดับ ของโปรตีน G (602 กรดอะมิโน) และโปรตีน F (564 กรดอะมิโน) โดยการสืบค้นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในรูปแบบของ FASTA มาคาดคะเนความเป็นไปได้ในการจับกับ HLA class I และ class II โดยใช้ฐานข้อมูล IEDB analysis resource, NetCTLpan (สำหรับ HLA class I), และ NetMHCIIpan (สำหรับ HLA class II) (Dhanda *et al.*, 2019; Fleri *et al.*, 2017; Sanchez-Trincado *et al.*, 2017; Schneidman-Duhovny *et al.*, 2018) และใช้เกณฑ์ (cut off) ของ epitope probability ที่มี Percentile Rank ที่ต่ำซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการจับได้ดี จากฐานข้อมูล IEDB analysis resource และ % Rank ที่แสดงความเป็น epitope จากฐานข้อมูล NetCTLpan (สำหรับ HLA class I) และ % Rank ที่แสดงความเป็น strong binders และ weak binders จากฐานข้อมูล NetMHCIIpan (สำหรับ HLA class II) ในพิจารณาและคัดเลือก



### 5. การศึกษาตำแหน่งอนุรักษ์ของ epitope (epitope conservancy prediction)

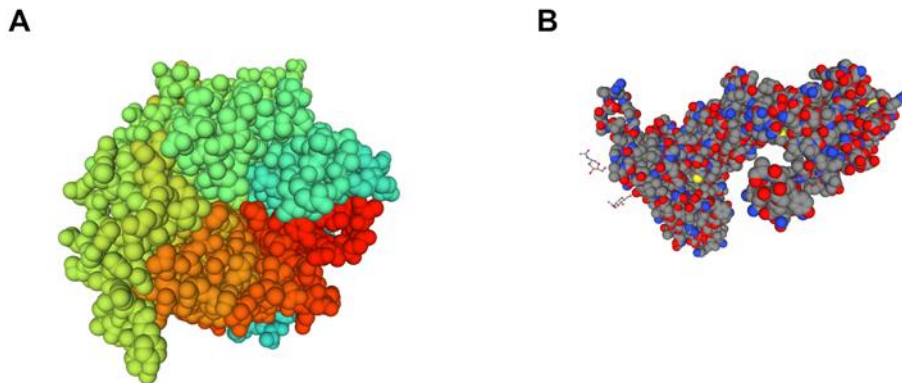
การคาดคะเนตำแหน่งอนุรักษ์ของ epitope (epitope conservancy prediction) สำหรับเซลล์บีและเซลล์ที โดยทำการศึกษา epitope conservancy prediction ในโปรตีน G และโปรตีน F ของไวรัสหมีในสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้รับการตรวจสอบความคล้ายคลึงของสายพันธุ์จากโปรแกรม BLAST ดังนี้ สำหรับโปรตีน F ได้แก่ โปรตีน F (NP\_112026) เป็นสายพันธุ์มาเลเซีย รวมถึงโปรตีน F สายพันธุ์มาเลเซียจากตัวอย่างอื่น ๆ (AAK50553 CBM41033 และ AAK50544) และโปรตีน F จากสายพันธุ์บังกลาเทศ (QCY59091 QCY59085 และ QCY59079) และสำหรับโปรตีน G ได้แก่ โปรตีน G (QBQ56723) เป็นสายพันธุ์อินเดีย โปรตีน G จากสายพันธุ์บังกลาเทศ (AEZ01397 AEZ01382 และ AEZ01389) และโปรตีน G จากสายพันธุ์มาเลเซีย (CBM41034 ADN51995 AAK50554) โดยการสืบค้นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในรูปแบบของ FASTA และลำดับของ epitope ของเซลล์บีและเซลล์ทีที่ได้จากการศึกษา มาคาดคะเนตำแหน่งอนุรักษ์ของ epitope ของเซลล์บีวิเคราะห์แบบ Epitope discontinuous sequence conservancy และเซลล์ทีวิเคราะห์แบบ Epitope linear sequence conservancy โดยใช้ Epitope Conservancy Analysis จากฐานข้อมูลของ IEDB Analysis Resource (Bui *et al.*, 2007; Fler *et al.*, 2017)

### ผลการวิจัย

#### 1. โครงสร้างของโปรตีน G และโปรตีน F

โปรตีน G และโปรตีน F เป็นโปรตีนแบบเป็นโครงสร้างของไวรัส โดยโครงสร้างของโปรตีน G (ภาพที่ 1A) มี C-terminal globular head ยื่นออกจากเยื่อหุ้มไวรัสบน stalk มีรูปร่าง overall disk-like shape ที่มี 6 blades ล้อมรอบ central cavity เป็นโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ประเภท II มีบทบาทในการรับรู้และจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ โดยจะจับกับ ephrin-B2/-B3 ที่แสดงออกในเซลล์ endothelium และ smooth muscle ในสมอง ปอด รก และต่อมลูกหมากในระดับสูง จากนั้นโปรตีน F (ภาพที่ 1B) ที่มีรูปร่างเหมือนต้นไม้ โดยมี F glycoprotein จำนวน 3 ชุด twined รอบแกนกลาง (Axis-T) ที่ขนานกับ C-terminal helical bundle จะเริ่มการหลอมรวมเมมเบรนของไวรัสและโฮสต์ ขณะที่มีการจำลองตัวของไวรัสโปรตีน F จะถูกสังเคราะห์และแยกออกเป็นหน่วยย่อย F1 และ F2 จากนั้นจะถูกส่งกลับเข้าไปยังผิวเซลล์เพื่อรวมเข้ากับอนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสสำหรับการหลอมรวมระหว่างเซลล์ที่ติดเชื่อและไม่ติดเชื่อ

