

Potensi Vaksin *Hemagglutinin Stem* berbasis HA-Ferritin Nanopartikel sebagai Inovasi Vaksin Influenza Universal

Yulia Cahya Khasanah, Dara Marissa Widya Purnama, Fadel Muhammad

Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

Abstrak

Influenza merupakan penyakit pernapasan dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi di seluruh dunia. Setiap tahun terdapat 3-5 juta kasus influenza berat dan 250.000 sampai 500.000 diantaranya mengalami kematian. Penanganan kasus influenza menekankan pada upaya preventif yaitu vaksin. Namun, kelemahan vaksin konvensional adalah pembuatannya harus disesuaikan dengan *strain* influenza yang berkembang pada musim berikutnya. Karakteristik utama dari virus influenza terdapat pada *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA). Target vaksin influenza universal adalah HA *stem region* yang memiliki sifat tidak mengalami perubahan genetik. HA *stem* influenza memiliki epitop konservatif penginduksi *broad neutralizing antibodies* (bnAbs). Namun, aktivitas induksinya sering terganggu karena adanya HA *head region*. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemotongan HA *head region* melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mendapat HA *stem region* murni. Antibodi yang diinduksi oleh HA termodifikasi ini adalah *broad neutralizing antibodies* (bnAbs). *Broadly neutralizing antibodies* dapat bereaksi silang dengan influenza varian lainnya. Keunggulan bnAbs tersebut berpotensi untuk menetralkan semua *strain* influenza baik yang sudah ada ataupun yang baru muncul. Untuk meningkatkan efektivitas vaksin, digunakan nanopartikel *ferritin* sebagai pelindung vaksin yang potensial. HA *stem* digabungkan dengan *ferritin* melalui teknik rekayasa genetika dengan cara *bio-active* sehingga terbentuk HA *stem* yang memanjang pada permukaan *ferritin*. Berdasar uraian tersebut, vaksin *hemagglutinin stem* berbasis HA-*ferritin* nanopartikel berpotensi sebagai vaksin universal protektif jangka panjang. [JK Unila. 2016; 1(2): 443-449]

Kata kunci: *ferritin* nanopartikel, HA *stem region*, vaksin influenza

The Potency of *Hemagglutinin Stem* Vaccine Based on HA-Ferritin Nanoparticle as Universal Influenza Vaccine

Abstract

Influenza is a respiratory illness with high mortality and morbidity all around the world. Annually, influenza reaches 3-5 billion in number of severe cases while 250.000-500.000 people among the cases died. Influenza cases management emphasizes vaccination as an important tool by preventive means. However, conventional vaccine has weakness. The production of conventional vaccine needs to be adjusted with influenza strain prediction that will attack on the next season. The main characteristics of influenza virus are hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Universal influenza vaccine targets HA stem region which is stable through genetic mutation. Influenza HA-stem has conservative epitope which enable induction of broad neutralizing antibodies (bnAbs). Meanwhile, the induction activity often disturbed by HA head region. With this aim in mind, the dissection of HA head region using Polymerase Chain Reaction (PCR) to gain purified HA stem is necessary. Antibody induced by this modified HA is broad neutralizing antibodies (bnAbs). Broad neutralizing antibodies can cross-react all variants type of influenza. That bnAbs capability creates possible neutralizing activity against existing and newly emerged influenza virus. To increase vaccine effectiveness, ferritin nanoparticle is used as potential vaccine protector. HA stem is combined with ferritin through genetic engineering that stabilize ferritin nanoparticle in bio-active mechanism so that HA stem will be self-assembled in ferritin surface. Therefore, HA stem vaccine based on HA-ferritin nanoparticle is effective as long term protective universal influenza vaccine. [JK Unila. 2016; 1(2): 443-449]

Keyword: ferritin nanoparticle, HA stem region, influenza vaccine

Korespondensi: Yulia Cahya Khasanah, alamat Jl. Gatot Subroto No. 55 C, HP 08984939054, e-mail yuliack18@gmail.com

