1. บทคัดย่อภาษาไทย

ทีมวิจัยของเราประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในโลกในการสร้าง NhuMAb ที่สามารถยับยั้งไวรัสเดงกี่ (DENV) ทั้ง 4 สายพันธ์โดยวิธี Hybridoma (SPYMEG cell) โดยคัดเลือก candidate NhuMAb ที่ดีที่สุดจำนวน 3 clones ที่สามารถยับยั้งการติดเชื้อ DENV clinical isolates ได้ สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ suckling mice ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถยับยั้งและลดปริมาณ DENV จนไม่เหลือในกระแสเลือดของลิง Marmoset เลยภายใน 2 วัน โดยเราพบว่า Epitope ของ DENV ที่จับเฉพาะกับ NhuMAb เหล่านี้ อยู่ที่ตำแหน่ง envelope protein ในส่วน Domain II ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้เราได้ทำการพัฒนาวัคซีน Epitope based สำหรับป้องกันไข้เลือดออกเดงกี่ โดยสร้าง Recombinant protein (rE74-118) และสังเคราะห์ Peptide (OF0709-D) ที่มี Amino acid ตามลำดับ Epitope ของ DENV ที่จับเฉพาะกับ **Nhu**MAb ที่ยับยั้ง DENV ทั้ง 4 serotypes ที่เราได้สร้างไว้ นำมาผสมกับสารเสริมฤทธิ์ (adjuvants) 2 ชนิด ได้แก่ GERBU และ Freund's adjuvant (FCA/FIA) แล้วทดลองฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง BALB/c พบว่ากลุ่มควบคุมที่กระตุ้นด้วย DENV-2 (NGC) ($2.5x10^4$ ffu/dose) และกลุ่มทดลองที่กระตุ้นด้วย rE74-118 (100 μg/dose) สามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดี ส่วนกลุ่มทดลองที่กระตุ้นด้วย OF0709-D (100 μg/dose) กระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้น้อย และสารเสริมฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ใกล้เคียงกัน แต่ DENV-2 (NGC) ผสมกับ GERBU จะกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดีกว่าผสมกับ FCA/FIA จะเห็นได้ว่าเปปไทด์สายสั้นมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้น้อย จะต้องหาสารเสริมฤทธิ์ตัวใหม่ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่วน rE74-118 กระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดี มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสได้ไม่ดีมากนัก แต่ไม่กระตุ้นให้เกิด ADE นอกจากนี้ทีมวิจัยของเราได้สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) หลายๆแบบในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยDENV serotype 1 สายพันธ์ Mochizuki โดยมี MAb 7F4 เป็น MAb ชนิด IgG3 subclass และสามารถยับยั้งDENV ได้ดีโดยไม่มี enhancing activity จากการใช้ MAb 7F4 ที่ประมาณ 10 ng/ml สามารถแสดงผล 50% plaque reduction ในการทำ neutralization test ที่ทดลองในเซลล์ vero โดยพบว่าไม่มี enhancing activity เลย แม้จะใช้ MAb ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (0.01-1 ng/ml) ในการทดลองด้วย FcγR-bearing cells เช่น K562, U937, หรือ HL-60 cells โดยพบว่า MAb 7F4 จับกับ DENV serotype 1 ที่ตำแหน่ง Domain II ของโปรตีน envelope การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ใช้ MAb 7F4 เป็นโมเดลในการพัฒนา Plasmid DNA โดยตัดต่อแอนติบอดียีนส่วน 7F4 heavy (H)- หรือ light (L)-chain variable region เข้าสู่ Mammalian expression plasmid แล้วจึงทำการทดสอบการ express MAb ที่สามารถยับยั้ง DENV ในหนู โดยหนูถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmids และตรวจสอบระดับของ neutralizing MAb ในซีรั่มที่ได้ โดยพบว่า หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Plasmids 100 ng สามารถสร้าง neutralizing MAb ในซีรั่มได้ภายใน 3 วันหลังจากฉีด และสาร MAb ที่สร้างได้อยู่ในกระแสเลือดได้นานอย่างน้อย 3 เดือน การสร้าง MAb ที่เร็วและอยู่ได้ยาวนานในซีรั่มหนู แสดงถึงประสิทธิภาพของ Plasmid ในการสร้าง neutralizing MAb ต่อ DENV โดยไม่มี enhancing activity

คำสำคัญ (Key words) วัคซีน เปปไทด์ ดีเอ็นเอ แอนติบอดียับยั้ง ไวรัส ไข้เลือดออกเดงกี่

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

Using SPYMEG cell, Neutralizing human monoclonal antibodies (NhuMAbs) against 4 serotypes of Dengue virus (DENV) has been developed by our research team. Three candidates of NhuMAbs were found to completely neutralize 20 clinical isolates DENV *in vitro* and completely reduce DENV *in vivo* in DENV challenged suckling mice and Marmoset monkies, respectively. The epitope of these NhuMAbs were found to be on evelope protein domain II (EDII) of DENV. In this study, both recombinant and peptide antigens were synthesized based on epitope on EDII of DENV, mixed with adjuvants (Gerbu and Freund's complete/incomplete adjuvants (FCA/FIA)), then respectively immunize to BALB/c mice. It was found that mice immunized with control DENV-2 (NGC) at $2.5x10^4$ ffu/dose plus GERBU secreted immune response better than those plus with FCA/FIA. Followed by, mice immunized with rE74-118 (100 µg/dose) with GERBU could secrete immune response better than those without GERBU. Mice immunized with OF0709-D peptide (100 µg/dose) were found to secrete poor immune response eventhough mixed with GERBU. We also previously generated various monoclonal antibodies (MAbs) in mice immunized with the Mochizuki strain of DENV-1. Among these, the 7F4 antibody, an IgG3 subclass antibody, showed high neutralizing activity but no detectable enhancing activity. Specifically, 50% plaque reduction was achieved at approximately10 ng/ml 7F4 in a conventional neutralization test using Vero cells, whereas no enhancing activity was seen, even at low concentrations (0.01–1 ng/ml) in our enhancing antibody assay system using Fc _R-bearing cells, such as K562, U937, or HL-60 cells. The target epitope of 7F4 is located in domain II of the envelope (E) protein of DENV-1. In this study, we used 7F4 as the model antibody to evaluate neutralizing antibody expression in mice. Mice were co-inoculated with plasmids containing the 7F4 heavy (H)- or light (L)-chain variable region gene and their serum neutralizing antibody levels were monitored. Mice co-inoculated with 100 µg of plasmids produced detectable serum neutralizing antibody 3 days after inoculation, which was maintained for at least 3 months. This rapid and long-term appearance of the expressed antibody in mouse sera suggests a potential antibody expression strategy against dengue, using a neutralizing antibody with no enhancing activity.

(Key words) Vaccine, Pepide, DNA, Neutralizing antibody, Dengue virus