

การพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ

REVERSE VACCINOLOGY

วรวุฒิ อ่อนเอี่ยม

ภาควิชาสารสนเทศศาสตร์ทางสุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

ติดต่อผู้พิมพ์ : woarawut@gmail.com

WOARAWUT ONIAM

Department of Health-Related Informatics

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanamchandra Palace, Nakhon Pathom

Corresponding Author: woarawut@gmail.com

บทคัดย่อ

การใช้วัคซีนเป็นหนทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการลดอัตราการเกิดโรคและการตายจากโรคติดเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามในโรคติดเชื้อบางโรคยังคงไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ในการป้องกันโรค เนื่องมาจากวิธีการในการพัฒนาวัคซีนแบบดั้งเดิมไม่สามารถนำมาใช้ในการค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการพัฒนาวัคซีนต่อไปได้ อีกทั้งยังใช้เวลาและเงินทุนในการพัฒนาวัคซีนค่อนข้างมาก แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมและชีวสารสนเทศพัฒนาไปมากทำให้เราสามารถออกแบบวัคซีนโดยใช้เพียงเครื่องมือบนคอมพิวเตอร์นำมาใช้ในการทำนายหาแอนติเจนที่เหมาะสมจากข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อได้ ซึ่งวิธีการนี้มีชื่อเรียกว่า การพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ วิธีการนี้สามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการค้นหาแอนติเจน และอาจเป็นหนทางใหม่สำหรับวัคซีนที่ยากต่อการพัฒนาในปัจจุบัน การพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับถูกนำมาประยุกต์ใช้ครั้งแรกในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไขกัปกหลังแอ่นที่เกิดจากเชื้อ *Neisseria meningitidis* serogroup B ทำให้สามารถค้นพบแอนติเจนใหม่เพิ่มอีก 3 ชนิดคือ fHbp NadA และ NHBA ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี ซึ่งเมื่อนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนร่วมกับแอนติเจนที่เป็นโปรตีนบนพื้นผิวเซลล์ที่ค้นพบก่อนหน้านี้ ทำให้ได้วัคซีนตัวใหม่ที่มีชื่อการค้าว่า Bexsero® ต่อมาวัคซีนนี้ได้ผ่านการรับรองให้ใช้ได้ในประเทศแถบยุโรปในเดือนมกราคม ค.ศ. 2013 และในประเทศสหรัฐอเมริกาในเดือนกุมภาพันธ์ ค.ศ. 2015 ซึ่งผลจากความสำเร็จนี้ได้พิสูจน์ให้เห็นถึงประสิทธิภาพในกระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ และอาจนำวิธีการนี้มาใช้ในการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคติดเชื้อที่สำคัญอีกหลายโรคต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: วัคซีน, ชีวสารสนเทศ, การพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ, โรคไขกัปกหลังแอ่น *Neisseria meningitidis* serogroup B

Abstract

Vaccination has been one of the most effective interventions to decrease mortality and morbidity caused by infectious diseases. However, for many diseases, the conventional approach used for identifying protective antigens has failed to deliver successful vaccine candidates against major pathogens. Moreover, it is time-consuming and wastes a lot of money. Recently, the advancement of genomic and bioinformatics technologies allow us to design the vaccines starting from prediction of all protein antigens in silico (from the genomic information), independently of their abundance and immunogenicity during infection. This novel approach which is called “Reverse vaccinology”, reduces the time required for searching candidate vaccines and provides new solution for vaccines which have been difficult to develop. Reverse vaccinology was firstly used for the development of vaccines against serogroup B meningococcus (MenB) that was the most common cause of meningococcal meningitis. This approach allowed the identification of three novel protein antigens (fHbp, NadA and NHBA) able to induce bactericidal antibodies. The combination of these three novel antigens together with outer membrane vesicles was formulated as a multicomponent vaccine, named Bexsero[®]. It was approved for use in Europe and America in January 2013 and February 2015, respectively. This success noticeably proves that reverse vaccinology strategy has great potential in vaccine discovery and will lead to discover effective vaccines tackling several pathogens in the near future.

KEYWORDS: vaccine, bioinformatics, reverse vaccinology, serogroup B meningococcus

บทนำ

ความปรารถนาอย่างหนึ่งในการดำรงชีวิตของมนุษย์ คือการมีร่างกายแข็งแรง และปราศจากโรค เนื่องจากตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีโรคที่ก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วย หรือเสียชีวิตจำนวนมาก เช่น โรคไข้ทรพิษ โรคพิษสุนัขบ้า คอตีบ ไอกรณ บาดทะยัก ฯลฯ ซึ่งหนทางในการป้องกันโรคสามารถกระทำได้หลายวิธีเช่น การออกกำลังกาย การรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ การพักผ่อนให้เพียงพอ แต่อย่างไรก็ตามหนทางหนึ่งที่สะดวกและมี

ประสิทธิภาพมาก คือ การเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคด้วยวัคซีน

ทั่วโลกต่างตระหนักและให้ความสำคัญกับการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคด้วยวัคซีน ส่งผลให้ในปัจจุบันอัตราการตายของประชากรที่เกิดจากโรคติดเชื้อต่าง ๆ มีจำนวนลดลงมาก นอกจากนี้แล้วยังส่งผลให้โรคร้ายแรงบางโรคได้สูญหายไปจากโลกนี้อีกด้วย (ตารางที่ 1) ดังเช่นที่องค์การอนามัยโรคได้เคยออกประกาศเกี่ยวกับการปลอดไข้ทรพิษในปี ค.ศ.1980

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบอัตราการเสียชีวิตของประชากรในประเทศสหรัฐอเมริกาจากโรคติดเชื้อต่าง ๆ ที่พบก่อนและหลังการใช้วัคซีนป้องกันโรค¹

โรค	อัตราการตายโดยเฉลี่ยประจำปี ก่อนมีวัคซีน	อัตราการตายหลังมีการใช้วัคซีน ในปี ค.ศ.2004
คอตีบ	1822 (1936-1945)*	0
หัด	440 (1953-1962)	0
คางทูม	39 (1963-1968)	0
ไขทรพิษ	337 (1900-1949)	0
บาดทะยัก	472 (1947-1949)	4
โปลิโอ	1393 (1941-1950)	0

* หมายเหตุ ในวงเล็บคือปี ค.ศ.ที่มีการเก็บข้อมูล

ในอนาคตกาดว่าโรคติดเชื้ออีกเป็นจำนวนมากจะได้รับการป้องกันและควบคุมที่ดีขึ้น เมื่อมีการค้นพบวัคซีนชนิดใหม่ หรือมีการปรับปรุงประสิทธิภาพของวัคซีนเดิมที่มีอยู่แล้ว ซึ่งกรรมวิธีในการพัฒนาวัคซีนสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและความเหมาะสมในการใช้งาน

ประวัติศาสตร์ของวัคซีน

การค้นพบวัคซีนของมนุษย์เริ่มต้นจากที่มีผู้ค้นพบว่าผู้ที่เคยเป็นโรคติดเชื้อใดมาแล้วครั้งหนึ่งมักจะไม่มีป่วยเป็นโรคนั้นซ้ำอีก จึงทำให้มีความพยายามในการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อการป้องกันโรคไว้ล่วงหน้า ดังเช่นในช่วงที่มีการระบาดของไข้ทรพิษ ราวคริสต์ศตวรรษที่ 10 ชาวจีนได้คิดค้นวิธีการสร้างภูมิคุ้มกันโดยการใช้เข็มสะกิดที่ตุ่มหนองฝีของผู้ป่วยแล้วนำไปสะกิดที่ผิวหนังของผู้ที่ยังไม่เคยเป็นไข้ทรพิษมาก่อน วิธีการนี้เรียกว่า การปลูกฝี (variolation) ซึ่งต่อมาวิธีการดังกล่าวได้มีผู้นำไปเผยแพร่ในหลายประเทศ เช่น ในอังกฤษและสหรัฐอเมริกา