Pendahuluan

Influenza merupakan penyakit yang mengancam kesehatan di seluruh dunia. Virus influenza merupakan determinan utama morbiditas dan mortalitas akibat penyakit pernapasan.^{1,2} Influenza terjadi secara global dengan tingkat serangan pertahunnya 5-10% pada dewasa dan 20-30% pada anak-anak. Di dunia setiap tahunnya terdapat tiga sampai lima juta kasus penyakit influenza berat dan

250.000 sampai 500.000 mengalami kematian.³ Penyakit influenza memiliki komplikasi yang jauh lebih berat pada anak dibandingkan dengan usia dewasa, diantaranya adalah rinitis, otitis media, manifestasi gastrointestinal, kejang demam, bronkiolitis, miopati, pneumonia, otitis media, dan ensefalopati.⁴

Pengobatan influenza saat ini adalah dengan menggunakan obat golongan

retroviral. Akan tetapi, penanganan yang lebih efektif adalah dengan menggunakan vaksinasi sebagai pencegahannya. Pada beberapa negara, telah dianjurkan memberikan vaksin influenza pada anak sehat berumur 6–23 bulan, baik untuk mengurangi risiko terkena infeksi, mengurangi risiko penularan dari orang lain, dan mengurangi penularan kepada orang dewasa. Rekomendasi pemberian vaksin influenza pada anak sehat berguna untuk menghadapi pandemik influenza dan menurunkan penyebaran kasus. WHO tahun 2004 telah membuat panduan regional maupun nasional di seluruh negara di dunia. Persiapan ini perlu dilakukan sebagai pelayanan esensial dan mengurangi beban sosial ekonomi pada pandemi. Pandemi influenza akan terjadi apabila virus influenza baru timbul. Tidak satu manusiapun yang kebal terhadap virus baru tersebut, sehingga akan menyebabkan epidemi di seluruh dunia dan diramalkan dapat membunuh banyak orang.⁴

Pendekatan vaksin konvensional mengutamakan kecocokan antara *strain* virus dan isolat yang terdapat dalam vaksin. Tetapi upaya tersebut tidak mudah dikarenakan beberapa faktor. Pertama, virus influenza dapat berubah secara konstan setiap tiga sampai lima tahun. Bagian *strain* utamanya digantikan dengan varian yang telah mengalami perubahan antigen agar terhindar dari respon antibodi. Selain itu, persiapan isolat vaksin harus diseleksi setiap tahun berdasarkan survei intensif dari *World Health Organization* (WHO). Kedua, proses pembuatan vaksin harus disesuaikan dengan prediksi *strain* influenza yang berkembang pada musim berikutnya. Ketidakpastian prediksi tersebut dapat mengurangi efektifitas vaksin dalam mempengaruhi respon imun.^{4,5} Oleh karena itu, perlu inovasi preventif dengan menggunakan vaksin universal dan protektif jangka panjang yang dapat menekan frekuensi administrasi vaksin secara terus menerus dan mencegah infeksi dari semua varian virus influenza serta aman digunakan anak-anak.

Virus influenza A, B dan C merupakan famili *Orthomyxovirus* yang beramplop dengan RNA genom rantai tunggal, sense negatif dan bersegmen. Virus ini diklasifikasikan berdasarkan perbedaan antigen *nukleoprotein* (NP) dan matriks

protein (M1) sebagai komponen struktural mayor. Sedangkan karakteristik utama yang dimiliki semua virus influenza adalah *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA).⁶ *Hemagglutinin* memiliki dua bagian yaitu *head* dan *stem region*. Respon antibodi terhadap influenza terfokus primer pada HA *head region* yang dapat mengalami perubahan genetik setiap musim. Sementara itu, HA *stem region* jauh lebih stabil dan mudah dikenali sehingga antibodi yang bertarget *stem region* dapat berikatan dengan semua variasi subtipe HA. Oleh karena itu, dengan menggunakan HA *specific stem region* dapat menjadi titik fokus dalam pengembangan vaksin virus influenza yang universal dan protektif jangka panjang.⁷

