

Pemilihan Peptida Immunogenik E6 Human Papiloma Virus 16 sebagai Kandidat Vaksin kuratif dengan menggunakan *Next-Generation IEDB Tools*

Silvia Tri Widyaningtyas^{1,2}, Ekawati Betty Pratiwi², Budiman Bela^{1,3}

¹Pusat Riset Viroogi dan Kanker Patobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, ²Program Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, ³Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indoensia

ABSTRAK

Kanker serviks atau kanker mulut rahim merupakan salah satu penyebab kematian tinggi sampai saat ini. Kanker ini dikaitkan dengan infeksi Human Pappiloma virus (HPV). Vaksinasi merupakan salah satu metode pencegahan yang cukup efektif untuk mencegah kanker serviks. Vaksin yang beredar saat ini efektif untuk mencegah infeksi HPV, namun kurang efektif jika diberikan pada orang yang telah terinfeksi. Hal tersebut dikaitkan dengan jalur kekebalan tubuh yang diinduksi oleh vaksin tersebut. Dalam penelitian ini dirancang antigen HPV 16 yang dapat digunakan dalam pengembangan vaksin terapeutik yang ditujukan untuk meningkatkan respon kekebalan seluler yang secara spesifik dapat menghancurkan sel kanker servik. Pemilihan dan karakterisasi antigen dilakukan dengan menerapkan Bioinformatika. Parameter yang dinilai antara lain kemampuan antigen diproses dan dipresentasikan oleh sel tubuh pada sel kekebalan tubuh yang bertanggung jawab pada eliminasi sel kanker, yaitu sel CD8. Hasil studi menunjukkan diperoleh epitop CD8 yang dikenali oleh beberapa jenis HLA. Bioinformatika dapat digunakan untuk mencari epitop.

Kata Kunci: Kanker servik, HPV, vaksin kuratif.

Latar Belakang

Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* (Globocan), suatu organisasi dunia yang melakukan pendataan kanker global, kanker serviks termasuk dalam 10 besar kanker paling mematikan di dunia.

Sementara itu jumlah kasus kanker servik di Indonesia menduduki posisi kedua setelah kanker payudara. Pada tahun 2022 tercatat 36.964 kasus baru kanker servik (Ferlay, 2024). Estimasi saat ini menunjukkan bahwa setiap tahun 36.633 wanita didiagnosis menderita kanker serviks dan 21.003 meninggal karena penyakit tersebut (Bruni et al, 2023). Sekitar 4,0% wanita pada populasi umum diperkirakan memiliki infeksi HPV-16/18 serviks pada waktu tertentu, dan 87,0% kanker serviks invasif disebabkan oleh HPV 16 atau 18 (Bruni et al 2023).

Badan Kesehatan Dunia (WHO) dalam kaitan program eliminasi kanker serviks mencanangkan program bahwa semua negara harus mencapai dan menjaga incidence rate dibawah 4 per 100.000 wanita dengan menerapkan 3 pilar pokok yaitu :90 % anak sudah harus divaksinasi di usia 15 tahun, 70% wanita di tes HPV pada usia 35 tahun dan diulang sekali lagi pada usia 45 tahun, dan 90% wanita dengan lesi prakanker dan lesi invasif mendapatkan pengobatan (WHO,2021). Menindaklanjuti seruan Badan Kesehatan Dunia, pada tahun 2023 Kementerian Kesehatan mengeluarkan KEPMENKES NOMOR

HK.01.07/MENKES/2176/2023 tentang Rencana Aksi Nasional Eliminasi Kanker Leher Rahim di Indonesia tahun 2023-2030. Program yang dicanangkan antara lain imunisasi dan tatalaksana lesi prakanker dan kanker invasif.

Dalam penelitian ini dilakukan pemilihan peptida immunogenik protein E6 HPV 16 sebagai salah satu kandidat antigen vaksin terapeutik. Vaksin terapeutik ditengarai dapat membersihkan infeksi HPV persisten dan/dapat menurunkan lesi CIN2/3 (Pruden et al 2022). Antigen yang dikembangkan untuk vaksin terapeutik antara lain E6 dan E7 (Burmeister et al, 2022, Chen et al, 2023; Sanami et al 2021). E6 bersama dengan E7 merupakan protein transformasi yang paling banyak diekspresikan pada lesi kanker mulut rahim (Peng et al 2024). Protein E6 berikatan dengan tumor supresor gen p53 dan menghancurkan protein tersebut. Degradasi p53 menyebabkan sel akan terus membelah tanpa kendali yang kemudian dapat berkembang menjadi keganasan.

