



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทูลพัฒนาศักยภาพด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลาง

รหัส RSA56

(ภาษาไทย)

การศึกษาเอพิโทป และ พัฒนาวัดขึ้นป้องกันและยับยั้งโรคไข้เลือดออก

จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสไข้เลือดออก

(ภาษาอังกฤษ)

Epitope mapping and Vaccine development from
monoclonal antibodies that neutralized Dengue virus.

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ราม งามสุต

ศูนย์ความเป็นเลิศการวิจัยแอนติบอดี

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

มหาวิทยาลัยมหิดล

1. บทคัดย่อภาษาไทย

ทีมวิจัยของเราประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในโลกในการสร้าง NhuMAB ที่สามารถยับยั้งไวรัสเดงกี (DENV) ทั้ง 4 สายพันธุ์โดยวิธี 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 ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้เราได้ทำการพัฒนาวัคซีน Epitope based สำหรับป้องกันไข้เลือดออกเดงกี โดยสร้าง Recombinant protein (rE74-118) และสังเคราะห์ Peptide (OF0709-D) ที่มี Amino acid ตามลำดับ Epitope ของ DENV ที่จับเฉพาะกับ NhuMAB ที่ยับยั้ง DENV ทั้ง 4 serotypes ที่เราได้สร้างไว้นำมาผสมกับสารเสริมฤทธิ์ (adjuvants) 2 ชนิด ได้แก่ GERBU และ Freund's adjuvant (FCA/FIA) แล้วทดลองฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง BALB/c พบว่ากลุ่มควบคุมที่กระตุ้นด้วย DENV-2 (NGC) (2.5×10^4 ffu/dose) และกลุ่มทดลองที่กระตุ้นด้วย rE74-118 (100 μ g/dose) สามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดี ส่วนกลุ่มทดลองที่กระตุ้นด้วย OF0709-D (100 μ g/dose) กระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้น้อย และสารเสริมฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ใกล้เคียงกัน แต่ DENV-2 (NGC) ผสมกับ GERBU จะกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดีกว่าผสมกับ FCA/FIA จะเห็นได้ว่าเปปไทด์สายสั้นมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้น้อยจะต้องหาสารเสริมฤทธิ์ตัวใหม่ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่วน rE74-118 กระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดี มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสได้ไม่มากนัก แต่ไม่กระตุ้นให้เกิด ADE นอกจากนี้ทีมวิจัยของเราได้สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) หลายๆ แบบในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย DENV serotype 1 สายพันธุ์ Mochizuki โดยมี MAb 7F4 เป็น MAb ชนิด IgG3 subclass และสามารถยับยั้ง DENV 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 Fc γ R-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 โดยตัดต่อแอนติบอดีในส่วน 7F4 heavy (H)- หรือ light (L)-chain variable region เข้าสู่ Mammalian expression plasmid แล้วจึงทำการทดสอบการ express MAb ที่สามารถยับยั้ง DENV ในหนู โดยหนูถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmids และตรวจสอบระดับของ neutralizing MAb ในซีรัมที่ได้ โดยพบว่า หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Plasmids 100 ng สามารถสร้าง neutralizing MAb ในซีรัมได้ภายใน 3 วันหลังจากฉีด และสาร MAb ที่สร้างได้อยู่ในกระแสเลือดได้นานอย่างน้อย 3 เดือน การสร้าง MAb ที่เร็วและอยู่ได้ยาวนานในซีรัมหนู แสดงถึงประสิทธิภาพของ Plasmid ในการสร้าง neutralizing MAb ต่อ DENV โดยไม่มี enhancing activity

คำสำคัญ (Key words) วัคซีน เปปไทด์ ดีเอ็นเอ แอนติบอดียับยั้ง ไวรัส ไข้เลือดออกเดงกี

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 monkeys, respectively. The epitope of these NhuMAbs were found to be on envelope 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 2.5×10^4 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 approximately 10 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_γR-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

2. สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	หน้า
สารบัญตาราง (List of Tables)	6
สารบัญภาพ (List of Illustration)	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	8
ข. ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง	
1. บทนำ	9
1.1 วัตถุประสงค์	11
2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	11
3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	14
3.1 การพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine	14
3.2 การสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody gene จาก MAbs โคลน 7F4	18
4. ผลการวิจัย	20
4.1 การพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine	20
4.2 การสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody gene จาก MAbs โคลน 7F4	28
5. อภิปรายและวิจารณ์ผล	38
5.1 การพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine	38
5.2 การสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody gene จาก MAbs โคลน 7F4	39
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	41
6.1 การพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine	41
6.2 การสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody gene จาก MAbs โคลน 7F4	42
7. บรรณานุกรม (Bibliography)	43
8. ผลผลิตของงานวิจัย	49
9. รายชื่อนักวิจัยทุกคน	50

3. สารบัญตาราง (List of Tables) (ถ้ามี)	หน้า
ตารางที่ 1 รายละเอียดของกลุ่มหนูทดลองที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน	16
ตารางที่ 2 แสดงระยะเวลาจำนวนวันของแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งไวรัส (Neutralizing) โดยปราศจากการส่งเสริมการติดเชื้อ (Enhancing) จากซีรัมหนู	38