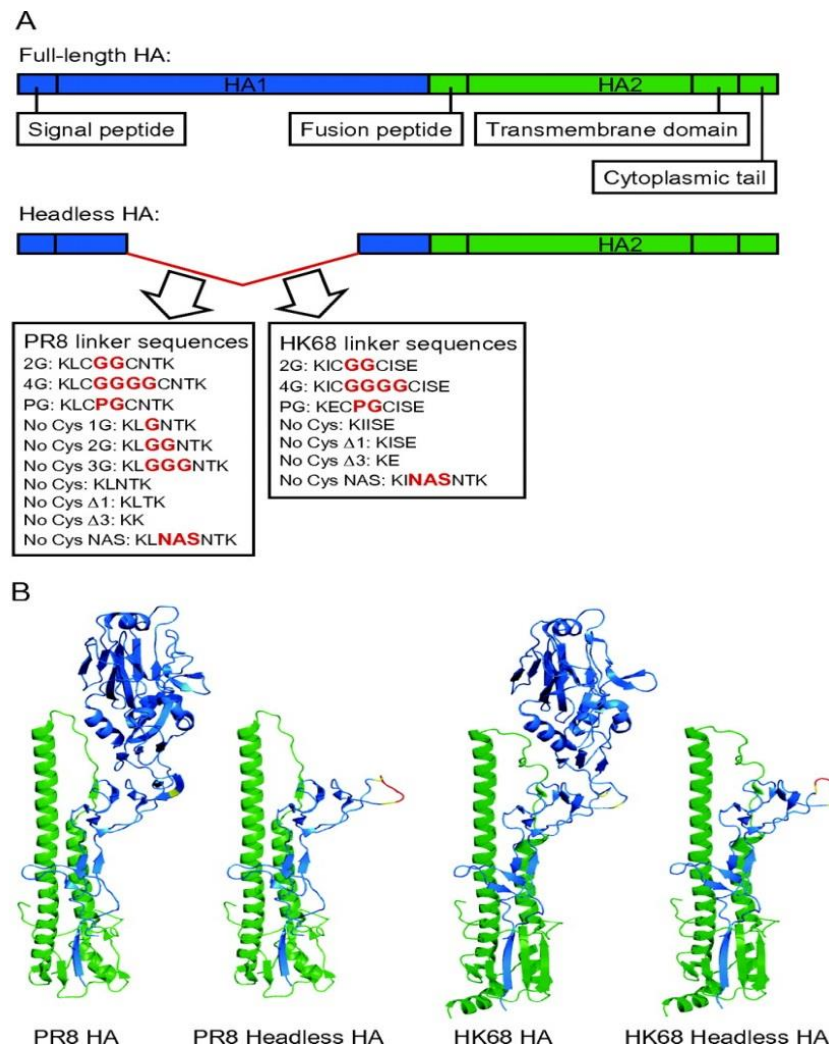
ISI

Vaksin HA menggunakan prinsip induksi antibodi penetralisir rantai dan struktur spesifik virus. Hampir seluruh antibodi penetralisir memiliki spesifisitas tinggi terhadap epitop immunodominan yang sangat variatif pada kepala HA. Antibodi akan memberi respon awal dengan mencegah perlekatan HA virus pada reseptor asam sialat inang dan menghambat pelepasan replikasi virus. Selain itu, vaksin yang menggunakan HA sebagai antigen target dari antibodi memberikan respon imunogenik optimal dalam mencegah keparahan dan kematian. Kelemahan dari vaksin HA adalah spesifisitas tinggi antibodi hanya terhadap *head region* HA karena strukturnya yang tebal menutupi struktur *stem* HA dibawahnya. Reaksi tidak terjadi pada bagian *stem* HA yang berakibat antibodi hanya mengenali satu jenis strain virus Influenza spesifik *head region*.⁸ Oleh sebab itu, perlu adanya modifikasi dengan menghilangkan *head region* dari virus influenza dan menyisakan *stem* HA sehingga vaksin dapat memberi perlindungan pada semua heterosubtype influenza. Modifikasi HA dapat dilakukan dengan teknik rekayasa genetika pada RNA segmen 4 sebagai pengkode HA semua virus influenza.⁸