ต่อมาในปี ค.ศ.1796 นายแพทย์เอ็ดเวิร์ด เจนเนอร์ จากประเทศอังกฤษ ได้ทำการค้นคว้าหาวิธีป้องกันโรคไข้ทรพิษที่กำลังแพร่ระบาดอย่างหนักในขณะนั้น โดยเจนเนอร์ได้สังเกตเห็นว่า หญิงรีดนมวัวที่เคยติดโรคฝีดาษวัว (cowpox) แล้วจะไม่เป็นไข้ทรพิษอีก เจนเนอร์จึงได้ทดลองนำหนองจากแผลฝีดาษวัวของหญิงรีดนมวัวไปฉีดให้กับคนอื่น ปรากฏว่าสามารถป้องกันไข้ทรพิษได้ ซึ่งผลจากการค้นพบนี้ทำให้ประชาชนในขณะนั้นรอดจากการเสียชีวิตด้วยไข้ทรพิษเป็นจำนวนมาก โดยเจนเนอร์ได้เรียกชื่อหนองฝีวัวนั้นว่า vaccine ซึ่งเป็นคำที่มาจากภาษาละตินว่า vacca แปลว่า วัว และเรียกวิธีการป้องกันโรคดังกล่าวว่า vaccination

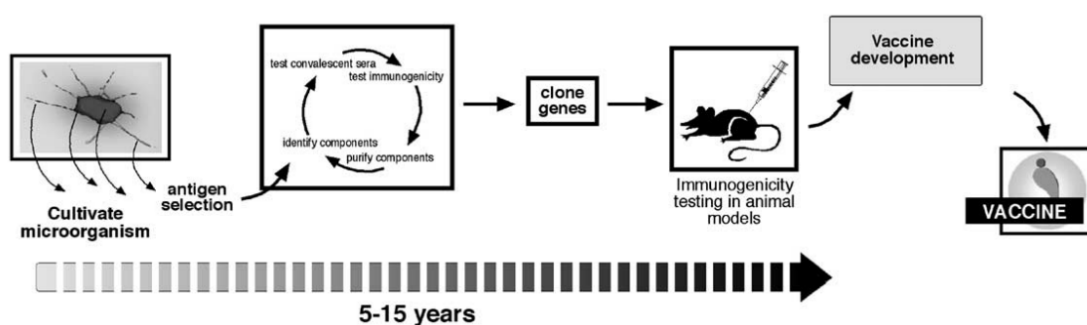
ปลายคริสต์ศตวรรษที่ 18 จากการที่มีผู้ค้นพบว่าการเกิดโรคติดเชื้อมีที่มาจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก หลุยส์ ปาสเตอร์จึงได้นำความรู้ดังกล่าวมาพัฒนาเป็นหลักการในการผลิตวัคซีน ที่ประกอบไปด้วย การแยกเชื้อ การทำให้เชื้ออ่อนฤทธิ์ และการฉีดเชื้อก่อโรสดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคขึ้นซึ่ง

พลาสติกได้นำหลักการดังกล่าวมาใช้ในการพัฒนาวัคซีนชนิดเชื้อเป็นในห้องทดลองขึ้นเป็นครั้งแรก คือ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ต่อมาเมื่อความรู้เกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคต่าง ๆ เพิ่มขึ้นจำนวนมากเช่น วัคซีนป้องกันโรคบาดทะยัก คอตีบ อหิวาต์ ไทฟอยด์ โปลิโอ ฯลฯ² หลังจากนั้นตั้งแต่ช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 20 เป็นต้นมา ประวัติศาสตร์ในการพัฒนาวัคซีนถูกแบ่งออกเป็น 2 ช่วงที่สำคัญ ได้แก่ การปฏิวัติกระบวนการในการพัฒนาวัคซีนครั้งที่หนึ่งและครั้งที่สอง³

การปฏิวัติกระบวนการในการพัฒนาวัคซีนครั้งที่หนึ่ง

วัคซีนที่มีอยู่ในช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 20 ส่วนใหญ่เป็นวัคซีนแบบเชื้อตาย และแบบเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ แต่วัคซีนทั้งสองแบบนี้มี

ข้อจำกัดและข้อเสียต่าง ๆ มากมาย นอกจากนั้นแล้วโรคติดเชื้อร้ายแรงอีกหลายโรคยังคงไม่มีวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ ในช่วงเวลาดังกล่าวความรู้และเทคโนโลยีทางด้านการตัดต่อยีนมีความก้าวหน้าขึ้นมากจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัคซีนแบบใหม่ที่มีชื่อว่า วัคซีนหน่วยย่อย (subunit vaccine) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอนติเจนของเชื้อที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีเท่านั้น แตกต่างจากวัคซีนชนิดเชื้อตายหรือเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ที่มีส่วนประกอบเป็นตัวเชื้อก่อโรคที่ตายแล้วหรืออ่อนฤทธิ์ลง ตัวอย่างของวัคซีนที่สำคัญที่ผลิตขึ้นโดยวิธีการนี้ เช่น วัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบบีที่มีส่วนประกอบเป็นแคปซิดโปรตีน (capsid protein) และวัคซีนป้องกันโรคไอกรน ที่มีส่วนประกอบเป็นโปรตีนสามชนิด⁴



ภาพที่ 1 กระบวนการทั่วไปในการพัฒนาวัคซีนแบบหน่วยย่อย⁶

ขั้นตอนโดยทั่วไปในการพัฒนา (ภาพที่ 1) เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นในห้องทดลอง เมื่อเชื้อสามารถเจริญเติบโตในห้องทดลองได้แล้วจึงทำการแยกแต่ละส่วนของเชื้อที่คาดว่าจะมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ จากนั้นนำแต่ละส่วนไปทดสอบหาความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว

ขั้นตอนนี้ใช้เวลาค่อนข้างมาก ผลลัพธ์ที่ได้มีทั้งการค้นพบแอนติเจนที่เหมาะสมหรืออาจล้มเหลวไม่สามารถค้นพบแอนติเจนเลย ในขั้นตอนถัดมาเมื่อพบส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่เหมาะสมแล้ว ยีนของส่วนที่มีหน้าที่ในการสร้างแอนติเจนนั้นจะถูกโคลนเพื่อเพิ่มปริมาณแอนติเจนให้มากขึ้น แล้วนำมาทดสอบ

ความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยฉีดเข้าสัตว์ทดลอง ซึ่งแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี จะถูกเลือกนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป^{5,6}

จากกระบวนการข้างต้น แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการพัฒนาวัคซีนชนิดหน่วยย่อยนั้นมีหลายขั้นตอนที่ต้องทำในห้องทดลองส่งผลให้ต้องใช้เวลาและงบประมาณมาก โดยเฉพาะในขั้นตอนของการค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมส่วนใหญ่ใช้เวลามากถึง 5-15 ปี แต่อย่างไรก็ตามเชื่อที่ก่อให้เกิดโรคอีกหลายชนิดยังคงไม่พบแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันโรคได้