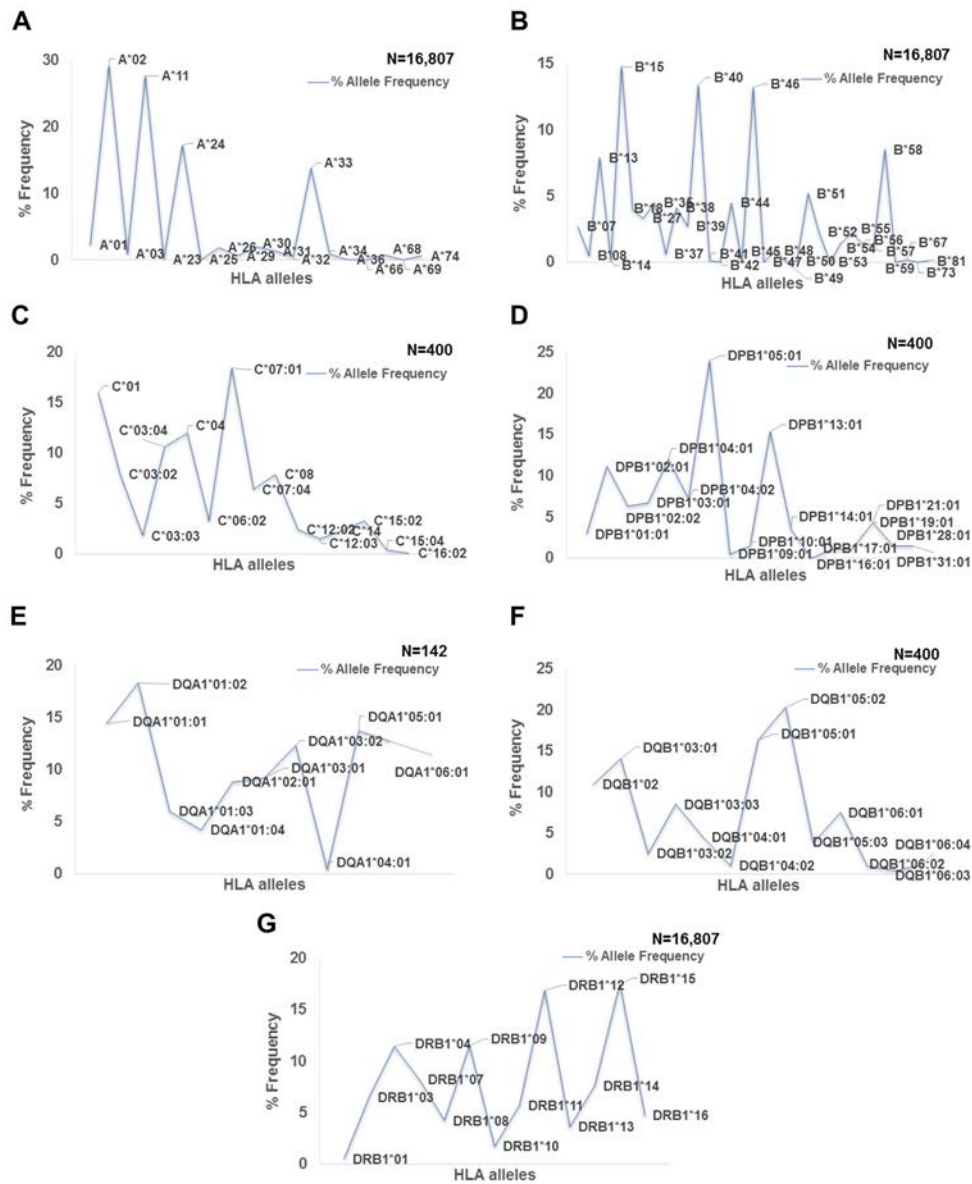




ภาพที่ 1 โครงสร้าง 3D ของโปรตีน G (A) และโปรตีน F (B)

## 2. ศึกษาความถี่ของชนิด HLA class I และ class II ที่พบได้มากในประเทศไทย

จากการสืบค้นฐานข้อมูลของ <http://www.allelefrequencies.net/default.asp> เพื่อหาชนิดของ HLA class I และ class II allele ที่พบได้มากในประเทศไทย โดยฐานข้อมูลได้แสดงข้อมูลจากจำนวนประชากรไทย พบว่ามีความถี่ของ HLA class I และ class II allele ในประชากรไทยส่วนใหญ่ โดยมี HLA class I allele ได้แก่ HLA-A\*02 HLA-A\*11 และ HLA-A\*24 มีความถี่ 29.2 27.7 17.3 และ 13.8% ตามลำดับ (ภาพที่ 2A) HLA-B\*15 HLA-B\*40 และ HLA-B\*46 ความถี่ 14.8 13.4 และ 13.2% ตามลำดับ (ภาพที่ 2B) HLA-C\*01 HLA-C\*03:04 HLA-C\*04 และ HLA-C\*07:01 ความถี่ 15.9 10.6 12.0 และ 18.4% ตามลำดับ (ภาพที่ 2C) ส่วน HLA class II allele ได้แก่ HLA-DPB1\*02:01 HLA-DPB1\*04:01 HLA-DPB1\*05:01 และ HLA-DPB1\*13:01 ความถี่ 11.1 12.0 24.0 และ 15.4% ตามลำดับ (ภาพที่ 2D) HLA-DQA1\*01:01 HLA-DQA1\*01:02 และ HLA-DQA1\*05:01 ความถี่ 14.4 18.3 และ 13.7% ตามลำดับ (ภาพที่ 2E) HLA-DQB1\*03:01 HLA-DQB1\*05:01 และ HLA-DQB1\*05:02 ความถี่ 14.1 16.3 และ 20.3% ตามลำดับ (ภาพที่ 2F) HLA-DRB1\*04 HLA-DRB1\*09 HLA-DRB1\*12 และ HLA-DRB1\*15 ความถี่ 14.4 11.5 16.9 และ 17.5% ตามลำดับ (ภาพที่ 2G)