4. สารบัญภาพ (List of Illustration) (ถ้ามี)	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงแผนผังขั้นตอนการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแอนติเจน และวิธีการตรวจสอบภูมิคุ้มกัน	17
ภาพที่ 2 ระดับการหลังแอนติบอดีหลังจากการกระตุ้นด้วย DENV-2 (NGC) ที่ผสมกับ GERBU และ FCA/FIA	21
ภาพที่ 3 ระดับการหลังแอนติบอดีหลังจากการกระตุ้นด้วย rE74-118 ที่ผสมกับ GERBU และ FCA/FIA	21
ภาพที่ 4 ระดับการหลังแอนติบอดีหลังจากการกระตุ้นด้วย OF0709-D ที่ผสมกับ GERBU และ FCA/FIA	22
ภาพที่ 5 การ express rE74-118 ใน <i>E. coli</i> strain shuffle โดยมีขนาดของ expressed protein อยู่ที่ 17 kDa	22
ภาพที่ 6 โปรตีน rE74-118 ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์และตรวจการจับกับ MAb โคลน S4	23
ภาพที่ 7 ระดับของ IgG ที่เฉพาะกับ Dengue E protein. NGC (positive control) recombinant E protein และ peptide D	24
ภาพที่ 8A การทำ Focus reduction neutralization test (FRNT) ใน Vero cell	25
ภาพที่ 8B การทำ ADE assay ใน K562 cell	
ภาพที่ 9 เซลล์ม้ามจากหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย NGC-GERBU, E74-Freud, และ E74-GERBU	27
ภาพที่ 10 การผลิต recombinant antibodies ในหลอดทดลอง (In vitro expression)	28
ภาพที่ 11 ระดับปริมาณ Dose-dependent ของการสร้าง Neutralizing antibody ในหนูทดลอง ICR ที่ถูกฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G2b	33
ภาพที่ 12 ช่วงระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของระดับ Neutralizing antibody ในหนู ICR ที่ถูกฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G3	34
ภาพที่ 13 ช่วงระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของระดับ Neutralizing antibody ในหนู BALB/c ที่ถูกฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G3	36

5. คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ADE	Antibody Dependent Enhancement
CPE	cytopathic effect
DENV	Dengue virus
DF	Dengue Fever
DHF	Dengue Hemorrhagic Fever
DSS	Dengue Shock Syndrome
EDII	Envelope protein Domain II
E-protein	Envelope protein
Fab	Fragment antigen binding
FBS	Fetal Bovine Serum
Fc	Fragment crystalization
FCA/FIA	Freud complete adjuvant / Freud incomplete adjuvant
Fc γ R	Fc-gamma receptor
FRNT	Focus reduction neutralization test
(H) - chain	heavy chain
IgG	Immunoglobulin G
(L)-chain	light chain
MAbs	Monoclonal antibody
NhuMAb	Neutralizing human monoclonal antibody
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear cell
TPB	Tryptose Phosphate Broth
WHO	World Health Organization

ข. ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง

1. บทนำ

โรคไข้เลือดออกจัดเป็นเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus) โดยมียุงลายสายพันธุ์ *Aedes aegypti* เป็นพาหะนำโรคหลัก (Clyde et al., 2006) โดยไข้เลือดออกสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่มอาการ คือ Dengue Fever (DF), Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), และ Dengue Shock Syndrome (DSS) จากรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่า 2 ใน 5 ของประชากรโลกมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสเดงกี และพบว่าประชากรประมาณ 50-100 ล้านคนทั่วโลกติดเชื้อไวรัสเดงกี (WHO, 2009) ซึ่งในจำนวนนี้มีผู้ป่วยจำนวนถึง 500,000 คนที่เป็นโรคไข้เลือดออกชนิดรุนแรง (DHF or DSS) (Qi et al., 2008) ที่ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตถึง 20,000 คนต่อปี (Gubler, 2002) ในการควบคุมและป้องกันโรคไข้เลือดออก ขณะนี้ยังไม่มียาหรือวัคซีนโดยเฉพาะ ซึ่งการควบคุมโรคสามารถทำได้โดยป้องกันการการแพร่พันธุ์เพิ่มปริมาณยุงพาหะนำโรค ทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย ให้ความรู้แก่ประชาชนในการป้องกันตนเองไม่ให้ถูกยุงกัด จากปัญหาที่จนถึงปัจจุบันยังคงไม่มีสารสำหรับรักษาไข้เลือดออก ทำให้นักวิจัยทั่วโลกพยายามพัฒนาสารดังกล่าวขึ้น การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมนุษย์ที่ยับยั้งไวรัสไข้เลือดออก (Neutralizing Human Monoclonal Antibody; NhuMAb) เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่นักวิจัยคาดหวังจะพัฒนาเป็นยารักษาโรคไข้เลือดออกในอนาคต

ไม่นานมานี้ ทีมวิจัยของเราประสบความสำเร็จในการสร้าง MAb ของมนุษย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส Dengue ทั้ง 4 serotypes โดยใช้ Peripheral Blood Mononuclear cell (PBMC) จากผู้ที่แสดงอาการป่วยเป็นไข้เลือดออก โดยสามารถสร้าง MAb มนุษย์ได้ทั้งหมด 20 โคลน ที่ยับยั้งไวรัส Dengue 4 serotypes (Neutralizing human MAb; NhuMAb) และสามารถยับยั้งได้มากกว่า 90 % (90% neutralization activity) ซึ่งถือได้ว่าเป็นครั้งแรกในโลกที่นักวิจัยได้สร้าง NhuMAb มนุษย์ที่สามารถยับยั้งไวรัส Dengue ทั้ง 4 สายพันธุ์โดยวิธี Hybridoma (SPYMEG cell) (Setthaparamote et al, 2012) โดย NhuMAbs ดังกล่าวได้ผ่านการจดสิทธิบัตรหมายเลข WO 2013035345A2, และ WO 2014064943A1 ที่คุ้มครองใน 9 ประเทศ: (www.google.com/patents/WO2013035345A2; <https://www.google.com/patents/WO2014064943A1>)