Hemagglutinin bagian *head* dan *stem* dihubungkan oleh ikatan fusi peptida, dimana bagian yang selalu ditemukan adalah ikatan disulfida sistein 52 dan 277 pada bagian *head*. Putaran HA yang dihubungkan oleh ikatan disulfida tersebut terdiri dari domain kepala globular sementara N-terminal 51 dan C-

terminal 52 asam amino memanjang kebawah untuk membentuk jembatan sistein dan berkontribusi terhadap regio *stem* virus. Karena strukturnya yang berupa putaran dan letak proksimal sistein 52 dan 277, penggantian dari putaran tersebut dengan peptida penghubung pendek diharap tidak mengganggu putaran dan lipatan molekul HA yang tersisa. Berdasarkan prinsip ini, pembuatan *headless* HA terdiri dari beberapa

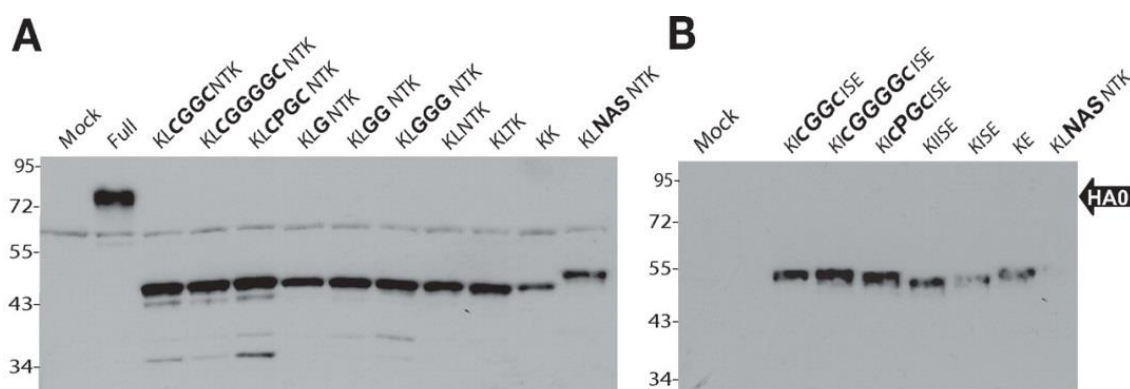
proses. Pertama, pemotongan *head region* virus influenza menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Peptida penghubung yang mengkode sekuens dari dua glisin (2G), empat glisin (4G) atau sebuah prolin dan glisin (PG) disisipkan pada bingkai terbuka hemagglutinin virus influenza sekuens Cys 53 dan Cys 276. Dalam hal ini virus yang dipakai adalah H1N1 (PR8) dan H3N2 (HK68).



Gambar 1. (A) Struktur linear HA influenza secara utuh (atas) dan *headless* HA secara umum (bawah). (B) Skema struktur berlipat HA secara utuh dan *headless* dari PR8 virus (kiri) dan HK68 virus (kanan).⁵

Selanjutnya hasil modifikasi menjalani tes untuk meninjau integritas dan stabilitas protein dengan *western blotting*. Hasilnya