ข้อดีและข้อเสียของวัคซีนหน่วยย่อย

ข้อดี

1) ไม่ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่อผู้รับวัคซีน เช่น ไข้ หรือบวมแดงบริเวณที่ฉีด ซึ่งมักจะเกิดกับการฉีดวัคซีนเชื้อตาย หรือวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์

2) ปลอดภัยต่อผู้รับวัคซีน เนื่องจากส่วนประกอบของวัคซีนเป็นเพียงส่วนหนึ่งของเชื้อเท่านั้นจึงไม่สามารถเกิดการกลายพันธุ์หรือเกิดการเปลี่ยนกลับจากเชื้ออ่อนฤทธิ์ไปเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้ดังเช่นที่เคยเกิดขึ้นในอดีตกับวัคซีนโปลิโอชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์

ข้อเสีย⁵

1) ใช้เวลาในการพัฒนาค่อนข้างมาก
2) ไม่สามารถนำมาใช้กับเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ

3) ส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนของเชื้อบางชนิดยังคงไม่สามารถค้นพบได้โดยวิธีการพัฒนาวัคซีนแบบนี้ ทั้งนี้เนื่องจากตัวเชื้อผลิตแอนติเจนดังกล่าวขึ้นมาในปริมาณน้อยมากทำให้ไม่สามารถแยกแยะได้ หรือ

แอนติเจนบางชนิดอาจพบได้เฉพาะในช่วงที่อยู่ระหว่างที่มีการติดเชื้อในคนเท่านั้น

การปฏิบัติการกระบวนการในการพัฒนาวัคซีนครั้งที่สอง

ในช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 20 ด้วยความก้าวหน้าของความรู้และเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการได้ในเวลาอันสั้นและเสียค่าใช้จ่ายต่ำ ส่งผลให้ในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นต้นมามีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเรื่องดังกล่าวจำนวนมาก จึงมีผู้สร้างฐานข้อมูลขึ้นมาจำนวนมากเพื่อใช้ในการจัดเก็บข้อมูลดังกล่าว ตัวอย่างฐานข้อมูลสำคัญที่มีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับของนักวิทยาศาสตร์ เช่น

1. ฐานข้อมูล Genbank เป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของประเทศสหรัฐอเมริกา สนับสนุนโดย National Institute of Health (NIH) เริ่มเปิดให้บริการตั้งแต่ปี ค.ศ.1992 ผู้สนใจสามารถใช้บริการผ่านทางเว็บไซต์ได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

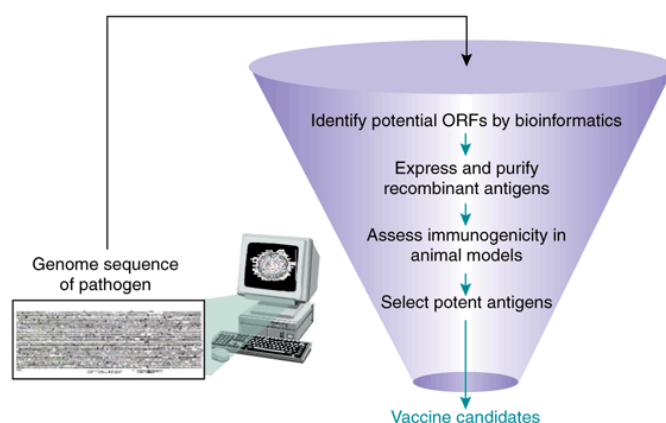
2. ฐานข้อมูล EMBL เป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทวีปยุโรป สร้างขึ้นโดยความร่วมมือระหว่างประเทศ คือ Genbank ของสหรัฐอเมริกา และ DDBJ ของญี่ปุ่นผู้สนใจสามารถใช้บริการใช้บริการผ่านทางเว็บไซต์ได้ที่ <http://www.ebi.ac.uk/ena>

3. ฐานข้อมูล DDBJ เป็นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของประเทศญี่ปุ่น ได้รับการสนับสนุนจากรัฐบาลญี่ปุ่น เริ่มเปิดให้บริการครั้งแรกในปี ค.ศ.1986 ผู้สนใจสามารถใช้บริการใช้บริการผ่านทางเว็บไซต์ได้ที่ <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

จากลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถทราบว่ามีชีวิตนั้นมีความสามารถในการผลิตโปรตีนชนิดใดขึ้นมาได้ โปรตีนเหล่านั้นบางชนิดอาจสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ทำให้สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป

จากแนวความคิดข้างต้น ทำให้ Rino Rappuoli นักวิทยาศาสตร์ชาวอิตาลีได้นำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัคซีน โดยวิธีที่เขาใช้มีชื่อเรียกว่า การพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ (reverse vaccinology) ซึ่งจำกัดความของการพัฒนาวัคซีนในรูปแบบนี้คือ “การพัฒนา

วัคซีนโดยที่ไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องทดลองเพียงแต่ใช้ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมและการวิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ในการค้นหาโปรตีนที่อยู่ในพื้นผิวเซลล์หรือถูกส่งออกไปภายนอกเซลล์ที่มีความสามารถเป็นแอนติเจน เพื่อที่จะนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป” ซึ่งเหตุผลที่เลือกค้นหาเฉพาะโปรตีนรูปแบบดังกล่าวเนื่องมาจากโปรตีนเหล่านั้นสามารถเข้าถึงได้ง่ายโดยระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้มีโอกาสในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าโปรตีนที่อยู่บริเวณอื่น^{8,9}



ภาพที่ 2 กระบวนการทั่วไปในการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ¹⁰

ขั้นตอนโดยทั่วไปในการพัฒนา (ภาพที่ 2) เริ่มต้นจากการค้นหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในจีโนมทั้งหมดของเชื้อที่ต้องการจากฐานข้อมูลต่างๆ เช่น Genbank, EMBL จากนั้นใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมด เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนที่ผิวเซลล์หรือส่งออกไปภายนอกเซลล์ หลังจากนั้นใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนส่วนดังกล่าวเข้ากับเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ทำการ

ผลิตโปรตีนนั้นออกมา แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยทำการฉีดเข้าในสัตว์ทดลองที่เหมาะสม ถ้าโปรตีนชนิดใดสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองได้ดี จะถูกนำไปเป็นตัวเลือกในการพัฒนาวัคซีนต่อไป¹⁰ ซึ่งขั้นตอนในการค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมโดยกระบวนการนี้ใช้เวลาเพียง 1-2 ปีเท่านั้น ซึ่งถือว่าใช้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการพัฒนาวัคซีนชนิดหน่วยย่อยที่ใช้อย่างน้อย 5-15 ปี

เครื่องมือบนคอมพิวเตอร์ (*In silico* tool)⁸

ในขั้นตอนการพัฒนาวัคซีนโดยใช้กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับนั้น จำเป็นต้องมีการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป ซึ่งโปรแกรมคอมพิวเตอร์ดังกล่าวมีทั้งแบบที่ต้องติดตั้งบนเครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนตัวหรือเปิดให้ใช้งานผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