จาก NhuMAb ยับยั้งไวรัส Dengue ทั้ง 4 สายพันธุ์ ทั้งหมด 20 โคลน เราได้คัดเลือก candidate NhuMAb ที่ดีที่สุดจำนวน 3 clones มาทำการทดสอบการยับยั้งไวรัส Dengue เข้าสู่เซลล์ โดยใช้เชื้อไวรัส Dengue clinical isolates จำนวน 20 isolates (serotype ละ 5 isolates) โดยพบว่า NhuMAb ทั้ง 3 clones สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส Dengue clinical isolates จำนวน 20 isolates ได้ทั้งหมด โดยยับยั้งได้ดีกว่า Laboratory strains (Sasaki et al, 2013) และทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส Dengue ในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ใน suckling mice ที่ถูกฉีดเชื้อเข้าสมอง และในลิง Marmoset ที่ถูกฉีดเชื้อช่องท้องตามด้วยการฉีด NhuMAb เพื่อรักษา โดย NhuMAb สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนู suckling mice ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sasaki et al, 2013) และสามารถยับยั้งลดปริมาณไวรัส Dengue จนไม่เหลือในกระแสเลือดของลิง Marmoset เลย์ภายใน 2 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (www.google.com/patents/WO2013035345A2)

โดยทีมวิจัยของเราได้ทำการศึกษา Epitope ของไวรัสไข้เลือดออกที่จับเฉพาะกับ Neutralizing human MAb (NhuMAb) ที่เราได้พัฒนาขึ้น และพบว่า Epitope อยู่ที่ตำแหน่ง envelope protein ในส่วน Domain II

ได้มีการพัฒนาวัคซีนชนิด Epitope based vaccine มาใช้กับโรคติดเชื้อหลายๆ โรค โดยเมื่อนักวิจัยค้นพบตำแหน่งของ Epitope ของเชื้อไวรัสที่จับเฉพาะกับ NhuMAb สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสนั้นได้แล้ว ก็จะทำการศึกษาสังเคราะห์ Peptide ที่มี Amino acid ตาม Epitope เหล่านั้น แล้วนำมาผสมกับ Adjuvant เพื่อนำมาทดลองฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง แล้วจึงทดสอบเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป

ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เราจะทำการพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Epitope based vaccine โดยจะทำการสังเคราะห์ Peptide ที่มี Amino acid ตาม Epitope ของไวรัสไข้เลือดออกที่จับเฉพาะกับ MAb ของมนุษย์ (ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 serotypes) ที่เราได้ค้นพบไว้แล้ว แล้วจึงทำการทดสอบวัคซีนในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ต่อไป

และจากการที่ทีมวิจัยของเราได้สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) หลายๆ แบบในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสแดงที่ serotype 1 สายพันธุ์ Mochizuki (Yamanaka et al, 2013) โดยมี MAb 7F4 เป็น MAb ชนิด IgG3 subclass และสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสแดงได้ดีโดยไม่มี enhancing activity โดยการใช้ MAb 7F4 ที่ประมาณ 10 ng/ml สามารถแสดงผล 50% plaque reduction ในการทำ neutralization test ที่ทดลองในเซลล์ vero โดยพบว่าไม่มี enhancing activity เลยแม้จะใช้ MAb ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (0.01-1 ng/ml) ในการทดลองด้วย FcγR-bearing cells เช่น K562, U937, หรือ HL-60 cells (Konishi et al, 2010) โดยพบว่า MAb 7F4 จับกับไวรัสแดงที่ serotype 1 ที่ตำแหน่ง Domain II ของโปรตีน envelope

การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ใช้ MAb 7F4 เป็นโมเดลในการพัฒนา Plasmid DNA โดยตัดต่อแอนติบอดี ยีนส่วน 7F4 heavy (H)- หรือ light (L)-chain variable region เข้าสู่ Mammalian expression plasmid แล้วจึงทำการทดสอบการ express MAb ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสแดงที่ในหนู โดยหนูจะถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmids และตรวจสอบระดับของ neutralizing MAb ในซีรัมที่ได้ โดยผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Plasmids 100 ng สามารถสร้าง neutralizing MAb ในซีรัมได้ภายใน 3 วันหลังจากฉีด และสามารถสร้าง MAb ที่อยู่ในกระแสเลือดได้นานอย่างน้อย 3 เดือน การสร้าง MAb ที่เร็วและมีระยะเวลาอยู่ยาวนานในซีรัมหนู แสดงถึงประสิทธิภาพในการสร้าง neutralizing MAb ต่อไวรัสแดงที่ โดยไม่มี enhancing activity (Yamanaka et al, 2015)

1.1 วัตถุประสงค์

1.1.1 เพื่อพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine โดยใช้ข้อมูล Epitope จาก human MAbs (ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสแดงที่ทั้ง 4 serotypes) ที่เราค้นพบไว้แล้ว

1.1.2 เพื่อสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody gene จาก MAbs โคลน 7F4 และทดสอบการสร้างแอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อไวรัสแดงที่ในหนูทดลองที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmid DNA ที่สร้างได้

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

แอนติบอดี หรือ Recombinant antibody fusion proteins จะประกอบด้วยส่วน extracellular domain ส่วน Immuno-regulatory proteins และส่วน constant (Fc) domain ของ Immunoglobulin G (IgG) ซึ่งส่วนหลังนี้จะเป็นส่วนที่ใช้แยกชนิดของ IgG ซึ่ง IgG class จะแบ่งออกเป็น 4 Isotypes ในมนุษย์จะประกอบไปด้วย IgG1, IgG2, IgG3 และ IgG4 ส่วนในหนูจะประกอบด้วย IgG1, IgG2a, IgG2b และ IgG3 โดยจะมีความเหมือน (Homology) ของกรดอะมิโน มากกว่า 95% แต่จะมีความแตกต่างกันของกรดอะมิโนและรูปร่างของส่วนข้อต่อ (Hinge region)