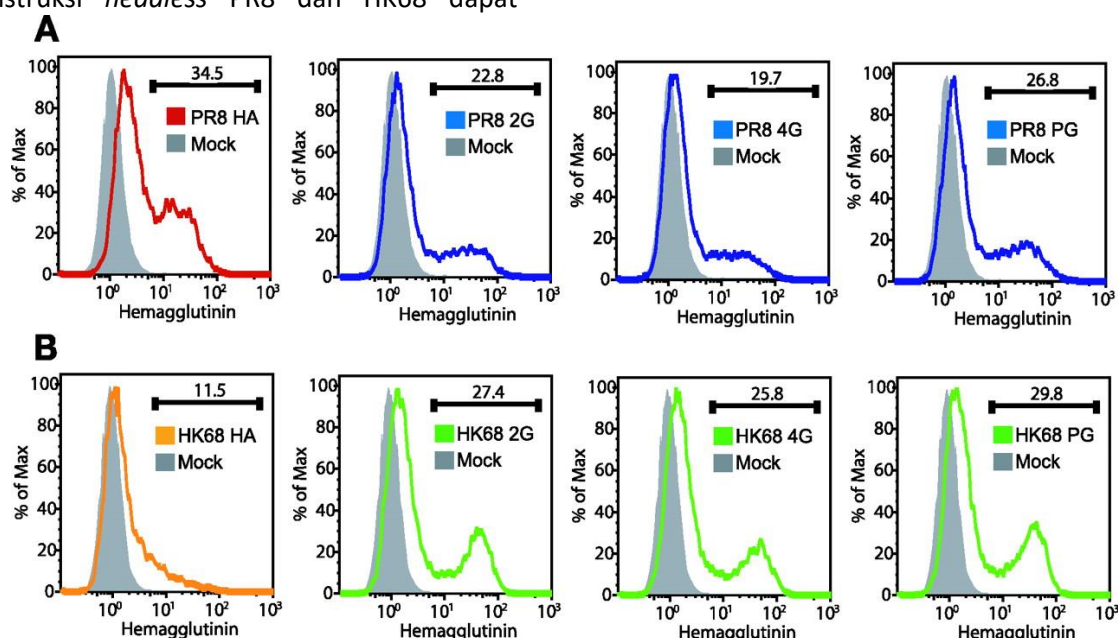
adalah *steady-state* tertinggi dihasilkan oleh sekuens Cys 52 dan Cys 277 yang dihubungkan peptida 4G.



Gambar 2. (A) Konstruksi berbasis PR8; (B) Konstruksi berbasis HK68. Berat molekul dari protein HK68 HA0 secara utuh ditunjukkan panah.⁵

Langkah terakhir untuk menguji apakah *headless* HA juga ditransportasikan ke sel membrane, maka dilakukan uji *Fluorescence-Activated Cell Sorter* (FACS). Hasilnya konstruksi *headless* PR8 dan HK68 dapat

terdeteksi, hal ini mengindikasikan transport konstruksi dari kompleks golgi ke sel membran tidak terganggu dengan dilepaskannya domain globular kepala virus.⁵



Gambar 3. (A) Sel transfeksi dengan serum imun 3951 (abu-abu) dibandingkan dengan sel transfeksi pDZ PR8 HA (merah) atau sel transfeksi dengan pCAGGS PR8 2G, 4G, PG *headless* HA (biru). (B) Sel transfeksi dengan MAb 12D1 (abu-abu) dibandingkan dengan sel transfeksi pCAGGS HK68 HA (oranye) atau sel transfeksi pCAGGS HK68 2G, 4G, PG *headless* HA (hijau).⁵

Pada penelitian yang telah dilakukan Tharakaraman, ditemukan bahwa bagian batang atau *stem region* dari HA memiliki berbagai epitop. Epitop tersebut diantaranya adalah CR8020, CR 9114, CR6261, C179, dan epitope lainnya. Keunikan epitope pada HA *stem* adalah fungsi pemicuan *broad neutralizing antibodies* (bnAbs) yaitu antibodi yang bertarget regio konservatif dari segala jenis virus.⁹ BnAbs juga diteliti dapat bereaksi silang dengan influenza varians lainnya sehingga berpotensi untuk menetralkan semua