**ภาพที่ 2** กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความถี่ของ HLA ที่พบในประชากรไทย HLA class I allele ได้แก่ HLA-A (1A) HLA-B (1B) และ HLA-C (1C) HLA class II allele ได้แก่ HLA-DPB1 (1D) HLA-DQA1 (1E) HLA-DQB1 (1F) และ HLA-DRB1 (1G)





### 3. การคาดคะเนหาตำแหน่ง B-cell epitope ของโปรตีน G และโปรตีน F

ศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยการคาดคะเนการนำเสนอต่อเซลล์บีของโปรตีน G และโปรตีน F โดยการสืบค้นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในรูปแบบของ FASTA มาคาดคะเนความเป็นไปได้ในการจับกับเซลล์บีโดยใช้ฐานข้อมูล BepiPred-2.0 และ IEDB analysis resource

จากการคาดคะเนตำแหน่ง B-cell epitope ของโปรตีน G ของไวรัสชนิดนี้ที่มีความยาว 602 กรดอะมิโน โดยใช้ 2 ฐานข้อมูล จะเห็นได้ว่า epitope ของโปรตีน G สามารถถูกนำเสนอให้กับเซลล์บีได้ดีในตำแหน่งต่าง ๆ ได้แก่ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 7-42 95-110 137-146 156-159 209-214 241-246 258-262 274-277 304-313 325-334 375-397 420-423 และ 489-498 โดยสามารถนำเสนอได้ทั้งในตำแหน่งที่เป็น helix sheet และ coil (ตารางที่ 1)

จากการคาดคะเนตำแหน่ง B-cell epitope ของโปรตีน F ของไวรัสชนิดนี้ที่มีความยาว 564 กรดอะมิโน โดยใช้ 2 ฐานข้อมูลเปรียบเทียบกัน จะเห็นได้ว่า epitope ของโปรตีน Fusion Glycoprotein F0 สามารถถูกนำเสนอให้กับ B cell ได้ดีในตำแหน่งต่าง ๆ ได้แก่ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 26-34 66-78 98-106 188-194 216-225 236-238 240-263 325-332 343-354 - 360-374 433-445 452-458 469-486 และ 524-543 โดยสามารถนำเสนอได้ทั้งในตำแหน่งที่เป็น helix sheet และ coil (ตารางที่ 2)

จากการคาดคะเนตำแหน่ง B-cell epitope ของโปรตีนทั้ง 2 จะเห็นได้ว่า B-cell epitope ของโปรตีน G มีค่าความน่าจะเป็นในการเป็น epitope อยู่ที่ 0.497-0.596 และมีค่าเฉลี่ยค่าความน่าจะเป็นในการเป็น epitope อยู่ที่ 0.545 ส่วนโปรตีน F มีค่าความน่าจะเป็นในการเป็น epitope อยู่ที่ 0.512-0.628 และมีค่าเฉลี่ยค่าความน่าจะเป็นในการเป็น epitope อยู่ที่ 0.542 ดังนั้นโปรตีนทั้ง 2 มี epitope ที่สามารถถูกนำเสนอให้กับเซลล์บีได้ดีโดยไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นกลยุทธ์ในการนำไปใช้พัฒนาวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ในอนาคต

### 4. การคาดคะเนหาตำแหน่ง T-cell epitope ของ HLA class I และ class II ของโปรตีน G และโปรตีน F ของไวรัสชนิดนี้

ศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยการคาดคะเนการย่อยและนำเสนอผ่าน HLA class I และ class II โดยใช้เปปไทด์ขนาด 9 และ 15 กรดอะมิโนตามลำดับ ของโปรตีน G (602 กรดอะมิโน ภาพที่ 3A) และโปรตีน F (564 กรดอะมิโน, ภาพที่ 3B) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบจาก 2 ฐานข้อมูล

โปรตีน G พบว่าสามารถถูกนำเสนอผ่าน HLA class I และ class II allele ได้ โดยสามารถนำเสนอผ่าน HLA class I allele ชนิด HLA-A\*02:01 ในตำแหน่งที่ 201 512 และ 45 HLA-A\*11:01 ในตำแหน่งที่ 561 76 284 407 137 และ 343 HLA-A\*24:02 ในตำแหน่งที่ 363 308 285 406 และ 363 HLA-A\*33:03 ในตำแหน่งที่ 67 HLA-B\*15:01 ในตำแหน่งที่ 343 558 278 197 และ 408 HLA-B\*40:01 ในตำแหน่งที่ 103 532 543 และ 327 HLA-B\*46:01 ในตำแหน่งที่ 343 160 58 และ 48 HLA-C\*01:02 ในตำแหน่งที่ 48 และ HLA-C\*04:01 ในตำแหน่งที่ 406 และใน HLA class II allele สามารถนำเสนอผ่าน HLA-DRB1\*04:01 ในตำแหน่งที่ 511 510 509 507 และ 508 HLA-DRB1\*09:01 ในตำแหน่งที่ 226 และ 227 HLA-DRB1\*12:01 ในตำแหน่งที่ 195 196 404 และ 511 และ HLA-DRB1\*15:01 ในตำแหน่งที่ 43 44 42 63 64 และ 65