Pemilihan epitop imunogenik E6 dilakukan dengan menggunakan *next generation IEDB tools*. IEDB atau Immun Epitope Data Base and Analysis Resources merupakan sumber informasi yang dapat diakses bebas, IEDB menyediakan data eksperimen yang mengkarakterisasi antibodi dan epitop sel T yang dipelajari pada manusia, primata nonmanusia, dan spesies hewan lainnya. Basis data berisi informasi terperinci untuk lebih dari 2,2 juta epitop yang terkait dengan penyakit menular, alergi, dan autoimun serta penolakan transplantasi.

IEDB juga menyediakan alat untuk membantu dalam prediksi, visualisasi, dan analisis epitop imun.

Next-generation IEDB tools merupakan bentuk layanan baru IEDB yang menggabungkan beberapa mesin pencari dalam satu operasi. Dengan menggunakan NG IEDB dimungkinkan untuk melakukan analisis beberapa tipe HLA, jenis pemeriksaan seperti analisis imunogenitas, proteolisis, TAP, dan analisis epitop secara bersamaan. Hal ini mempermudah dan

dilakukan untuk 27 jenis tipe *Human Leucocyte Antigen* (HLA) A yaitu HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*23:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*31:01, HLA-A*32:01, HLA-A*33:01, HLA-A*68:01, HLA-A*68:02, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*35:01, HLA-B*40:01, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01 (Weiskopf et al, 2013). Panjang epitope yang diprediksi adalah 8-10 asam

Tabel 2. Kandidat Epitop MHC I protein E6 HPV 16

				netmhcpa_n	netmhcpa_el	immunogenicity	NetCTLpan	NetCTLpan	NetCTLpan
	Awal	Akhir	allele	ba IC50	percentile	score	MHC score	tap score	cleavage prediction score
QQLRRREYV	35	43	ILA-B*15:0	168.55	0.57	165.58	0.81	0.06	0.19
LLRREYDF	37	45	ILA-B*15:0	116.54	0.41	179.89	0.26	0.73	0.22
IVYRDGNPY	52	60	ILA-B*35:0	70.56	0.13	53.77	0.48	0.24	0.09
IVYRDGNPY	52	60	ILA-B*15:0	24.3	0.08	96.38	0.80	0.07	0.09
IVYRDGNPY	52	60	ILA-A*30:0	42.91	0.06	161.98	0.60	0.11	0.09
IVYRDGNPY	52	60	ILA-A*11:0	347.59	1.2	449.06	0.19	0.93	0.09
ISEYRHYCY	73	81	ILA-A*30:0	211.02	0.37	200.66	0.23	0.62	0.08
ISEYRHYCY	73	81	ILA-A*30:0	42.47	0.04	299.61	0.79	0.07	0.08
NIRGRWTGR	127	135	ILA-A*30:0	46.72	0.09	88.32	0.56	0.13	0.36

mempersingkat waktu pengerjaan analisis epitop. Dalam upaya pencarian kandidat epitop vaksin terapeutik HPV16 selain menggunakan piranti lunak juga digunakan piranti lunak yang terdapat di IEDB maupun diluar IEDB untuk melengkapi informasi kandidat epitop vaksin terapeutik HPV 16.

Metode

Protein E6 HPV 16

Sekuen asam amino protein E6 HPV 16 diunduh dari Genbank dengan nomor akses ASY98679.1.

Antigenitas, Alergenitas dan Toksisitas protein dan peptida

Antigenitas protein diujikan pada situs Predict Antigen Peptide (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>)Pengecekan alergenitas protein menggunakan AllerTOP v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/method.html>).Penilaian toksisitas protein menggunakan ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>)18 (Gupta ; Gupta)

Prediksi Epitope CD8

Prediksi epitop, Pemotongan antigen oleh Proteosome, Interaksi antigen dengan *Transporter associated with antigen processing* (TAP), penghitungan cakupa populasi berdasarkan HLA yang mengenali epitop dilakukan dengan menggunakan IEDB dianalisis dengan menggunakan piranti lunak yang diakses di Next-Generation IEDB Tools site (<https://nextgen-tools.iedb.org/>). Analisis Epitop *Major histocompatibility complex* (MHC) I

amino.