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางชีวภาพทางการแพทย์มีความก้าวหน้าไปเป็นอย่างมาก เช่น มีการใช้ Hybridoma technology (Kohler and Milstein, 1975) ในการผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและรักษาโรค ซึ่งทำโดยผสมรวมเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนหรือสัตว์ (ที่สร้างแอนติบอดี) กับเซลล์เนื้องอก myeloma ซึ่งในช่วงทศวรรษที่ 19 -20 มีการผลิต MAb จากหนู (immunized mice) ขึ้นมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคกันอย่างมากมาย และในปี ค.ศ. 2008 ได้มีการพัฒนาเซลล์ myeloma ชนิดใหม่ขึ้นมาชื่อว่า SPYMEG cell (MBL, Japan) โดยมีส่วนผสมของเซลล์ Mega karyoblast ของมนุษย์ ทำให้สามารถผลิต MAb ของมนุษย์ได้ ซึ่งได้มีการใช้ SPYMEG cell เพื่อผลิต MAb ของมนุษย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Kubota-Koketsu et al 2009) และไวรัสไข้เลือดออก (Setthapramote et al, 2012) ได้สำเร็จ

จากการวิเคราะห์ฐานข้อมูลทรัพยากรชีวสารสนเทศทางปัญญา พบสิทธิบัตรของการสร้างแอนติบอดีเพื่อใช้รักษาโรคในกลุ่ม West Nile Virus (WNV) (รวมทั้งไข้เลือดออก) ของ Diamond et al (2011) สิทธิบัตรหมายเลข US 7,981,422 B2 ออกสิทธิบัตรให้เมื่อวันที่ 19 มิถุนายน พ.ศ. 2554 เรื่อง “Antibodies Against West Nile Virus and Therapeutic And Prophylactic uses Thereof” โดยสรุปคือ Diamond et al (2011) ได้สร้างแอนติบอดีและแอนติบอดี fragments ที่สามารถจับเฉพาะกับเชื้อไวรัสในกลุ่ม West Nile Virus (WNV) รวมทั้งได้พัฒนาวิธีการป้องกันและรักษาอาการป่วยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ flavivirus ซึ่งจะเกี่ยวกับวิธีการพัฒนาแอนติบอดี ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคไวรัสในกลุ่ม West Nile Virus (Diamond et al, 2011)

โรคไข้เดงกี (Dengue fever) และไข้เลือดออกเดงกี (Dengue hemorrhagic fever) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่เกิดขึ้นในทั่วโลกที่ต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน (Halsted, 2007; Guzman 2014) โดยเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus; DENV) ที่มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ (DENV-1 ถึง DENV-4) (Pierson and Diamond, 2013) การใช้วัคซีนถือเป็นมาตรการในการควบคุมโรคไข้เลือดออกที่มีประสิทธิภาพสูงโดยใช้ต้นทุนที่ต่ำที่สุด (Coller et al, 2010; Jindal et al, 2014) ในปัจจุบันมีวัคซีนป้องกันไข้เลือดออกทั้งหมด 6 แบบที่กำลังได้รับการพัฒนาและทดสอบทางคลินิก (Clinical trials) (Thomas and Endy, 2013 ; Ishigawa, 2014) โดยวัคซีนที่กำลังพัฒนาเหล่านี้สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อไวรัส (neutralizing antibodies) ในผู้ที่ได้รับวัคซีนได้ ถึงแม้ว่าระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคจะยังไม่มีการศึกษายืนยันแน่ชัด แต่แอนติบอดีที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ก็ถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการป้องกันโรค และยังมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไวรัสในผู้ติดเชื้อ (Hombach et al, 2005; Ishigawa

2014) ซึ่งปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ก็เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าส่งผลต่อการเกิดความรุนแรงของโรค (Vaughn, 2000)

หนึ่งในอุปสรรคที่ขัดขวางการพัฒนาวัคซีนไข้เลือดออก คือปรากฏการณ์การส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสรวมทั้ง ลักษณะอาการป่วยหลังการติดเชื้อไวรัส (Huisman et al, 2009 ; Heinz et al, 2012) โดยแอนติบอดีที่เป็นตัวส่งเสริมการติดเชื้อ (Enhancing antibody) จะเป็นปัจจัยที่เร่งให้มีการเพิ่มปริมาณไวรัสในกระแสเลือด ดังที่กล่าวไว้ในทฤษฎี “แอนติบอดีที่ส่งเสริมการติดเชื้อ (antibody-dependent infection enhancement; ADE)” (Halstead et al, 2003) ที่อธิบายว่า แอนติบอดีที่ส่งเสริมการติดเชื้อที่ถูกสร้างจากการติดเชื้อครั้งแรก (primary infection) จากการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์หนึ่ง โดยแอนติบอดีที่สร้างขึ้นนี้จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดิมจากการติดเชื้อครั้งแรกได้ แต่จะไม่สามารถยับยั้ง (non-neutralizing) เชื้อไวรัสต่างสายพันธุ์จากการติดเชื้อครั้งหลัง โดยปลายส่วน Fab ของแอนติบอดีจะจับกับไวรัสต่างสายพันธุ์ (cross-reactive antibody) และปลายส่วน Fc ของแอนติบอดีจะไปจับกับ Fc-gamma receptor (Fc γ R) บน monocytes/macrophages ทำให้เพิ่มการนำพาไวรัสเข้าสู่เซลล์ monocytes/macrophages มากขึ้น โดยปกติแล้วโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ส่วนใหญ่ที่มีการยับยั้งเชื้อจะแสดงผลการส่งเสริมการติดเชื้อด้วยเช่นกัน โดยเกิดในความเข้มข้นของแอนติบอดีที่น้อยๆ (sub neutralizing) (Morens et al, 1987) สิ่งนี้จึงเป็นการเตือนว่าวัคซีนที่สามารถกระตุ้นแอนติบอดีที่มีการยับยั้งเชื้อก็สามารถกระตุ้นการส่งเสริมการติดเชื้อได้ด้วยเช่นกัน (Huisman et al, 2009 ; Heinz et al, 2012)

สถานะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ไหลเวียนอยู่ในร่างกายมีแอนติบอดีหลายๆชนิด บางตัวแสดงการยับยั้ง และบางตัวแสดงการส่งเสริมการติดเชื้อ ปัจจุบันการพัฒนาระบบที่ใช้เซลล์ที่มี Fc γ R-expressing หรือ -bearing cells เพื่อการตรวจสอบความสมดุลระหว่างแอนติบอดีที่ยับยั้งและส่งเสริมการติดเชื้อ ซึ่งปกติแล้วการประมาณค่าของ neutralizing activity ค่ามักจะได้น้อยกว่าใน neutralization test ทั่วไปที่ทดลองในเซลล์ vero (Rodrigo et al, 2009; Konishi et al, 2010; Moi et al, 2012) นี่อาจจะอธิบายประสิทธิภาพการป้องกัน (ประมาณ 60%) ของ dengue tetravalent chimeric candidate vaccine ซึ่งสามารถกระตุ้นแอนติบอดีต่อเชื้อเดงกีทุกชนิดได้ใน การทดลอง neutralization test ในเซลล์ vero (Sabchareon et al, 2012 ; Capeding et al, 2014; Villar et al, 2015)

การเกิดแอนติบอดีที่ส่งเสริมการติดเชื้ออาจจะลดประสิทธิภาพของวัคซีนที่สร้างแอนติบอดีเพื่อป้องกันโรค ดังนั้นวัคซีนไข้เลือดออกที่เหมาะสมจึงควรสร้างให้เกิดเฉพาะแอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อเท่านั้นโดยไม่ส่งเสริมการติดเชื้อ

แอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการทำ passive immunotherapeutic ซึ่งได้รับการออกแบบมาให้ขัดขวางการส่งเสริมการติดเชื้อ (Lai et al, 2007; Balsitis et al, 2010 ; Chan et al 2013) ตำแหน่งและลำดับของ amino acid ของส่วนที่มีผลต่อการจับกับ Fc γ R ต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อยืนยันผล (Shields et al, 2001; Lazar et al, 2006) อย่างไรก็ตาม บางครั้งแอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ก็มีระยะเวลาอยู่ในกระแสเลือดสั้นเกินไปที่จะป้องกันการติดเชื้อตามธรรมชาติ ดังนั้น เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการพัฒนาเทคนิคการส่งยีนที่สร้างแอนติบอดีในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้และยังสร้างให้อยู่ใน

ร่างกายได้ยาวนานขึ้น (Lewis et al, 2002 ; Tjelle et al, 2004) ดังนั้นวิธีการนี้อาจจะช่วยแก้ปัญหาทางทฤษฎีในการลดเกิด enhancing antibodies ของวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ที่สร้าง neutralizing แอนติบอดีให้สร้าง neutralizing antibodies ได้ระยะเวลานานขึ้น โดยที่ไม่มี enhancing activity

ได้มีการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) หลายๆแบบในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสเดงกี serotype 1 สายพันธุ์ Mochizuki (Yamanaka et al, 2013) โดยมี MAb โคลน 7F4 เป็น MAb ชนิด IgG3 subclass ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้ดี โดยไม่มี enhancing activity โดยการใช้ MAb 7F4 ที่ประมาณ 10 ng/ml สามารถแสดงผล 50% plaque reduction ในการทำ neutralization test ที่ทดลองในเซลล์ vero โดยพบว่าไม่มี enhancing activity เลยแม้จะใช้ MAb ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (0.01-1 ng/ml) ในการทดลองด้วย FcγR-bearing cells เช่น K562, U937, หรือ HL-60 cells (Konishi et al, 2010) โดยพบว่า MAb 7F4 จับกับไวรัสเดงกี serotype 1 ที่ตำแหน่ง Domain II ของโปรตีน envelope

Yamanaka et al, (2015) จึงได้ใช้ MAb 7F4 เป็นโมเดลในการพัฒนา Plasmid DNA โดยตัดต่อแอนติบอดียีนส่วน 7F4 heavy (H)- หรือ light (L)-chain variable region เข้าสู่ Mammalian expression plasmid แล้วจึงทำการทดสอบการ express MAb ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีในหนู โดยหนูจะถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmids และตรวจสอบระดับของ neutralizing MAb ในซีรัมที่ได้ โดยผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า หนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Plasmids 100 ng สามารถสร้าง neutralizing MAb ในซีรัมได้ภายใน 3 วันหลังจากฉีด และสามารถสร้าง MAb ที่อยู่ในกระแสเลือดได้นานอย่างน้อย 3 เดือน การสร้าง MAb ที่เร็วและมีระยะเวลาที่ยาวนานในซีรัมหนู แสดงถึงประสิทธิภาพในการสร้าง neutralizing MAb ต่อไวรัสเดงกี โดยไม่มี enhancing activity (Yamanaka et al, 2015)

3. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine โดยใช้ข้อมูล Epitope จาก human MAbs (ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 serotypes)

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส (Virus propagation) จากตัวอย่างซีรัมหนู

ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ C6/36 โดยใช้วิธีตามที่ทีมวิจัยของเราเคยทำไว้ (Setthapramote et al, 2012; Sasaki et al, 2013) โดยสรุปขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1.1.1 การเตรียมเซลล์ C6/36 (Cell preparation)

เลี้ยงเซลล์ C6/36 ในภาชนะ T-75 flask โดยใช้อาหารเหลว L-15 ที่เติม Fetal Bovine Serum (FBS) 10% และ Tryptose Phosphate Broth (TPB) 0.3% ในตู้บ่ม 28 องศาเซลเซียส จนได้เซลล์เรียงตัวชั้นเดียว (monolayer) ที่มีความหนาแน่นประมาณ 90-95% (90-95% confluent) เพื่อที่จะนำไปใช้เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสที่แยกออกมาจากเลือดผู้ป่วย โดยจะลงเซลล์ (seed) ในภาชนะ T-75 flask อันใหม่ก่อนการใส่เชื้อไวรัส 1 คิน ด้วยความหนาแน่นของเซลล์ 7.5×10^5 cells/flask