โปรตีน F พบว่าสามารถถูกนำเสนอผ่าน HLA class I และ class II allele ได้ โดยสามารถนำเสนอผ่าน HLA class I allele ชนิด HLA-A\*02:01 ในตำแหน่งที่ 382 491 206 508 และ 114 HLA-A\*11:01 ในตำแหน่งที่ 24 197 513 512 และ 490



HLA-A\*24:02 ในตำแหน่งที่ 274 280 295 96 และ 206 HLA-A33:03 ในตำแหน่งที่ 74 523 และ 367 HLA-B\*15:01 ในตำแหน่งที่ 68 206 60 266 และ 490 HLA-B\*40:01 ในตำแหน่งที่ 195 30 126 365 และ 151 HLA-B\*46:01 ในตำแหน่งที่ 206 344 60 และ 167 และ HLA-C\*01:02 ในตำแหน่งที่ 60 และใน HLA class II alleleสามารถนำเสนอผ่าน HLA-DRB1\*04:01 ในตำแหน่งที่ 312 311 313 310 และ 309 HLA-DRB1\*09:01 ในตำแหน่งที่ 370 371 116 372 และ 373 HLA-DRB1\*12:01 ในตำแหน่งที่ 55 56 และ 57 และ HLA-DRB1\*15:01 ในตำแหน่งที่ 305 306 และ 307

**ตารางที่ 1** แสดง epitope ของโปรตีน G ที่มีความเป็นไปได้สูงในการที่จะถูกนำเสนอ

Position	Epitope	Epitope Probability
7-42	K-R-ENT-SDKGNPSKV-KSY---MD-KKINEGLL	0.595703704
95-110	KG--DK-GT--GPK-S	0.497354167
137-146	S--EN-NEKC	0.571355556
156-159	HE-N	0.568583333
209-214	VWGQSG	0.570259259
241-246	SRGVSK	0.537370370
258-262	RGDEV	0.507888889
274-277	SNPN	0.511027778
304-313	I--STYW-GS	0.577122222
325-334	NNG-S-NQHQ	0.527366667
375-397	FKYNDSN-PVAK-QYSKPEN-RL	0.557594203
420-423	DEEN	0.513194444
489-498	GQSQ-PRFNT	0.548377778
Mean of Epitope Probability		0.544861413

- Sheet Probability
- Coil Probability
- Helix Probability
- Buried
- Peptide Exposed



**ตารางที่ 2** แสดง epitope ของโปรตีน F ที่มีความเป็นไปได้สูงในการที่จะถูกนำเสนอ

Position	Epitope	Epitope Probability
26-34	GI-HYEK-S	0.533641975
66-78	SNMSQ-TGS--EN	0.527478632
98-106	KNN-HDLVG	0.556037037
188-194	DK-S-KQ	0.524396825
216-225	PN-Q---SNS	0.586911111
236-238	GGN	0.512148148
240-263	ET—RT-G-ATED-DD—ESD--T	0.531944444
325-332	N-EIGF-L	0.518333333
342-354	QDYATP-TN--RE	0.536461538
360-374	TEK-P-EL-VSS--P	0.528651852
433-445	LGSV-YNSEG-AI	0.533487179
452-458	DK-D--S	0.531857143
469-486	Q-KD--KE-QR--DT-NP	0.533154321
524-543	TY-RLE-RRVRPTSSGD-YY	0.627816667
Mean of Epitope Probability		0.541594300

- Sheet Probability
- Coil Probability
- Helix Probability
- Buried
- Peptide Exposed

5. การคาดคะเนตำแหน่งอนุรักษ์ของ epitope (epitope conservancy prediction) ของโปรตีน G และโปรตีน F ของไวรัสโคโรนา

จากการวิเคราะห์ตำแหน่งอนุรักษ์ของ epitope (epitope conservancy prediction) ของโปรตีน G และ F ที่เลือกที่สามารถถูกนำเสนอผ่านเซลล์บีและเซลล์ทีสำหรับประชากรไทย แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง epitope ของโปรตีน G ในสายพันธุ์ที่เลือกที่สามารถถูกนำเสนอผ่านเซลล์บี มีลำดับโปรตีนที่ตรงกันกับสายพันธุ์มาเลเซียและบังกลาเทศที่ 12.50-100% (ตารางภาคผนวกที่ 1) และตำแหน่ง epitope ที่สามารถถูกนำเสนอผ่านเซลล์ที มีลำดับโปรตีนที่ตรงกันกับสายพันธุ์มาเลเซียและบังกลาเทศที่ 12.50-100% และ 62.50-100% สำหรับ HLA class I และ class II ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 2) สำหรับโปรตีน F ในสายพันธุ์ที่เลือกที่สามารถถูกนำเสนอผ่านเซลล์บี มีลำดับโปรตีนที่ตรงกันกับสายพันธุ์มาเลเซียและบังกลาเทศ