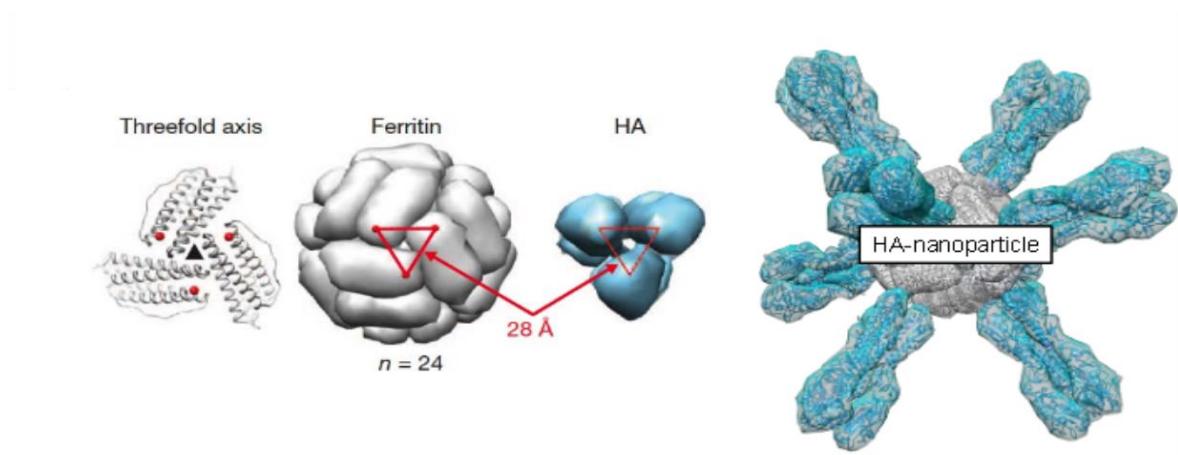
strain influenza baik yang sudah ada ataupun yang baru muncul.¹⁰

Ferritin nanopartikel dapat ditemukan hampir disetiap organisme sebagai iron pengikat protein yang berasal dari *Helicobacter pylori*. Bentuk partikelnya *spherical* dengan oktahedral simetri yang terdiri dari 24 subunit dan merupakan nanopartikel yang umum. *Ferritin* memiliki peranan sebagai *biomedical imaging agent*, *semiconductor* dan pelindung vaksin yang potensial. Campuran antigen HA *stem*

berepitop dengan *ferritin* nanopartikel dapat menjadi vaksin yang universal dan protektif jangka panjang.^{11,12}

Hemagglutinin stem adalah protein yang jelas tampak terlihat pada permukaan virus influenza dan diketahui bisa menghasilkan respon imun terhadap virus.

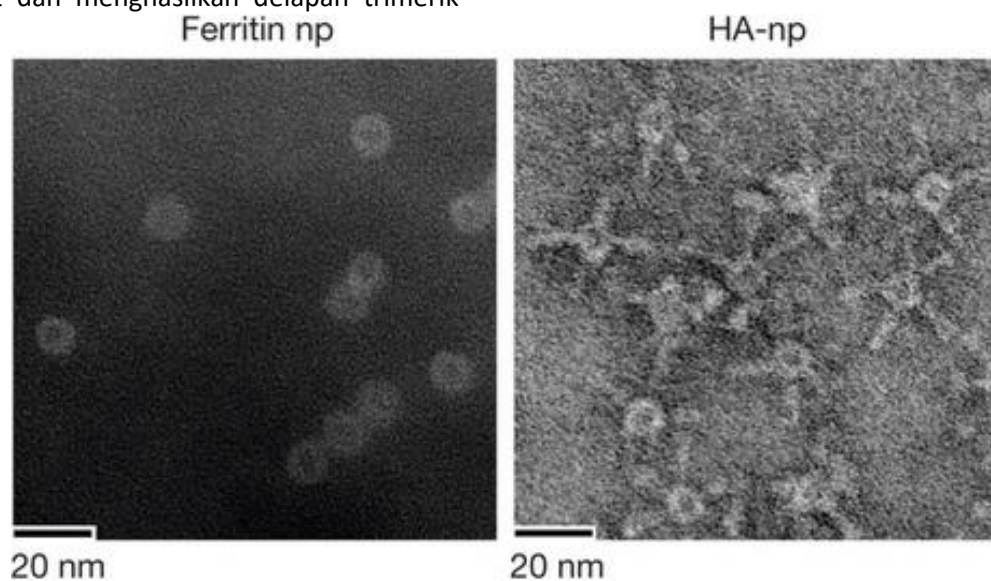
Hemagglutinin *stem* digabungkan dengan *ferritin* melalui teknik genetika yaitu menstabilisasikan *ferritin* nanopartikel dengan cara *bio-active* sehingga terbentuk HA *stem* yang memanjang pada permukaan *ferritin*, seperti terlihat pada gambar 5.^{12,13}