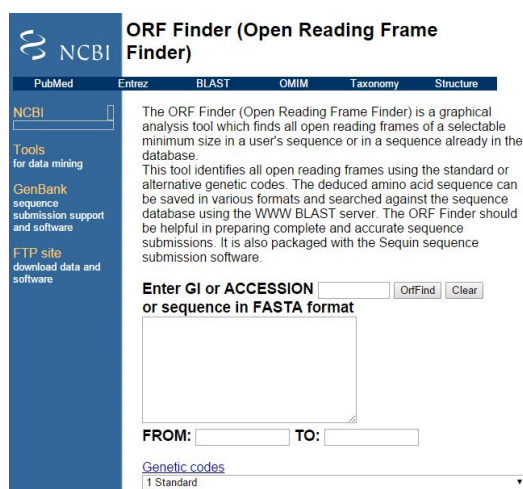
ในปัจจุบันโปรแกรมที่ช่วยในการทำนายผลต่าง ๆ มีผู้พัฒนาขึ้นมาเป็นจำนวนมาก การทำนายผลอย่างเดียวกันอาจสามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้หลายโปรแกรมซึ่งแต่ละ โปรแกรม บางครั้งอาจจะมีข้อจำกัดในการใช้งานที่แตกต่างกัน เช่น ใช้กับประเภทของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน

(โปรแคริโอต ยูแคริโอตพืช สัตว์ หรือไวรัส) หรือใช้หลักการในการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ฯลฯ ดังนั้นก่อนการเลือกใช้งานโปรแกรม ผู้ใช้งานต้องทำการศึกษาก่อนว่าโปรแกรมใดมีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมกับการนำมาใช้กับงานของตนเองมากที่สุด

ตัวอย่างของเครื่องมือที่นิยมใช้ในกระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ ได้แก่

เครื่องมือที่ใช้ในการทำนายตำแหน่งของยีน (Gene prediction tool)

ทำหน้าที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอเพื่อหาตำแหน่งของยีน ตัวอย่างเครื่องมือ เช่น Eugene, GLIMMER, ORF FINDER (ภาพที่ 3)

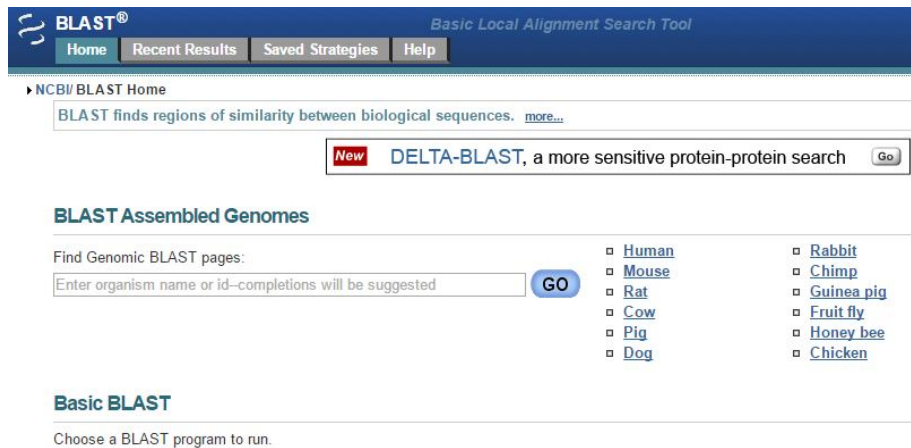


ภาพที่ 3 ORF Finder¹¹

เครื่องมือที่ใช้ค้นหาความเหมือนกันของลำดับเบส (Sequence similarity search tool)

ทำหน้าที่เปรียบเทียบหาความเหมือนกันของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษากับลำดับเบสที่มีอยู่แล้วใน

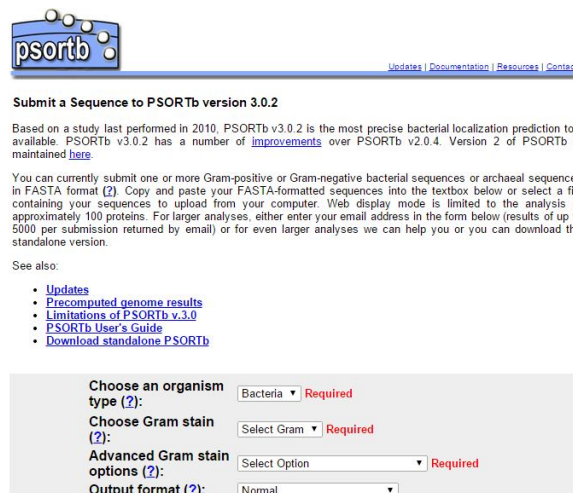
ฐานข้อมูล ทำให้เราทราบถึงโครงสร้าง และหน้าที่ทางชีววิทยาของยีนที่ต้องการศึกษานั้น ได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว ตัวอย่างของเครื่องมือ เช่น BLAST (ภาพที่ 4), FASTA

ภาพที่ 4 BLAST¹²

เครื่องมือที่ใช้ในการทำนายตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีน (Protein subcellular localization prediction tool)

ทำหน้าที่ในการทำนายว่าโปรตีนที่ถูก

สร้างขึ้นจากยีนของเชื้อถูกส่งไปไว้ที่บริเวณใดของเซลล์ ตัวอย่างของเครื่องมือ เช่น PSORTb (ภาพที่ 5) , TMHMM, SignalP, SCLpred

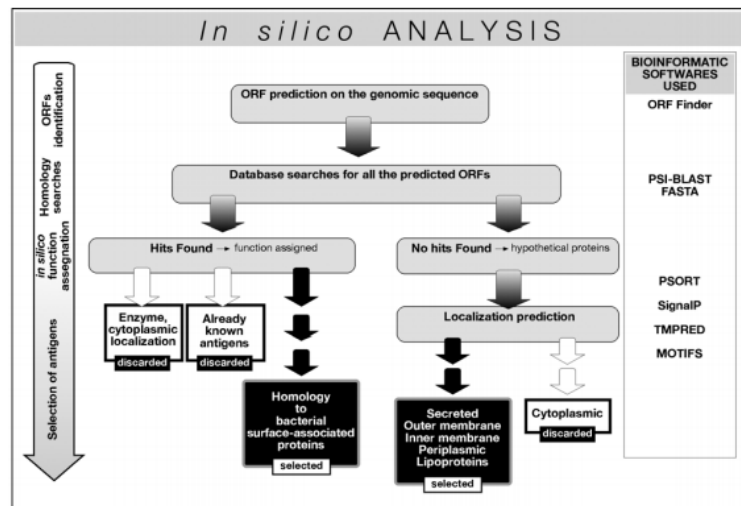
ภาพที่ 5 PSORTb¹³

ลำดับขั้นตอนโดยทั่วไปในการนำเครื่องมือบนคอมพิวเตอร์มาใช้ในการวิเคราะห์ยีนเพื่อค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมกับการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีน ทำได้ดังนี้ (ภาพที่ 6) กระบวนการส่วนใหญ่เริ่มต้นจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาเพื่อทำนายตำแหน่งของยีน โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น ORF Finder

เมื่อทราบตำแหน่งของยีนแล้ว ลำดับเบสของยีนที่วิเคราะห์ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST หรือ FASTA ในกรณีที่พบว่ามีความเหมือนกันกับลำดับเบสในฐานข้อมูล ให้เลือกเฉพาะลำดับที่สามารถสร้างโปรตีนที่ถูกส่งไปที่บริเวณผิวเซลล์ หรือส่งออกภายนอกเซลล์ จากนั้นใช้โปรแกรม PSORT หรือ SignalP เพื่อค้นหา

เพิ่มเติมว่ามีโปรตีนตัวใดอีกที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วจะถูกส่งไปที่ผิวเซลล์ด้านนอกหรือถูกส่งออกไปภายนอกเซลล์ ซึ่งผลลัพธ์จากกระบวนการวิเคราะห์และทำนายผล