ที่ 100% (ตารางภาคผนวกที่ 3) และตำแหน่ง epitope ที่สามารถถูกนำเสนอผ่านเซลล์ที่มีลำดับโปรตีนที่ตรงกันกับสายพันธุ์มาเลเซียและบังกลาเทศที่ 88.89-100% และ 93.33-100% สำหรับ HLA class I และ class II ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 4)

จากการคาดคะเนตำแหน่งอนุรักษ์ของ epitope ของโปรตีนทั้ง 2 จะเห็นได้ว่า B-cell epitope และ T-cell epitope ที่เลือกสามารถถูกนำเสนอผ่านเซลล์บีและเซลล์ทีสำหรับประชากรไทยได้ โดยมี epitope หลายตำแหน่งด้วยกัน และมีความครอบคลุมถึงสายพันธุ์ไวรัสชนิดเดียว บังกลาเทศ และมาเลเซีย บ่งชี้ได้ว่า epitope ดังกล่าวสามารถเลือกไปใช้สำหรับการออกแบบและพัฒนาเป็นวัคซีนไวรัสชนิดเดียวในอนาคต โดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ epitope เพื่อป้องกันไวรัสชนิดที่รวมไปถึงไวรัสชนิดอื่นด้วย บังกลาเทศ และมาเลเซีย

**A**



**B**



ภาพที่ 3 แสดง Epitope mapping ของโปรตีน G (A) และโปรตีน F (B) ที่สามารถถูกนำเสนอผ่านทาง HLA class I และ class II



## วิจารณ์ผลการวิจัย

ไวรัสชนิดนี้เป็นโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนที่มีผลกระทบอย่างรุนแรงต่อประชากรโลก ก่อให้เกิดโรคตั้งแต่การติดเชื้อเฉียบพลันจนถึงใช้สมองอักเสบเรื้อรัง ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้รับผลกระทบอย่างรุนแรงโดยการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้มีอัตราการตายของผู้ป่วยอยู่ที่ประมาณ 40-75% (World Health Organization, 2018) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มียาที่ผ่านการอนุมัติสำหรับรักษามนุษย์ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาวัคซีนป้องกัน โดยใช้โปรตีนของไวรัสที่เป็นโปรตีนโครงสร้างที่ยื่นออกมาจากชั้น envelope เรียกว่า spike ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ (Broder *et al.*, 2015; Prescott *et al.*, 2012) ในการศึกษาครั้งนี้เราได้ศึกษาเพื่อออกแบบวัคซีนที่มีศักยภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้สำหรับประชากรไทย โดยพิสูจน์ว่าแอนติเจนที่ใช้สามารถถูกนำเสนอด้วยเซลล์บีและเซลล์ทีโดยผ่าน HLA class I และ class II allele ที่จำเพาะต่อประชากรไทยได้

สำหรับการศึกษาโครงสร้างของ glycoprotein (โปรตีน G) ที่เป็นโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ประเภท II ที่มี C-terminal globular head ยื่นออกจากเยื่อหุ้มไวรัส และมี receptor สำหรับจับกับ ephrin-B2/-B3 ที่แสดงออกในเซลล์โฮสต์ สำหรับการเข้าไปติดเชื้อในเซลล์ และ Fusion Glycoprotein F0 (โปรตีน F) ที่มี F glycoprotein จำนวน 3 ชุด twined รอบแกนกลาง (Axis-T) ที่ขนานกับ C-terminal helical bundle ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มรวมเมมเบรนของไวรัสและโฮสต์ จะเห็นได้ว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้พบในอนุภาคไวรัสและมีบทบาทสำคัญในกระบวนการติดเชื้อของไวรัส มีรายงานว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่มีโปรตีน G ของไวรัสเป็นเป้าหมายมีประสิทธิภาพในการรักษาหลังการติดเชื้อ (post-exposure treatment) ต่อไวรัสเฮนตราและไวรัสชนิดนี้ในสัตว์ทดลอง (พังพอน (ferrets) และลิงเซียวาฟริกกัน (Broder *et al.*, 2015) และการใช้วัคซีนจากเชื้อที่อ่อนฤทธิ์ (attenuated vaccinia viruses) ของ recombinant NiV F และ/หรือ G พบว่าสามารถป้องกันไวรัสชนิดนี้หลังการ challenge ได้อย่างสมบูรณ์ในหนูแฮมสเตอร์ (Thakur & Bailey, 2019) ดังนั้นโปรตีน F และ โปรตีน G จึงเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญและมีความเป็นไปได้ในการออกแบบและพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้

ในการใช้วัคซีนสำหรับการป้องกันและเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน เป้าหมายของวัคซีนคือการสร้างและกระตุ้นเซลล์บีและเซลล์ที โดยเซลล์บีทำหน้าที่ผลิตภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำที่เรียกว่าแอนติบอดี โดยการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน ขณะที่เซลล์ทีจะทำหน้าที่ด้านการตอบสนองทางด้านเซลล์ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ ซึ่งวิธีการที่สามารถกระตุ้นเซลล์ทีได้ดีคือการกระตุ้นผ่าน dendritic cells (DCs) ที่เป็น APCs ที่สำคัญ (Palucka & Banchereau, 2013) โดยในการนำเสนอแอนติเจนของ APCs ต่อเซลล์ทีจะนำเสนอผ่านโมเลกุลของ HLA โดย CD4<sup>+</sup> T cells จะจับกับแอนติเจนที่ถูกนำเสนอผ่าน HLA class II ส่วน CD8<sup>+</sup> T cells จะจับแอนติเจนที่ถูกนำเสนอผ่าน HLA class I (Yatim & Lakkis, 2015) มีรายงานการศึกษาการใช้วัคซีนที่เป็น multi-epitope-based subunit vaccine เช่น ในการศึกษา multi-epitope protein (MEP) vaccine ที่สร้างจาก epitopes ของเซลล์บีและเซลล์ที ต่อการติดเชื้อ *Trichinella spiralis* ในหนูทดลอง พบว่ามีความปลอดภัยกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันทั้งด้านสารน้ำและด้านเซลล์ ช่วยป้องกันการติดเชื้อ *T. spiralis* และสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนอื่น ๆ (Gu *et al.*, 2017) การศึกษา multi-epitope vaccines ที่มี aluminium เป็น adjuvant ต่อเชื้อ HIV-1 พบว่าวัคซีนที่ออกแบบสามารถกระตุ้นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ multi-epitope ได้ในระดับสูงในหนูทดลอง แสดงให้เห็นถึงกลยุทธ์ใหม่ในการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการสร้าง