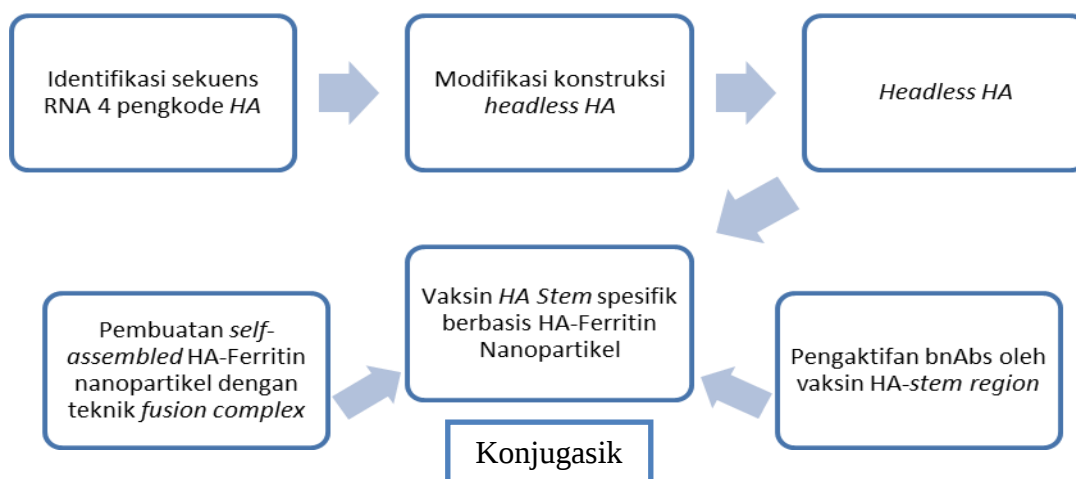
Gambar 5. Struktur dan morfologi *ferritin* dan *Hemagglutinin*¹⁴

Hemagglutinin *stem-ferritin* jika diekspresikan pada sel mamalia akan mengalami perakitan komponen sendiri di dalam nanopartikel tersebut dan menghasilkan delapan trimerik

viral. Trimerik viral tersusun secara simetris pada permukaan *ferritin*, hal tersebut terlihat pada gambar 6.^{15,16}



Gambar 6. Gambaran HA *stem-ferritin* di dalam sel mamalia.¹⁶



Ringkasan

Inovasi vaksin *HA Stem* spesifik memberi peluang baru untuk mencegah infeksi dari semua varian virus influenza. Frekuensi musiman pemberian vaksin pun secara otomatis dapat dikurangi. Modifikasi pada HA virus mengakibatkan terbentuknya *headless HA vaccine*, yang secara langsung memaparkan segmen konservatif pada *stem region* sebagai target serangan antibodi spektrum luas. Nanopartikel yang digunakan sebagai pelindung dan pembawa vaksin universal HA *stem region* adalah *ferritin* nanopartikel. Vaksin HA *stem* spesifik difusikan bergabung dengan nanopartikel. Kompleks tersebut akan merakit komponen HA *stem* sendiri di dalam nanopartikel sehingga menyebabkan HA *stem region* memanjang keluar dari permukaan nanopartikel. Oleh karena itu, modalitas terbentuknya vaksin HA *stem* dengan enkapsulasi nanopartikel *ferritin* yang dapat menginduksi bnAbs menjadi pilihan yang sangat potensial dalam meningkatkan efektivitas vaksin influenza universal protektif jangka panjang.