ดังกล่าว ทำให้ได้แอนติเจนที่เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ หรือถูกส่งออกไปภายนอกเซลล์ ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป¹⁰



ภาพที่ 6 ขั้นตอนโดยทั่วไปในการนำเครื่องมือบนคอมพิวเตอร์มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ¹⁰

ข้อดีและข้อเสียของการใช้กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ

เมื่อทำการเปรียบเทียบกระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ กับ กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบเดิม พบข้อดีและข้อเสียดังนี้

ข้อดี

- 1) ใช้เวลาน้อยกว่าในการค้นหาแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพ
- 2) วัคซีนที่พัฒนาได้มีผลข้างเคียงน้อยกว่าวัคซีนแบบเชื้อตาย หรือเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ เนื่องจากใช้เฉพาะส่วนของเชื้อที่เป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเท่านั้น
- 3) กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบนี้สามารถนำมาใช้กับเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ หรือ เชื้อที่มีความอันตรายสูงไม่เหมาะที่จะทำการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง

- 4) สามารถค้นพบแอนติเจนชนิดใหม่เพิ่มขึ้นจำนวนมาก ทำให้มีโอกาสนำไปพัฒนาวัคซีนใหม่ได้สำเร็จเพิ่มขึ้น

ข้อเสีย

กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับนี้ไม่สามารถค้นหาแอนติเจนที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น แอนติเจนที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ไกลโคไลพิด และไขมัน ดังนั้นอาจไม่พบแอนติเจนที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาวัคซีนของเชื้อบางชนิดได้

การประยุกต์ใช้กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ

กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัคซีนสำหรับเชื้อหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่

- 1) *Neisseria meningitidis*

การพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นครั้งแรกในการพัฒนาวัคซีนสำหรับเชื้อ *Neisseria meningitidis* serogroup B ซึ่งในขณะนั้นยังไม่สามารถค้นพบวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ครอบคลุมทุกสายพันธุ์

Neisseria meningitidis เป็นเชื้อแกรมลบที่มีแคปซูล สามารถแบ่งออกได้เป็น 13 serogroups แต่มีเพียง 5 serogroups ที่ก่อให้เกิดโรคไข้กาฬหลังแอ่น ได้แก่ serogroup A, B, C, W-135 และ Y ซึ่งโรคนี้เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของการเสียชีวิตและทุพพลภาพของเด็กและสตรีมีครรภ์ในประเทศอุตสาหกรรมและมีการระบาดในหลายทวีป เช่น ทวีปแอฟริกาและเอเชีย ลักษณะอาการทางคลินิกของโรคนี้ที่พบมีความแตกต่างกันตั้งแต่มีการติดเชื้อแบคทีเรียโดยไม่แสดงอาการจนถึงมีอาการของการติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างรุนแรง เกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองและไขสันหลัง โรคนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในบุคคลทุกเพศทุกวัย โดยพบมากในช่วงอายุ 1 เดือนถึง 15 ปี (25-40%)

ในปี ค.ศ. 2007 พบอุบัติการณ์ของการเกิดโรคจากเชื้อนี้ทั่วโลก อยู่ที่ 1,200,000 กรณีต่อปี และมีอัตราการตายที่ 135,000 กรณีต่อปี สำหรับในประเทศไทย พบอุบัติการณ์ของการเกิดโรคอยู่ที่ 0.02 ต่อประชากรหนึ่งแสนคนและมีอัตราการตายที่ 33.3% และจากการสำรวจพบว่า serogroup ที่ก่อโรคที่พบมากที่สุดในประเทศไทย คือ serogroup B (56.3%) ตามด้วย A (12.5%), C (6.3%) และ W-135 (6.3%)¹⁴

วัคซีนสำหรับป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นที่เกิดจาก *Neisseria meningitidis*

ในอดีตมีวัคซีนหลายชนิดที่ใช้ป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่น ได้แก่¹⁵

1) วัคซีนสำหรับ monovalent sero group C ใช้ป้องกันได้เฉพาะโรคไข้กาฬหลังแอ่นที่เกิดจากเชื้อ *Neisseria meningitidis* serogroup C เท่านั้น

2) วัคซีนสำหรับ quadrivalent sero group A, C, Y, W-135 ใช้ป้องกันได้เฉพาะโรคไข้กาฬหลังแอ่นที่เกิดจากเชื้อ *Neisseria meningitidis* serogroup A, C, Y, W-135 เท่านั้น ซึ่งวัคซีนนี้ออกจำหน่ายสู่ท้องตลาดใน ค.ศ. 2005 สามารถนำมาใช้ได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่

3) วัคซีน MenB OMV ใช้ป้องกันได้เฉพาะโรคไข้กาฬหลังแอ่นที่เกิดจากเชื้อ *Neisseria meningitidis* serogroup B ในบางพื้นที่เท่านั้น

แต่อย่างไรก็ตามวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจาก *Neisseria meningitidis* serogroup B ที่ครอบคลุมได้ทุกสายพันธุ์ทั่วโลกยังไม่สามารถพัฒนาขึ้นมาได้ ทั้งนี้มีสาเหตุจาก^{15,16}

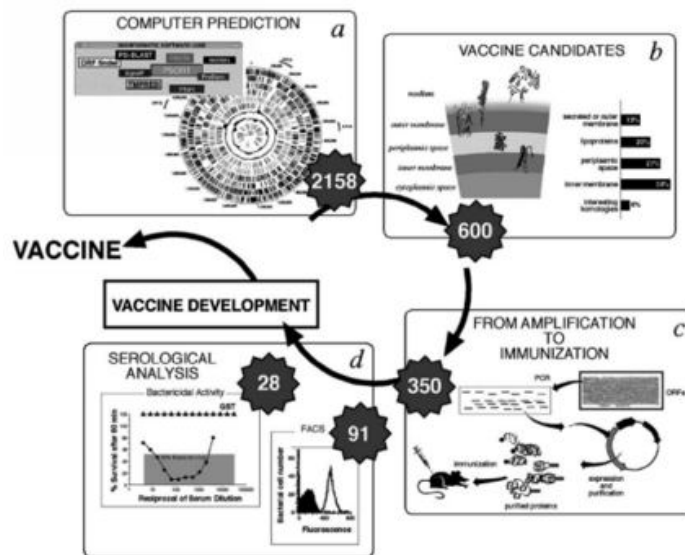
1) แคปซูลของเชื้อที่เป็นสารประกอบพวกโพลีแซคคาไรด์ มีลักษณะทางเคมีคล้ายคลึงกับ α 2-8 polysialic acid ที่สามารถพบได้หลายแห่งในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ภายในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งถ้ามีการนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนจะทำให้กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่ดีและเกิดภาวะภูมิคุ้มกันตนเองได้

2) โปรตีนที่ผิวเซลล์ (PorA) มี antigenic variants มากกว่า 600 ชนิดซึ่งแต่ละ variant ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันข้ามชนิดกันได้ ส่งผลให้วัคซีนที่พัฒนาขึ้นในพื้นที่หนึ่งจะไม่สามารถใช้ในพื้นที่หนึ่งได้

ขั้นตอนโดยย่อในการพัฒนาวัคซีน (ภาพที่ 7) เริ่มจาก ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อโดยใช้เครื่องมือบนคอมพิวเตอร์หลายชนิดร่วมกัน เช่น ORF Finder, PSI-BLAST,