3.1.1.2 การใส่เชื้อไวรัสลงในเซลล์ C6/36 (Cell infection)

ก่อนการใส่เชื้อไวรัส จะดูลักษณะของเซลล์ที่เตรียมไว้ว่ามีการเรียงตัวเป็นชั้นเดียวด้วยความหนาแน่นประมาณ 70-75% และไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น (contamination) แล้วจึงนำอาหารออกจากเซลล์ ล้างด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 10 ml จำนวน 1 ครั้ง เพื่อเอา FBS ออกจากเซลล์ให้ได้มากที่สุด (FBS มีฤทธิ์ขัดขวางเชื้อไวรัสไม่ให้เข้าสู่เซลล์) หลังจากนั้นเติมซีรัมผู้ป่วย 50 μ l ลงในเซลล์พร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS (L-15 + 0.3% TPB) อีก 3 ml บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่ม 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (พลิกภาชนะทุกๆ 20 นาที) แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่มี FBS (L-15 + 10% FBS + 0.3% TPB) ลงไป 12 ml บ่มเซลล์ที่อยู่ในภาชนะต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-7 วัน จนสังเกตเห็น cytopathic effect (CPE) ประมาณ 50% จึงทำการเก็บเชื้อไวรัสในขั้นตอนต่อไป

3.1.1.3 การเก็บเชื้อไวรัส (Virus harvest)

เมื่อเซลล์แสดงลักษณะ CPE ประมาณ 50% จะทำการเก็บเฉพาะอาหารเหลวที่เซลล์ปลดปล่อยเชื้อไวรัสออกมา ย้ายใส่ลงในหลอดขนาด 50 ml และนำไปปั่นด้วยความแรง 3,000 rpm นาน 20 นาที แบ่งส่วนใสที่ปั่นได้ใส่หลอด twist top vial tube ประมาณ 1-1.5 ml/tube และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สารละลายเชื้อไวรัสจะถูกนำมาหา virus titer ตามวิธีของ Setthapramote *et al*, 2012 ซึ่งจะคำนวณออกมาได้เป็น FFU/ml ก่อนจะนำไปใช้ในขั้นตอน FRNT

3.1.2 การสังเคราะห์เปปไทด์

หลังจากวิเคราะห์ตำแหน่งที่แนบตัวของเอพิโทป จาก consensus sequence ของ Random peptide phage และ จากตำแหน่งการจับกับ NhuMAbs บน Envelope protein โดยวิธี X-ray crystallography และเปรียบเทียบกับตำแหน่งของ Envelope protein ส่วน Domain II ของไวรัสเดงกีแล้ว เราได้ทำการสังเคราะห์ peptide ตามตำแหน่ง เอพิโทปที่วิเคราะห์ได้ แล้วจึงนำ peptide ที่สังเคราะห์ได้ ไปใช้ในการทดสอบการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองต่อไป โดยได้จ้างบริษัท Molecular Biology Laboratory (MBL) ให้ทำการสังเคราะห์ peptide ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง โดยมีชื่อและลำดับ peptide ดังต่อไปนี้

1. CPK-D OF0709-A
DKRFVCKHSMVDRGWGNGCG
2. CPK-D OF0709-B
DKRFVCKHSMVDRGW
3. CPK-D OF0709-C
RFVCKHSMVDRGWGN
4. CPK-D OF0709-D
VCKHSMVDRGWGNGC
5. CPK-D OF0709-E
KHSMVDRGWGNGCG

6. CPK-D OF0709-F
SMVDRGWGNGCGLFG.

3.1.3 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง

เราได้ทำการสังเคราะห์เปปไทด์ ทั้งหมด 6 เส้นตามรายละเอียดข้างต้น โดยเลือกเปปไทด์จำนวน 1 เส้นมาใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลองในระยะเริ่มต้น สำหรับการทดลองฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนในหนูทดลองนั้นเราได้ใช้หนูทดลองสายพันธุ์ Balb/C จำนวน ทั้งหมด 20 ตัว ในการทดลองระยะเริ่มแรก โดยมีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) โดยเราได้เลือกใช้แอนติเจนทั้งหมด 3 ชนิด คือ ไวรัสที่ทำให้อ่อนเชื้อ (inactivated virus) รีคอมบิแนนท์โปรตีนส่วน 74-109 และเปปไทด์สายสั้น และใช้สารเสริมฤทธิ์สองชนิด คือ Freund's complete adjuvant / Freund's incomplete adjuvant (FCA/FIA) และ GERBU โดยมีรายละเอียดของกลุ่มทดลองดังตารางที่ 1

Injection agents	FCA/FIA	GERBU	TOTAL
DENV-2 (NGC)	2	2	4
rE74-118	2	2	4
OF0709-D	2	2	4
Uninfected culture fluid	2	2	4
PBS	2	2	4
TOTAL	10	10	20