Simpulan

Vaksin *hemagglutinin stem* berbasis HA-*ferritin* nanopartikel memiliki potensi sebagai vaksin influenza universal protektif jangka panjang.

Daftar pustaka

1. Jawets, Melnick dan Adelberg. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Ke-25. Jakarta: EGC; 2012.
2. Wahyutomo R, Ciptaningtyas V R dan Hadi P. Prevalensi Virus Influenza (Influenza

Like Illness) di Laboratorium Regional Avian Influenza Semarang. 2011; 3(2):157-61.

3. World Health Organization. Influenza. [internet] 2014 [diakses 23 September 2015]. Tersedia dari: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en
4. Hadinegoro SRS dan Soedjatmiko. Rekomendasi Satgas imunisasi. Sari pediatri IDAI. 2006; 8(1):84-92.
5. Steel J, Lowen AC, Wang TT, Yondola M, Gao Q, Haye K, et al. Influenza Virus Based on the Conserved Hemagglutinin Stalk Domain. *mBio*. 2010; 1(1):1-9.
6. Takeshi Noda. Native Morphology of Influenza Virions. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 2(269):1-9.
7. Yassine HM, Boyington JC, McTamney PM, Wei CJ, Kanekiyo M, Kong EP, et al. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nature Medicine*. 2015; 21(1):1065-70.
8. Hashem AM. Prospects of HA-Based Universal Influenza Vaccine. *BioMed Research International*. 2015; 1(1):1-12.
9. Tharakaraman K, Subramanian V, Cain D, Sasisekharan V, Sasisekharan R. Broadly neutralizing Influenza hemagglutinin stem specific antibody CR8020 targets residues that are prone to escape due to host selection pressure. *J Chom*. 2014; 15(5):644-51.
10. Jing Sun, Ulrich J. Kudahl, Christian Simon, Zhiwei Cao, Ellis L. Reinherz, et al. Large-Scale Analysis of B-Cell Epitopes on Influenza Virus Hemagglutinin – Implications for Cross-Reactivity of

- Neutralizing Antibodies. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5(38):1-12.
11. Wei CJ. A Self-Assembling Influenza Nanoparticle Vaccine Elicits Broad and Potent Neutralizing Antibodies. *Nature Medicine*. 2013; 499(1):102-6.
 12. Bamezai AK dan Lal D. Self-assembling Nanoparticle: A Strategy for Designing Universal Flu Vaccine. *J Nanomedicine Biotherapeutic Discov*. 2014; 4(2):1-2.
 13. Raz Jelinek. Nanoparticles [internet]. [disitasi 23 September 2015]. Tersedia dari: https://books.google.co.id/books?id=upulCQAAQBAJ&pg=PA194&lpg=PA194&dq=nanoparticle++ferritin+HA&source=bl&ots=Airjmuq0Ia&sig=MoakQEPwLTBCfIP5y5iP6uvM4O0&hl=id&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=nanoparticle%20%20ferritin%20HA&f=false
 14. Graham BS. Novel Approaches to Elicit Broadly Neutralizing Antibodies to Influenza. Vaccine Research Center [internet]. 2014 [disitasi 24 September 2015]; Tersedia dari : http://www.hhs.gov/nvpo/nvac/meetings/pastmeetings/2014/novel_approches_graham_nvaccjune.pdf
 15. Richard T. Ellison III, MD. Reviewing Kinekiyo M *et al.* *A New Approach for Flu Vaccine*. J Watch [internet]. 2013 [disitasi 24 September 2015]; Tersedia dari: www.jwatch.org/na31233/2013/05/29/new-approach-flu-vaccine
 16. Kanekiyo M, Wei CJ, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JRR, et al. [Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies](#). *Nature*. 2013; 499(1):102-6.