FASTA, PSORT, SignalP, TMpred ทำให้สามารถค้นพบยีนใหม่ที่จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนส่งไปที่ผิวเซลล์หรือโปรตีนที่ส่งออกภายนอกเซลล์ จำนวนทั้งสิ้น 600 ชนิด ยีนดังกล่าวทั้งหมดถูกนำมาตัดต่อและย้ายเข้าสู่ *Escherichia coli* พบว่าสามารถสร้างโปรตีนออกมาได้ 350 ชนิด จากนั้นทำให้โปรตีนแต่ละชนิดบริสุทธิ์แล้วนำไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู ซึ่งซีรัมที่ได้จากหนูจะนำมาทำการทดสอบหลายชนิดได้แก่ Western blot, ELISA และ FACS เพื่อ

ยืนยันว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถผลิตขึ้นมาได้จริงในสิ่งมีชีวิต และถูกส่งไปอยู่ที่บริเวณพื้นผิวเซลล์ นอกจากนี้แล้วซีรัมทั้งหมดยังถูกนำมาทดสอบความสามารถ ในการทำลายเชื้อโดยระบบคอมพลีเมนต์อีกด้วย เมื่อผ่านกระบวนการทั้งหมดแล้วพบโปรตีนที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีจำนวน 28 ชนิด จากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะโปรตีนที่สามารถพบได้ใน *Neisseria meningitidis* serogroup B ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค¹⁷



ภาพที่ 7 กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับสำหรับ *N. Meningitidis* serogroup B¹⁷

จากกระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับดังกล่าว ทำให้ค้นพบวัคซีนชนิดใหม่ที่มีชื่อเรียกว่า 4CMenB ซึ่งประกอบด้วยแอนติเจน 4 ชนิด (3 ใน 4 ของแอนติเจนดังกล่าวเพิ่งถูกค้นพบโดยกระบวนการนี้) ได้แก่

- 1) PorA เป็นโปรตีนบนพื้นผิวเซลล์ ซึ่งมีการค้นพบและถูกนำมาใช้ก่อนหน้านี้แล้วในวัคซีน MenB OMV
- 2) NHBA (Neisserial Heparin Binding Antigen)

- 3) fHbp (Factor H-binding protein)
- 4) NadA (Neisseria adhesin A)

ในปัจจุบัน 4CMenB ได้รับการรับรองให้สามารถนำมาใช้ในประเทศแถบยุโรป แคนาดา ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกาโดยมีชื่อทางการค้าว่า Bexsero^{®16,18} ซึ่งจัดว่าเป็นวัคซีนตัวแรกที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นที่เกิดจากเชื้อ *Neisseria meningitidis* serogroup B ได้อย่างครอบคลุมทุกสายพันธุ์

2) *Streptococcus pneumoniae*

เชื้อนี้เป็นสาเหตุที่สำคัญสำหรับภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต โรคปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบและหูชั้นกลางอักเสบในเด็กเล็กและผู้สูงอายุซึ่งจากการศึกษาพบว่า *Streptococcus pneumoniae* มีสายพันธุ์ย่อยที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่อยู่ถึง 70 สายพันธุ์ย่อย

ในปัจจุบันวัคซีนที่นิยมใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชือดังกล่าว มี 2 ชนิดคือ¹⁹

1. Pneumococcal conjugate vaccine (PCV13 หรือ Prevnar 13[®]) เป็นวัคซีนที่ป้องกันได้ 13 สายพันธุ์ย่อย (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F)

2. Pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23 หรือ Pneumovax[®]) เป็นวัคซีนที่ป้องกันได้ 23 สายพันธุ์ย่อย

จากข้างต้น วัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันยังไม่สามารถป้องกันโรคที่เกิดจาก *S. pneumoniae* ได้อย่างครอบคลุมทุกสายพันธุ์ย่อย ดังนั้น Witzemann และคณะ²⁰ จึงได้นำกระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับมาใช้ในการพัฒนาวัคซีน ทำให้สามารถค้นพบแอนติเจนใหม่ถึง 6 ชนิดที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ครอบคลุมต่อทุกสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ *S. pneumoniae* ซึ่งแอนติเจนดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพต่อไปได้ในอนาคต⁴

อนาคตของกระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับ

นับตั้งแต่ปี ค.ศ.2000 ที่ Rino Rappuoli ได้ริเริ่มกระบวนการในการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับเป็นต้นมา กระบวนการนี้ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในหลายด้าน ทั้งด้านการพัฒนาเครื่องมือที่ใช้ในการค้นหาหรือพัฒนาเทคนิค

วิธีการในการค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสม ตัวอย่างของการพัฒนาในแต่ละด้าน เช่น

การพัฒนาในด้านเครื่องมือบนคอมพิวเตอร์ (In silico tool)

ในช่วงเริ่มแรก เครื่องมือบนคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการทำนายและค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสม ส่วนใหญ่เป็นเครื่องมือที่มุ่งเน้นในการค้นหาโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีเท่านั้น เช่น พบที่ผิวเซลล์ หรือ ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ มีคุณสมบัติเป็น adhesin เป็นต้น แต่ต่อมาพบว่า การตรวจสอบหาส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นเอพิโทปของแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับ T-cell หรือ B-cell ก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้แอนติเจนที่คัดเลือกได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนที่มีประสิทธิภาพที่ดีมากขึ้น

ในปัจจุบันเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบหาส่วนที่มีคุณสมบัติเป็นเอพิโทปของแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับ T-cell หรือ B-cell มีอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเอพิโทปของ T-cell มีรูปแบบเป็นเส้นตรงถูกจับโดย MHC class I หรือ class II หรือ HLA ซึ่งในปัจจุบันส่วนที่เชื่อมต่อกันระหว่างลิแกนด์กับ T-cell สามารถทำการจำลองขึ้นมาได้อย่างค่อนข้างแม่นยำ²¹

เครื่องมือที่ใช้ในการทำนายหาเอพิโทปของ T-cell มีจำนวนมาก แต่ละเครื่องมือถูกพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการในการทำนายแตกต่างกัน เช่น ความสามารถในการจับกับ MHC class I หรือ class II หรือ HLA ประสิทธิภาพในการขนส่งของ transporter associated with antigen presentation (TAP) การแตกตัวของโปรตีโอโซม เป็นต้น ตัวอย่างของเครื่องมือ เช่น BIMAS (ภาพที่ 8), Epimatrix, Vaxitope เป็นต้น

The screenshot shows the Bimas web interface. At the top, under 'Analysis Options', there is a dropdown menu for 'HLA molecule' with options A1, A*0201, A*0205, A24, and A3. Next to it is a dropdown for 'n-mers' set to 9. Below this, 'Results Limited by:' has two radio buttons: 'Explicit Number' (selected) with a value of 20, and 'Predicted T_{1/2} >=' with a value of 100. A text box prompts the user to 'Please enter or paste an AA sequence to analyze (most formats accepted):'. Below the text box is a checkbox for 'Echo input sequence (generally recommended)' which is checked. At the bottom are 'submit' and 'reset' buttons. A credit line at the very bottom reads: 'Credits: WWW implementation by Ronald Taylor of BIMAS / CBEL / CIT / NIH'.