Penyusunan sekuen peptida

Untuk menyusun kandidat vaksin yang terdiri dari Epitop CD8, dilakukan penyusunan epitop secara manual dan untuk peptida yang bukan dari sekuen berurut maka diantara peptida ditambahkan linker GGGS.

Hasil

Sekuen protein E6 HPV 16 diunduh dari Genbank dengan nomor akses ASY98679.1. Hasil uji antigenitas, toksisitas dan alergenitas protein E6 tercantum di tabel 1. Hasil menunjukkan protein E6 bersifat antigen yang dapat menginduksi respon kekebalan, tidak bersifat toksik bagi tubuh serta tidak menyebabkan reaksi alergen. Hal ini menunjukkan protein E6 dapat menjadi salah satu kandidat vaksin Analisis Epitop MHC I untuk 27 jenis tipe HLA yang dominan ditemukan di dunia ditujukan untuk meningkatkan jumlah cakupan proteksi vaksin di seluruh dunia. Hasil prediksi epitop menghasilkan 143 kandidat peptida. Peptida tersebut selanjutnya di tapis 1 berdasarkan nilai percentil NetMHCpan 4.1 EL kurang arau sama dengan 1. Jumlah peptida yang memiliki nilai persentil ≤ 1 adalah 35 jenis. Selanjutnya penapisan kedua adalah nilai IC50 NetMHCpan 4.1 EL kurang atau sama dengan 500. Berdasarkan uji tapis kedua, diperoleh 8 jenis peptida. Uji tapis berikutnya adalah nilai IC50 SNN < 500. Pada tapis ketiga ini menghasilkan 6 jenis epitop. Uji tapis berikutnya adalah nilai NetCTLpan MHC score dan immunogenicity tidak boleh negatif

(Tabel 2).

Sekuen kandidat vaksin yang disusun secara manual berdasarkan urutan asam amino penyusun epitop. Epitop yang tidak tumpang tindih dipisahkan dengan linker GGGS.S usunan kandidat vaksin adalah sebagai berikut: **QQLLRREYDFGGGSIVYRDGNPYGGGSI SEYRHYCYGGGSNIRGRWTGR**. Epitop ditandai dengan huruf tebal, huruf italic menunjukkan linker. Epitop berkelanjutan (continuous) ditunjukkan dengan huruf tebal dan garis bawah. Setiap erpitop terdiri dari 9 asam amino. Analisis antigenitas, toksisitas dan alergenitas kandidat vaksin tercantum di tabel 2. Hasil menunjukkan kandidat vaksin bersifat antigen yang dapat menginduksi respon kekebalan, tidak bersifat toksik bagi tubuh serta tidak menyebabkan reaksi alergen (Tabel 1).

Tabel 1. Analisis sifat Antigenitas, Toksisitas dan Antigenitas protein E6 dan kandidat vaksin peptida E6.

Parameter	Protein E6	Kandidat vaksin
Antigenesitas	Antigen	Antigen
Alegenitas	Tidak alergen	Tidak alergen
Toksisitas	tidak toksik	Tidaktoksik

Tabel 3. Cakupan populasi kandidat vaksin

Wilayah	MHC Kelas I		
	Cakupan ^a	Rerata hit ^b	pc90 ^c
Afrika Tengah	33.85%	0.53	0.15
Afrika Timur	33.69%	0.54	0.15
Afrika Utara	39.24%	0.54	0.16
Afrika Selatan	40.55%	0.61	0.17
Afrika Barat	43.57%	0.71	0.18
Amerika Tengah	2.78%	0.04	0.1
Amerika Utara	43.79%	0.7	0.18
Amerika Selatan	31.52%	0.42	0.15
Eropa	36.67%	0.64	0.16
Oseania	39.95%	0.47	0.17
Indies Barat	37.04%	0.61	0.16
Asia Timur laut	61.04%	1.02	0.26
Asia Timur	52.38%	1	0.21

Asia Selatan	46.11%	0.64	0.19
Asia Tenggara	44.11%	0.57	0.18
Asia barat daya	33.80%	0.44	0.15
Rerata	38.76	0.59	0.17
SD	12.04	0.22	0.03