ภูมิคุ้มกันต่อ HIV-1 (Ding *et al.*, 2000) และในการศึกษา multi-epitope DNA vaccine จาก *Brucella abortus* ต่อโรค บรูเซลโลสิส (Brucellosis) ในสัตว์ทดลองพบว่า multi-epitope DNA vaccine ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะ ทางด้านสารน้ำและด้านเซลล์ในหนู BALB/c และกระตุ้นให้เกิดการป้องกันอย่างมีนัยสำคัญ (Escalona *et al.*, 2017) เป็นต้น จากการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการกระตุ้นของ multiepitope-based subunit vaccine แสดงให้เห็นว่า multiepitope-based subunit vaccine เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจและมีการศึกษาเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสและมะเร็งจนถึงปัจจุบัน (Gu *et al.*, 2017) สำหรับไวรัสชิปามีรายงานว่าการศึกษาการออกแบบวัคซีนแบบ multiepitope-based subunit vaccine โดยใช้วิธี next-generation vaccine designing โดยเลือก 8 โปรตีนของไวรัส ประกอบไปด้วย โปรตีนโครงสร้าง ได้แก่ โปรตีน M (matrix protein) โปรตีน N (nucleoprotein) โปรตีน F (fusion glycoprotein F0 และโปรตีน G (glycoprotein) และโปรตีนที่ไม่เป็นโครงสร้าง ได้แก่ โปรตีน P (phosphoprotein) โปรตีน V โปรตีน W และโปรตีน C เป็นโปรตีนที่ไม่แสดงความคล้ายคลึงกับโปรตีนของมนุษย์จึงมีศักยภาพในการเป็นวัคซีนทดลอง (vaccine candidates) และพบว่ามี epitope ที่สามารถนำเสนอผ่าน HLA class II ได้แก่ HLA-DRB1\*07:01 HLA-DRB5\*01:01 HLA-DRB1\*13:02 และ HLA-DRB1\*15:01 ได้ โดยเป็น HLA ครอบคลุมประชากรในประเทศต่าง ๆ ที่มีการกระจายตัวของไวรัส ได้แก่ ออสเตรเลีย แอฟริกา บังกลาเทศ กัมพูชา จีน อินเดีย อินโดนีเซีย มาดากัสการ์ มาเลเซีย ปาปัวนิวกินี ประเทศไทย และอื่น ๆ ที่อาจนำไปศึกษาในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองต่อไป (Ojha *et al.*, 2019) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาว่า LAEDDTNAQKT ของโปรตีน G เป็น epitope ที่สามารถถูกนำเสนอให้กับเซลล์บีได้ และสามารถถูกนำเสนอให้กับเซลล์ที่ผ่าน HLA-C12\*03 ได้และจำเป็นต้องมีการศึกษาในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองต่อไป (Parvege *et al.*, 2016) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาดังกล่าวยังไม่พบการศึกษาที่มีความจำเพาะและครอบคลุมต่อ HLA ในประชากรไทย ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า HLA ที่พบในประชากรไทยส่วนใหญ่ โดย HLA class I allele ได้แก่ HLA-A\*02 HLA-A\*11 HLA-A\*24 HLA-B\*15 HLA-B\*40 HLA-B\*46 HLA-C\*01 HLA-C\*03:04 HLA-C\*04 HLA-C\*07:01 ส่วน HLA class II allele ได้แก่ HLA-DPB1\*02:01 HLA-DPB1\*04:01 HLA-DPB1\*05:01 HLA-DPB1\*13:01 HLA-DQA1\*01:01 HLA-DQA1\*01:02 HLA-DQA1\*05:01 HLA-DQB1\*03:01 HLA-DQB1\*05:01 HLA-DQB1\*05:02 HLA-DRB1\*04 HLA-DRB1\*09 HLA-DRB1\*12 และ HLA-DRB1\*15 เป็น HLA ที่ใช้สำหรับนำไปศึกษาการคาดคะเนความสามารถในการนำเสนอโปรตีนให้กับเซลล์บีและเซลล์ที