ภาพที่ 8 Bimas²²

ในทางตรงกันข้ามเครื่องมือที่ใช้ในการทำนายเอพิโทปของ B-cell มีจำนวนน้อยกว่า T-cell ทั้งนี้เพราะร้อยละ 90 ของเอพิโทปของ B-cell มักไม่อยู่ในรูปแบบเส้นตรง แต่อยู่ในรูปแบบ 3 มิติเนื่องมาจากการขดม้วนตัวไปมาของโปรตีน²¹ ทำให้การทำนายยังคงทำได้ยาก

และยุ่งยากกว่า ดังนั้นเครื่องมือที่พบส่วนใหญ่จึงเป็นการทำนายเอพิโทปของ B-cell ที่อยู่ในรูปแบบเส้นตรงตัวอย่างของเครื่องมือ เช่น 3DEX, CEP, BEpro, Antibody Epitope Prediction ของ IEDB (ภาพที่ 9) เป็นต้น

The screenshot shows the 'Antibody Epitope Prediction' web interface. It has a 'Specify Input' section with two options: 'Enter a Swiss-Prot ID' (with a text box and '(example: P02185)' next to it) and 'Or enter a protein sequence in plain format (50000 residues maximum):' (with a large text box). Below this is a 'Choose a method:' section with several radio buttons: 'Chou & Fasman Beta-Turn Prediction', 'Emini Surface Accessibility Prediction', 'Karpus & Schulz Flexibility Prediction', 'Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity', 'Parker Hydrophilicity Prediction', and 'BepiPred Linear Epitope Prediction' (which is selected). At the bottom right are 'Submit' and 'Reset' buttons.

ภาพที่ 9 Antibody Epitope Predictionของ IEDB²³

นอกจากมีการพัฒนาของเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำนายแล้ว ที่ผ่านมาแต่ละเครื่องมือถูกจัดเก็บและพัฒนาแยกออกจากกัน ทำให้อาจมีข้อจำกัดเมื่อนำมาใช้ร่วมกัน เช่น วัตถุประสงค์

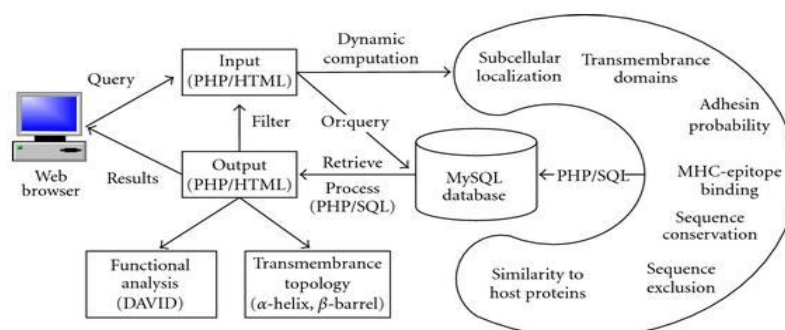
ในการพัฒนาและรูปแบบของข้อมูลที่แตกต่างกัน การติดตั้งโปรแกรมที่ยุ่งยาก หรือต้องการคอมพิวเตอร์ที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูง ด้วยปัญหาข้างต้นทำให้มีผู้พัฒนาโปรแกรม NERVE

(New Enhanced Reverse Vaccinology Environment) ขึ้น ตัวโปรแกรมสร้างขึ้นจาก ภาษา Perl สามารถทำการวิเคราะห์เป็นขั้นตอน โดยอาศัยเครื่องมือ 4 ชนิดที่รวมกันอยู่ใน โปรแกรม คือ เครื่องมือทำนายตำแหน่งที่อยู่ ของโปรตีน เครื่องมือทำนายโอกาสในการเป็น adhesin เครื่องมือทำนายรูปร่างโปรตีนที่แทรก อยู่ที่ยื่อหุ้มเซลล์ และเครื่องมือตรวจสอบความ คล้ายคลึงกับโปรตีนของคน²⁴ ซึ่งทำให้นักวิจัย ได้รับความสะดวกและประหยัดเวลาในการ ค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมโดยสามารถใช้ โปรแกรมนี้เพียงโปรแกรมเดียวก็สามารถค้นหา แอนติเจนที่เหมาะสมได้ แต่อย่างไรก็ตาม NERVE ยังคงต้องมีขั้นตอนในการดาวน์โหลด และขั้นตอนในการติดตั้งโปรแกรมที่เป็นภาษา Perl ซึ่งผู้ใช้ส่วนใหญ่ไม่คุ้นเคย จึงทำให้ ค่อนข้างยุ่งยากในการใช้งาน

จากปัญหาข้างต้นของ NERVE จึงมี ผู้พัฒนา Vaxign (<http://www.violinet.org/vaxign>) ขึ้นซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีความสะดวกในการใช้ งานมากขึ้น เนื่องจากเป็นเครื่องมือตัวแรกที่สามารถค้นหาแอนติเจนและแสดงผลลัพธ์ใน รูปแบบของเว็บไซต์ได้ ซึ่งในกระบวนการค้นหา แอนติเจนที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็น

วัคซีนของ Vaxign นั้น ประกอบด้วยเครื่องมือ ย่อย 7 เครื่องมือที่มีวัตถุประสงค์ในการทำงาน ต่างกัน (ภาพที่ 10) ได้แก่ เครื่องมือที่ใช้ทำนาย ตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีน เครื่องมือที่ใช้ทำนาย รูปร่างโปรตีนที่แทรกอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เครื่องมือที่ใช้ทำนายโอกาสในการเป็น adhesin เครื่องมือที่ใช้ค้นหาลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) ระหว่างจีโนมอื่น ๆ เครื่องมือที่ใช้ ในการแยกลำดับที่เหมือนกับที่พบในสายพันธุ์ที่ ไม่ก่อให้เกิดโรค เครื่องมือที่ใช้ตรวจสอบความ คล้ายคลึงกับโปรตีนของคน และเครื่องมือที่ใช้ ทำนายความสามารถของเอพิโทปในการจับกับ MHC class-I และ class-II นอกจากนี้แล้ว Vaxign ยังให้บริการฐานข้อมูลเกี่ยวกับแอนติเจน ของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ อีกมากกว่า 70 ชนิด ซึ่งได้ มีการทำนายล่วงหน้าไว้ก่อนแล้ว ทำให้ประหยัด เวลาและงบประมาณต่อผู้วิจัยที่สนใจในการ พัฒนาวัคซีนสำหรับเชื้อนั้น ๆ อีกด้วย²⁵

จากตัวอย่างการพัฒนาของเครื่องมือ ดังกล่าว ทำให้คาดได้ว่าในอนาคตเครื่องมือที่ใช้ จะมีความสามารถในการทำนายแ่งมุมต่าง ๆ หลากหลายและแม่นยำขึ้น มีความสะดวก รวดเร็วในการใช้งานเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 10 Vaxign²⁵

การพัฒนาในด้านเทคนิคหรือวิธีการค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสม

การค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมโดยกระบวนการในการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับนั้น เริ่มต้นจากการค้นหาโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนโดยใช้เครื่องมือต่าง ๆ ต่อจากนั้นต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติเจนนั้นในสัตว์ทดลอง เช่น หนู เพื่อดูความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน แต่ในบางกรณีที่ไม่สามารถใช้สัตว์ทดลอง หรือกระบวนการในการเตรียมสัตว์ทดลองสำหรับเชื้อบางชนิดค่อนข้างยุ่งยาก ทำให้เสียเวลาและงบประมาณในขั้นตอนนี้นี้อ่อนแอ