^aproyeksi cakupan populasi

^bRerata jumlah epitop/kombinasi HLA yang dikenali oleh populasi

^cJumlah minimal epitop/kombinasi HLA dikenali oleh 90% populasi

Analisis sifat fisika kimia menunjukkan kandidat antigen vaksin memiliki berat olekul 5703,23 dalton, poin isoelektrik (pI) 9.43, *extinction coefficients* 14440, waktu paruh di dalam sel retikulosit mamalia adalah 0,8 jam, di dalam sel yeast 10 menit dan di *Escherichia coli* sekitar 10 jam. Protein ini memiliki indek instailitas 65,51 dan dikategorikan sebagai protein tidak stabil. Indek Aliphatik 51,57 dan nilai *Grand average of hidropathicity* (GRAVY) : -0,884.

Hasil analisis cakupan populasi menunjukkan kandidat vaksin dapat mengaktivasi sekitar 32,37%+0,34 populasi Indonesia dan 39,51%+0,65 populasi dunia. (Tabel3). Hasil analisis cakupan populasi menunjukkan cakupan populsi tertinggi adalah Asia Timur laut sebanyak 61,4%. Negara yang termasuk wilayah ini adalah Jepang, Mongolia, Nepal, Semenanjung Korea, Tiongkok dan wilayah bagian timur Rusia. Cakupan tersebut selanjutnya diikuti oleh Asia Timur, Asia Selatan dan Asia Tenggara (Tabel 3). Cakupan vaksin terendah adalah Amerika Tengah sebesar 2,78% (Tabel 3).

Pembahasan

Vaksin berbasis epitop sel T merupakan vaksin yang dapat dikembangkan sebagai vaksin profilaksis dan terapeutik untuk penyakit menular dan kanker. Vaksin jenis ini hanya mengandung bagian imunogenik spesifik suatu antigen untuk menginduksi terbentuknya respon sel T. Infeksi HPV16, bersama dengan HPV18, dikaitkan dengan 70% kanker servik (Mc Clung et al, 2019). Respon imun yang efektif untuk kanker adalah melalui pengenalan dan pengaktifan *Cytotoksik T cell* (CTL). Identifikasi epitop sel T merupakan langkah penting dalam perancangan vaksin dan imunoterapi untuk kanker serviks (Cai et al, 2021) Kemampuan suatu vaksin untuk pengenalan dan pengaktifan kekebalan seluler atau *Cytotoksik T Cell* (CTL) diperantarai pengenalan antigen yang dipresentasikan oleh MHCI yang terdapat pada permukaan semua sel berinti, oleh HLA yang berada di permukaan sel CTL atau Sel T CD8. Proses presentasi antigen sendiri merupakan proses yang cukup panjang. Proses tersebut diawali proteolisis antigen yang berada di

sitoplasma atau disebut antigen intraseluler. Peptida hasil proteolisis selanjutnya dipotong bagian ujung N oleh eksopeptidase sitosol (Levy et al 2002) proteolisis (NetCTLpan cleavage) berkisar antara 0,66 sampai 0,97 yang mengindikasikan antigen E6 sitoplasma dapat dipotong menjadi peptida oleh proteolisis.

Selanjutnya peptida hasil pemotongan peptidase harus dapat dikenali oleh TAP supaya dapat ditransporatasi ke dalam lumen retikulum endoplasma dan digabungkan dengan molekul MHCI yang berada didalam lumen retikulum endoplasma (Corradi et al 2012). Nilai NetCTLpan tap peptida kandidat vaksin berkisar antara 1,68 sampai dengan 3,27. Angka positif menunjukkan adanya ikatan, sedangkan angka negatif menunjukkan ikatan peptida dengan TAP tidak terbentuk (Stranzl et al, 2010). Secara keseluruhan, gabungan nilai NetCTLpan Cleavage dan NetCTLpan TAP membentuk nilai NetCTLpan.