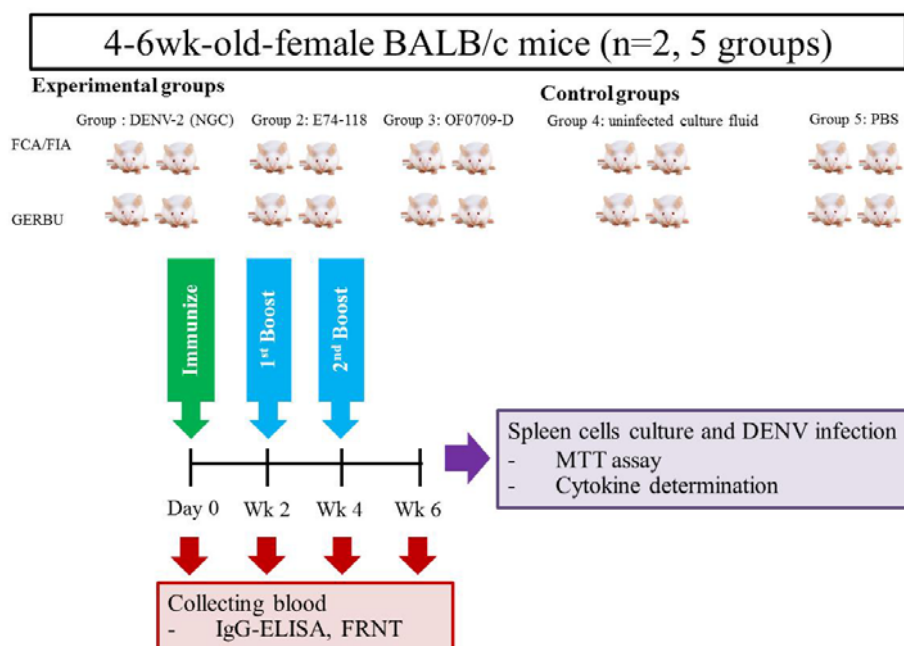
ตารางที่ 1 รายละเอียดของกลุ่มหนูทดลองที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน

และมีขั้นตอนการฉีดกระตุ้นดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนดังนี้

- 3.1.3.1 ผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและสารเสริมฤทธิ์ในปริมาณ 1:1 (80 μ l : 80 μ l) ใน microtube แล้วดูดสารเตรียมไว้ใน syringe พร้อม needle วางไว้บนน้ำแข็ง โดยจะได้ final injection volume = 100 μ l / dose
- 3.1.3.2 ฉีดสารที่ผสมสารเสริมฤทธิ์แล้วในหนูทดลองบริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ปริมาณ 100 μ l / dose เป็นจำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ เรียกการฉีดแต่ละครั้งว่า Immunization, Boost I และ Boost II
- 3.1.3.3 เก็บเลือดก่อนการฉีดสารทุกครั้ง และเก็บเลือดหลังการฉีดครั้งสุดท้ายอีก 1 ครั้ง ภายหลังการฉีดสาร 2 สัปดาห์ โดยการเก็บเลือดทำการเก็บบริเวณข้างแก้ม (submandibular puncture) จะได้เลือดครั้งละประมาณ 200 μ l เก็บอยู่ใน EDTA-tube
- 3.1.3.4 ทำการปั่นเลือดที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส นำไปทำ ELISA เพื่อตรวจสอบตอบสนองต่อสารที่ฉีดเข้าไปว่าสามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้หรือไม่ โดยเลือดที่เก็บครั้งสุดท้ายจะถูกนำไปตรวจสอบปริมาณ neutralizing antibodies ที่หลั่งออกมา โดยวิธี focus reduction neutralization test (FRNT) ใน Vero cell (Setthapramote *et al.*, 2012) และ ADE

assay โดยใช้ K562 cell (Yamanaka *et al.*, 2013) ขั้นตอนนี้เป็น การตรวจสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune response)

3.1.3.5 หลังการเก็บเลือดครั้งสุดท้าย ทำการผ่าซากหนูเพื่อเก็บตัวอย่างม้าม (spleen) นำไป culture ใน RPMI medium และ incubate รวมกับ ไวรัสเดงกี ทั้ง 4 สายพันธุ์ เพื่อดูความสามารถในการกระตุ้น T cell response (cell mediated immune response) โดยการตรวจสอบ cytotoxicity ด้วยวิธี colorimetric MTT (tetrazolium) assay และตรวจหาปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาด้วยวิธี standard sandwich ELISA



ภาพที่ 1 แสดงแผนผังขั้นตอนการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแอนติเจน และวิธีการตรวจสอบภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้น

3.2. การสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody gene จาก MABs โคลน 7F4 และ ทดสอบการสร้างแอนติบอดีที่ยังเชื่อไวรัสไข้เลือดออก ในหนูทดลองที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmid DNA ที่สร้างได้

3.2.1 แอนติบอดี (antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี 7E4 (MAb 7F4) สร้างจากการฉีดไวรัสเดงกี serotype 1 สายพันธุ์ Mochizuki ให้แก่หนูทดลอง อธิบายไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Yamanaka et al, 2013)

3.2.2 พลาสมิด (Plasmids)

pFUSE-based plasmids คือเวกเตอร์ที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดี ซึ่งประกอบด้วยยีนที่จะสร้างความแตกต่างใน MAb 7F4 และสร้างชิ้นส่วน constant ของ H chain (IgG2b หรือ IgG3) หรือ L chain (k) (Yamanaka et al, 2013) (รูปที่ 10A) เริ่มจากออกแบบการผสมพลาสมิดที่สร้าง H chain (IgG2b หรือ IgG3) และ L chain ในปริมาณที่เท่ากันได้เป็น 'p7F4G2b' หรือ 'p7F4G3' ตามลำดับ พลาสมิดชนิด p7F4G3 มียีน original signal sequence มาจาก 7F4 hybridoma ที่ได้แทนที่ด้วย interleukin 2 (IL2ss) โดยใช้สร้างทั้ง พลาสมิดที่ผลิต H chain กับ L chain (ออกแบบการผสมใน 'p7F4-IL2ss'; รูปที่ 10A) โดยใช้ KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo, Osaka, Japan) โดยที่ลำดับเบส (nucleotide sequence) ของยีน IL2ss คือ 5'-ATGTACAGGATGCAACTCCT GTCTTGCACTTGCCTTAAGTCTTGCACTTGTACGAATTGCG-3' นำยีนของทั้ง H และ L chain ประกอบอยู่ใน p7F4G3 ไปโคลนใน single plasmid vector (pIRES; Clontech, Mountain View, CA) โดยใช้ NheI/MluI sites downstream จาก cytomegalovirus promoter และ XbaI/NotI sites downstream จาก the internal ribosome: ยีนของ H- และ L-chain (pIRES7F4HL) หรือ L- and H-chain genes (pIRES7F4LH; รูปที่ 10A) จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นยีนด้วยการทำ DNA sequencing