ในการแก้ปัญหาดังกล่าว Ge และคณะ²⁶ นำเสนอกระบวนการที่เรียกว่า pooling strategy ซึ่งเป็นกระบวนการที่นำแอนติเจนทั้งหมดที่ค้นพบจากการใช้เครื่องมือในการทำนายมา รวมกันเพื่อนำไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง จากนั้นประยุกต์ใช้กระบวนการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น affinity chromatographic purification, competitive ELISA และ Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) เพื่อตรวจสอบความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของแอนติเจนแต่ละชนิดโดยไม่จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งจากกระบวนการดังกล่าวนี้ทำให้สามารถลดการใช้สัตว์ทดลองลงไปได้จำนวนมาก ส่งผลต่อระยะเวลาในการพัฒนาวัคซีนสั้นลง อีกทั้งจากงานวิจัยนี้ยังพบว่า การนำแอนติเจนที่ค้นพบทั้งหมดมารวมกันนั้นให้ผลเสริมกันในการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้นนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยแอนติเจนหลายชนิดรวมกัน นอกจากนี้วัคซีนที่ประกอบด้วยแอนติเจนหลายชนิดรวมกันอาจเป็นทางเลือกในการแก้ปัญหา

ความหลากหลายของแอนติเจนของหลายสายพันธุ์ที่พบในเชื้อก่อโรคที่ทำให้วัคซีนที่พัฒนาขึ้นในอดีตไม่มีประสิทธิภาพในการสร้างภูมิคุ้มกันได้

บทสรุป

กระบวนการในการพัฒนาวัคซีนหน่วยย่อยแบบเดิม เป็นกระบวนการที่ใช้เวลามากในขั้นตอนการค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมซึ่งโดยทั่วไปใช้ระยะเวลาถึง 5-15 ปี นอกจากนั้นแอนติเจนที่ค้นพบอาจไม่ใช่แอนติเจนที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุดเพราะมักพบเฉพาะแอนติเจนที่ผลิออกมาในปริมาณมากในระหว่างการเพาะเลี้ยง อีกทั้งกระบวนการพัฒนาแบบนี้ยังไม่สามารถนำมาใช้กับเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องทดลองได้ด้วยเหตุต่าง ๆ ดังกล่าวทำให้ไม่สามารถพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคต่าง ๆ อีกจำนวนมากได้

กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการแก้ข้อจำกัดที่พบในกระบวนการพัฒนาวัคซีนหน่วยย่อยแบบเดิมดังกล่าว โดยกระบวนการนี้อาศัยการใช้เครื่องมือบนคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์และทำนายหาแอนติเจนที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาวัคซีนโดยใช้เพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ต้องการศึกษาเท่านั้น ทำให้ระยะเวลาในการค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสมน้อยลง เหลือเพียง 1-2 ปี อีกทั้งอาจยังสามารถค้นพบแอนติเจนใหม่อีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งแอนติเจนเหล่านี้ไม่สามารถค้นพบจากกระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบเดิมได้ กระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ครั้งแรกในการพัฒนาวัคซีน

ป้องกันโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่เกิดจาก *Neisseria meningitidis* serogroup B ทำให้สามารถพัฒนาวัคซีนที่สามารถป้องกันโรคดังกล่าวได้ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ย่อย

ดังนั้นในอนาคตจึงมีการคาดการณ์ว่ากระบวนการพัฒนาวัคซีนแบบย้อนกลับนี้จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาวัดขึ้นป้องกันโรคชนิดใหม่ในปัจจุบันยังไม่สามารถพัฒนาได้ ซึ่งอาจส่งผลให้โรคติดเชื้อต่าง ๆ ที่เป็นปัญหาสำคัญอยู่ในขณะนี้มีความการติดเชื่อน้อยลง และสุดท้ายอาจกำจัดโรคดังกล่าวให้หายไปจากโลกได้ดังเช่นที่เคยเกิดขึ้นกับโรคติดเชื้อบางโรคในอดีต

เอกสารอ้างอิง

1. Roush SW, Murphy TV. Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. *JAMA*. 2007;298(18):2155-63.
2. Zepp F. Principles of vaccine design- Lessons from nature. *Vaccine*. 2010 31;28:14-24.
3. Delany I, Rappuoli R, Seib KL. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3:1-16.
4. Adu-Bobie J, Capecchi B, Serruto D, Rappuoli R, Pizza M. Two years into reverse vaccinology. *Vaccine*. 2003;21(7-8):605-10.
5. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3:445-50.
6. Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 2001;19:2688-91.
7. Keretho S, Keinduangchan J, Piamsanga P. Introduction Bio-Mirror of Asia-Pacific Advanced Network's biological sequence databanks. *Nectec Technical J*. 2000;11(8):119-26.
8. Bertholet S, Reed SG, Rappuoli R. Reverse vaccinology. In: Nor NM, Acosta A, Sarmiento ME, editors. *The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2010. p.415-31
9. Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S, Brinkman FS, Raghava GP, Flower DR, et al. Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. *Trends Biotechnol*. 2008; 26(4):190-200.
10. Capecchi B, Serruto D, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Pizza M. The genome revolution in vaccine research. *Curr Issues Mol Biol*. 2004;6(1):17-27.
11. National Center for Biotechnology Information. ORF Finder (Open Reading Frame Finder) [Online]. n.d. [cited 2015 Feb 9]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>
12. National Center for Biotechnology Information. BLAST [Online]. n.d. [cited 2015 Feb 9]; Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
13. Simon Fraser University. psortb [Online]. n.d. [cited 2015 Feb 9];

- Available from: URL: <http://www.psorth.org/psorthb>
14. Vyse A, Wolter JM, Chen J, Ng T, Soriano-Gabarro M. Meningococcal disease in Asia: an under-recognized public health burden. *Epidemiol Infect.* 2011;139(7):967-85.
 15. Major M, Moss S, Gold R. From genes to vaccine: A breakthrough in the prevention of meningococcal group B disease. *Paediatr Child Health.* 2011;16(8):61-4.
 16. Delany I, Rappuoli R, Seib KL. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(5):1-17
 17. Serruto D, Adu-Bobie J, Capecchi B, Rappuoli R, Pizza M, Maignani V. Biotechnology and vaccines: application of functional genomics to *Neisseria meningitidis* and other bacterial pathogens. *J Biotechnol.* 2004;113(1-3):15-32.
 18. U.S. Food and Drug Administration. BEXSERO [Online]. n.d. [cited 2015 Feb 9]; Available from: <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm431374.htm>
 19. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Vaccination [Online]. n.d. [cited 2014 Nov 11]; Available from: <http://www.cdc.gov/pneumococcal/vaccination.html>
 20. Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, T.M. Wizemann, J.H. Heinrichs, J.E. Adamou, et al. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun.* 2001;69(3):1593-8.
 21. He Y, Xiang Z. Databases and in silico tools for vaccine design. *Methods Mol Biol.* 2013;993:115-27.
 22. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. HLA Peptide Binding Predictions [Online]. n.d. [cited 2015 April 20]; Available from: http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind.
 23. IEDB Analysis Resource. Antibody Epitope Prediction [Online]. n.d. [cited 2015 April 20]; Available from: <http://tools.immuneepitope.org/bcell>
 24. Vivona S, Bernante F, Filippini F. NERVE: new enhanced reverse vaccinology environment. *BMC Biotechnol.* 2006;6:35.
 25. He Y, Xiang Z, Mobley HL. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:297505.
 26. Ge X, Kitten T, Munro CL, Conrad DH, Xu P. Pooled protein immunization for identification of cell surface antigens in *Streptococcus sanguinis*. *PLoS One.* 2010;5(7):e11666.