ในการคาดคะเนการนำเสนอโปรตีนต่อเซลล์บีผู้วิจัยพบว่าโปรตีน G และโปรตีน F สามารถถูกนำเสนอให้กับเซลล์บีได้ดีในตำแหน่งต่าง ๆ ได้หลายตำแหน่งด้วยกัน โดยสามารถนำเสนอได้ทั้งในตำแหน่งที่เป็น helix sheet และ coil แสดงให้เห็นว่าโปรตีน G และโปรตีน F มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำมาใช้ในการกระตุ้นเซลล์บี และสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าวได้ ขณะเดียวกันในการคาดคะเนการนำเสนอโปรตีนต่อเซลล์ที ผู้วิจัยพบว่า HLA allele ที่พบในประชากรไทยส่วนใหญ่สามารถนำเสนอโปรตีน G และโปรตีน F ผ่านทาง HLA class I และ class II allele ได้โดยมี epitope หลายตำแหน่งด้วยกันซึ่งมีความจำเพาะและครอบคลุมต่อประชากรไทย นอกจากนี้ยังครอบคลุมถึงไวรัสชิป้าในสายพันธุ์อินเดีย บังกลาเทศ และมาเลเซีย ดังนั้นโปรตีนดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำมาใช้ในการกระตุ้นเซลล์ทีได้ ดังนั้นในการศึกษานี้พบว่ามีหลาย epitope ของ โปรตีน G และโปรตีน F ของไวรัสชิป้า ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างอาจเป็นแอนติเจน ที่มี





ประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป จำเป็นต้องมีการตรวจสอบศึกษาในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบผลการวิจัย

### สรุปผลการวิจัย

glycoprotein (โปรตีน G) และ Fusion Glycoprotein F0 (โปรตีน F) เป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัส โดยโครงสร้างของโปรตีน G มี C-terminal globular head ยื่นออกจากเยื่อหุ้มไวรัสบน stalk ที่มีบทบาทในการรับรู้และจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ โดยจะจับกับ ephrin-B2/-B3 ที่แสดงออกในเซลล์โฮสต์ จากนั้นโปรตีน F ที่มี F glycoprotein จำนวน 3 ชุด twined รอบแกนกลาง (Axis-T) จะเริ่มการหลอมรวมเมมเบรนของไวรัสและโฮสต์ และโปรตีน G และ F สามารถถูกนำเสนอให้กับ B cell ได้ดีโดยมีตำแหน่ง B-Cell epitope โดยสามารถนำเสนอได้ทั้งในตำแหน่งที่เป็น helix sheet และ coil ในการศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยการคาดคะเนการย่อยและนำเสนอผ่าน HLA class I และ class II allele สำหรับประชากรไทย แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองมี epitope สำหรับ HLA class I allele และ HLA class II allele ที่สามารถถูกนำเสนอโดย antigen-presenting cells ผ่าน HLA class I และ class II molecules ได้ จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า โปรตีน G และ F มีแนวโน้มในการนำไปศึกษาและทำการวิจัยต่อไปแบบ *in vitro* และ *in vivo* สำหรับการนำไปใช้พัฒนาวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัส nipah ในประชากรไทย อีกทั้งยังครอบคลุมถึงไวรัส nipah สายพันธุ์อินเดีย บังกลาเทศ และมาเลเซีย และส่งเสริมให้มีแนวทางในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อไวรัส nipah ต่อไป นอกจากนี้จะส่งผลให้เพิ่มการยกระดับระบบด้านสุขภาพ สังคม รวมไปถึงสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย และสร้างระบบในการรองรับผู้ป่วย ทั้งด้านการเฝ้าระวัง การรักษา การวินิจฉัย และการป้องกันควบคุมโรคไม่ให้แพร่ระบาดในวงกว้างได้

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในการสนับสนุนอุปกรณ์ในการวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- Aditi, & Shariff, M. (2019). Nipah virus infection: A review. *Epidemiology and Infection*, 147, e95. 1-6.
- Broder, C. C., Xu, K., Nikolov, D. B., Zhu, Z., Dimitrov, D. S., Middleton, D., Pallister, J., Geisbert, T. W., Bossart, K. N., & Wang, L. F. (2015). A treatment for and vaccine against the deadly Hendra and Nipah viruses. *Antiviral Research*, 100(1), 8–13.
- Bui, H-H., Sidney, J., Lim W., Fussedder, N., & Sette, A. (2007). Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8, 361, doi:10.1186/1471-2105-8-361.



- Chong, H. T., Kamarulzaman, A., Tan, C. T., Goh, K. J., Thayaparan, T., Kunjapan, S. R., Chew, N. K., Chua, K. B., & Lam, S. K. (2001). Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin. *Annals of Neurology*, 49(6), 810–813.
- Chua, K. B., Bellini, W. J., Rota, P. A., Harcourt, B. H., Tamin, A., Lam, S. K., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R., Shieh, W., Goldsmith, C. S., Gubler, D. J., Roehrig, J. T., Eaton, B., Gould, A. R., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, A. E., Peters, C. J., Anderson, L. J., & Mahy, B. W. (2000). Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, 26, 288(5470), 1432-5.
- Department of Disease Control. (2018). *Disease Control Department asked the public aware, but do not panic. Thailand has not found Nipah virus-infected patients. The infection can be prevented by avoiding close contact with fruit bats and secretions*. Retrieved November 1, 2019, from <https://www.riskcomthai.org/2017/detail.php?id=37522>. (in Thai)
- De Wit, E., & Munster, V. J. (2015). Animal models of disease shed light on Nipah virus pathogenesis and transmission. *Journal of Pathology*, 235(2), 196–205.
- Dhanda, S. K., Mahajan, S., Paul, S., Yan, Z., Kim, H., Jespersen, M. C., Jurtz, V., Andreatta, M., Greenbaum, J. A., Marcatili, P., Sette, A., Nielsen, M., & Peters, B. (2019). IEDB-AR: immune epitope database—analysis resource in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W502–W506.
- Ding, J., Lu, Y., & Chen, Y-H. (2000). Candidate multi-epitope vaccines in aluminium adjuvant induce high levels of antibodies with predefined multi-epitope specificity against HIV-1. *EMS Immunology and Medical Microbiology*, 29, 123-127.
- Escalona, E., Sáez, D., & Oñate, A. (2017). Immunogenicity of a Multi-Epitope DNA Vaccine Encoding Epitopes from Cu-Zn Superoxide Dismutase and Open Reading Frames of *Brucella abortus* in Mice. *Front Immunol*, 8, 125, 1-10.
- Fleri, W., Paul, S., Dhanda, S. K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B., & Sette, A. (2017). The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–16.
- Gu, Y., Sun, X., Li, B., Huang, J., Zhan, B., & Zhu, X. (2017). Vaccination with a Paramyosin-Based Multi-Epitope Vaccine Elicits Significant Protective Immunity against *Trichinella spiralis* Infection in Mice. *Front Microbiol*, 3, 8,1475.
- Hajjisa, H., Zakaria, R., Suppian, R., & Mohamed, Z. (2019). Epitope-based vaccine as a universal vaccination strategy against *Toxoplasma gondii* infection: A mini-review. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(2), 174–182.



- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M. & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W24–W29.
- Lei, Y., Zhao, F., Shao, J., Li, Y., Li, S., Chang, H., & Zhang, Y. (2019), Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines. *PeerJ*, 1-48.
- Mazzola, L. T., & Kelly-Cirino, C. (2019). Diagnostics for Nipah virus: a zoonotic pathogen endemic to Southeast Asia. *BMJ Global Health*, 4(Suppl 2), e001118, 1-10.
- Ministry of Public Health. (2015). *Guidelines for reporting communicable diseases and communicable disease surveillance Disease Act 2558*. Retrieved November 1, 2019, from [http://odpc8.ddc.moph.go.th/upload\\_epi\\_article/dWoQeKhEGHvLqR1IfCYF.pdf](http://odpc8.ddc.moph.go.th/upload_epi_article/dWoQeKhEGHvLqR1IfCYF.pdf). (in Thai)
- Ojha, R., Pareek, A., Pandey, R. K., Prusty, D., & Prajapati, V. K. (2019). Strategic Development of a Next-Generation Multi-Epitope Vaccine To Prevent Nipah Virus Zoonotic Infection. *ACS Omega*, 4(8), 13069–13079.
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2013). Dendritic cell-based cancer therapeutic vaccines Karolina. *Immunity*, 39(1), 38–48.
- Parvege, M. M., Rahman, M., Nibir, Y. M., & Hossain, M. S. (2016). Two highly similar LAEDDTNAQKT and LTKIGTEI epitopes in G glycoprotein may be useful for effective epitope based vaccine design against pathogenic Henipavirus. *Computational Biology and Chemistry*, 61, 270-280.
- Pickering, B. S., Hardham, J. M., Smith, G., Weingartl, E. T., Dominowski, P. J., Foss, D. L., Mwangi, D., Broder, C. C., Roth, J. A., & Weingartl, H. M. (2016). Protection against henipaviruses in swine requires both, cell-mediated and humoral immune response. *Vaccine*, 34(40), 4777–4786.
- Prescott, J., de Wit, E., Feldmann, H., & Munster, V. J. (2012). The immune response to Nipah virus infection. *Archives of Virology*, 157(9), 1635–1641.
- 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, 1-14.
- Satterfield, B. A., Dawes, B. E., & Milligan, G. N. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for Nipah virus: Prepared for WHO PD-VAC July 30, 2015. *Vaccine*, 34(26), 2971–2975.
- Schneidman-Duhovny, D., Khuri, N., Dong, G. Q., Winter, M. B., Shifrut, E., Friedman, N., Craik, C. S., Pratt, K. P., Paz, P., Aswad, F., & Sali, A. (2018). Predicting CD4 T-cell epitopes based on antigen cleavage, MHCII presentation, and TCR recognition. *PLoS ONE*, 13(11), 1–22.
- Thakur, N., & Bailey, D. (2019). Advances in diagnostics, vaccines and therapeutics for Nipah virus. *Microbes and Infection*, 1-9.



- Wacharapluesadee, S., & Hemachudha, T. (2007). Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. *Journal of Virological Methods*, 141(1),97-101.
- Wacharapluesadee, S., Lumlerdacha, B., Boongird, K., Wanghongsa, S., Chanhome, L., Rollin, P., Stockton, P., Rupprecht, C. E., Ksiazek, T. G., & Hemachudha, T. (2005). Bat Nipah virus, Thailand. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1949–1951.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303.
- Wiwanitkit, V. (2017). Nipah Virus Infection in Thailand: Status. *Journal of Neuroinfectious Diseases*, 08(01), 7326.
- World Health Organization. (2018). *Nipah virus*. Retrieved November 1, 2019, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/nipah-virus>.
- Yadav, P. D., Shete, A. M., Kumar, G. A., Sarkale, P., Sahay, R. R., Radhakrishnan, C., Lakra, R., Pardeshi, P., Gupta, N., Gangakhedkar, R. R., Rajendran, V. R., Sadanandan, R., & Mourya, D. T. (2019). Nipah Virus Sequences from Humans and Bats during Nipah Outbreak, Kerala, India, 2018. *Emerging infectious diseases*, 25(5).
- Yatim, K. M., & Lakkis, F. G. (2015). A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1274–1281.