Penapisan pertama peptida hasil prediksi epitop dilakukan berdasarkan nilai NEtCTLpan ba percentil dan IC50. Nilai ini menunjukkan *binding affinity* atau kekuatan ikatan peptida dengan CTL. Nilai percentil dibawah 1 menunjukkan ikatan kuat

(Reinsson, et al 2020). Sementara itu untuk nilai IC50 terbagi dalam 3 kategori yaitu IC50 <50nM dan *non binder* (IC yang menunjukkan ikatan peptida-CTL kuat, IC50 > 500 (Zhao et al, 2020).

Cakupan populasi kandidat vaksin hasil rancangan ini masih rendah, tidak mencapai 50% untuk Indonesia. Cakupan ini dapat ditingkatkan dengan menambahkan peptida asal HPV16 ataupun HPV tipe lainnya.

Dengan perkembangan teknologi ilmiah, aksesibilitas data genomik, alat komputasi, perangkat lunak, basis data, dan pembelajaran mesin, bidang imunoinformatika telah muncul sebagai teknik yang efektif bagi para imunolog untuk merancang vaksin potensial dalam waktu singkat. Sejumlah besar alat dan basis data tersedia untuk menyaring urutan genom parasit/patogen dan mengidentifikasi peptida atau epitop yang sangat imunogenik yang dapat digunakan untuk merancang vaksin yang efektif.

Simpulan

Peptida E6 kandidat vaksin terpetik HPV16 telah berhasil disusun dengan menggunakan Bioinformatika

Daftar Pustaka

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed 09/08/2024.
2. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 10 March 2023. [accessed 09/08/2024]
3. Chen H, Zheng X, Li L, Huang L, Huang W, Ma Y. Peptide-Based Therapeutic HPV Cancer Vaccine Synthesized via Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Int J Nanomedicine*. 2023 Aug 8;18:4541-4554. doi: 10.2147/IJN.S416706.
4. Sanami, S., Azadegan-Dehkordi, F., Rafieian-Kopaei, M. et al. Design of a multi-epitope vaccine against cervical cancer using immunoinformatics approaches. *Sci Rep* 11, 12397 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91997-4>
5. World Health Organization. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. World Health Organization; 2020 Dec 31.
6. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Rencana Aksi Nasional (RAN) Eliminasi Kanker Leher Rahim di Indonesia Tahun 2023-2030.
7. Prudden HJ, Achilles SL, Schocken C, Broutet N, Canfell K, Akaba H, et al. Understanding the public health value and defining preferred product characteristics for therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: World Health Organization consultations, October 2021—March 2022. *Vaccine*. (2022) 40:5843–55. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.08.020
8. Burmeister, C.A.; Khan, S.F.; Schäfer, G.; Mbatani, N.; Adams, T.; Moodley, J.; Prince, S. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour Virus Res*. 2022, 13, 200238.
9. Gupta et. al.:
10. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava GP. Peptide toxicity prediction. *Methods Mol Biol*. 2015;1268:143-57.
11. Cai, H., Feng, Y., Fan, P. et al. HPV16 E6-specific T cell response and HLA-A alleles are related to the prognosis of patients with cervical cancer. *Infect Agents Cancer* 16, 61 (2021).

- <https://doi.org/10.1186/s13027-021-00395-y>
12. Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):E2046-E2053. doi:10.1073/pnas.1305227110
 13. McClung NM, Gargano JW, Bennett NM, Niccolai LM, Abdullah N, Griffin MR, Park IU, Cleveland AA, Querec TD, Unger ER, Markowitz LE; HPV-IMPACT Working Group. Trends in Human Papillomavirus Vaccine Types 16 and 18 in Cervical Precancers, 2008-2014. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019 Mar;28(3):602-609. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0885. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30792242; PMCID: PMC6526945.
 14. Levy, F., Burri, L., Morel, S., Peitrequin, A. L., Levy, N., Bachi, A., Hellman, U. et al., The final N-terminal trimming of a subamino-terminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J. Immunol*. 2002. 169: 4161–417
 15. Corradi V, Singh G, Tieleman DP. The human transporter associated with antigen processing: molecular models to describe peptide binding competent states. *J Biol Chem*. 2012;287(33):28099-28111. doi:10.1074/jbc.M112.381251
 16. Zhao W, Sher X. Systematically benchmarking peptide-MHC binding predictors: From synthetic to naturally processed epitopes. *PLoS Comput Biol*. 2018 Nov 8;14(11):e1006457. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006457. PMID: 30408041; PMCID: PMC6224037.