3.2.3 การผลิตในหลอดทดลอง (*in vitro* expression)

เซลล์ 293T (Yamanaka et al, 2014) เลี้ยงใน 6-well plates และ co-transfect ด้วย Lipofectamine®LTX และ PLUSTM Reagent (Invitrogen, Gaithers-burg, MD) พร้อมด้วย 2 µg pFUSE-based plasmids ที่มียีน H- และ L-chain (แต่ละอันใส่ 1 µg) หรือ pIRES-based plasmid ทำตามขั้นตอนในคำแนะนำของผู้ผลิต เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 1-5 วัน และเก็บ culture fluid เพื่อวัดปริมาณแอนติบอดีต่อไป

3.2.4 การทดลองในหนู

ฉีด single dose (50–200 µg: 0.5–2 mg/ml) ของ p7F4G2b หรือ p7F4G3 ให้หนู ICR หรือ BALB/c เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ 10-12 ตัว (น้ำหนักตัว 25-30 กรัม; สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา) โดยการฉีดที่ intra tibial inoculation ด้วย electroporator (NEPA21; Nepa Gene, Chiba, Japan) โดยใช้ electroporator (NEPA21; Nepa Gene, Chiba, Japan) พร้อมกับ poring pulse (voltage, 100 V; pulse interval, 50 ms; pulse length, 30 ms; number of pulses, 3; 10% decay rate with + polarity) และ transfer pulse (voltage, 20 V; pulse interval, 50 ms;

pulse length, 50 ms; number of pulses, 5; 40% decay rate with $\pm$ polarity) โดยที่โดสที่ใช้อ้างอิงจากปริมาณทั้งหมดของ H- และ L- chain plasmids เก็บเลือดหนู 3 วันก่อนฉีด และวันที่ 3, 5, 7 และ 9 หลังฉีด หนูมีเลือดออกในช่วงเวลาครึ่งเดือนเป็นเวลา 3 เดือน คัดแยกซีรัมของหนู ICR จากเลือดและทดสอบแต่ละตัวในการทดลองแอนติบอดี ส่วนซีรัมจากหนู BALB/c จะนำมารวมกันก่อน โดยการทดลองที่ทำในหนูทั้งหมดทำตามระเบียบของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และ Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

3.2.5 เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อทดสอบแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกี serotype1

ระดับของแอนติบอดีในซีรัมของหนูวัดด้วยเทคนิค ELISA (Yamanaka et al, 2008) โดยใส่ rabbit hyperimmune serum against DENV-1 ลงไปใน micro-plates จากนั้นเติม corresponding DENV-1 antigen ตามด้วยซีรัมหนูที่เจือจาง 1:30 และ alkaline-phosphatase-conjugated anti-mouse IgG ตามด้วย *p*-nitrophenylphosphate

3.2.6 เทคนิค ELISA เพื่อหาความเข้มข้นของ IgG

ขั้นตอนของ sandwich ELISA ทำตามที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (Yamanaka et al, 2008) โดยนำ rabbit anti-mouse IgG ใส่ใน microplates แล้วเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ในที่นี้คือ culture fluids ตามด้วย alkaline-phosphatase-conjugated anti-mouse IgG และ *p*-nitrophenyl phosphate ซึ่งความเข้มข้นของ IgG คำนวณจากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของ standard mouse sera ที่รู้ความเข้มข้นของ IgG แล้ว โดยใช้ฟังก์ชัน FORECAST ในโปรแกรม Microsoft excel

3.2.7 การทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส (Neutralization test)

การทดสอบ plaque reduction neutralization ทำในเซลล์ vero กับ ไวรัสเดงกีชนิดที่ 1 (สายพันธุ์ Mochizuki) ซึ่งได้อธิบายไว้แล้ว (Yamanaka et al, 2013) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ผสมไวรัสเข้ากับแอนติบอดีโดยเติม rabbit complement ให้ได้ความเข้มข้นที่ 5% จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนบ่มไว้ที่ 4 °C เลี้ยงเซลล์ vero ใน 24-well plate จากนั้นเติม ส่วนผสม ไวรัส-แอนติบอดีลงไป บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 วัน โดยที่ผลของ neutralizing รายงานออกมาเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการลดลง (percentage reduction) ใช้จำนวน plaque เปรียบเทียบกับกับคอนโทรลที่ไม่มีแอนติบอดี

3.2.8 การหาความสมดุลระหว่างการยับยั้ง (Neutralizing) และการส่งเสริม (Enhancing)

ความสมดุลระหว่างการทำการยับยั้งและการส่งเสริมการติดเชื้อทดสอบด้วยเซลล์กิ้งคอย K562 ตามที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (Yamanaka et al, 2013) ขั้นตอนคร่าวๆดังนี้ ผสมไวรัสชนิดที่ 1 เข้ากับแอนติบอดีที่เจือจาง (serial dilution) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยที่เติมหรือไม่เติม 5 % rabbit complement จากนั้นเติมเซลล์ K562 ลงไป และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนับเซลล์หลังจากตรึงเซลล์และย้อมด้วย immunochemical คำนวณค่า cut off ของการยับยั้งและการเสริมฤทธิ์ จากค่าเฉลี่ย $\pm$ 2 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD) ของ 8 negative controls ปรับจากค่าประมาณ

100 เซลล์ที่ติดเชื้อ ตัวชี้วัดการเกิดการเสริมฤทธิ์ ค่า fold enhancement คำนวณจากการเพิ่มของการนับเซลล์ที่ติดเชื้อเทียบกับในคอนโทรลที่การเจือจางต่างๆของแอนติบอดีพร้อมกับค่าสูงสุดของ enhancing โดยรายงานค่าเป็น $\log_{10}$

3.2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในค่าเฉลี่ยของระดับความสามารถยับยั้งเชื้อของแอนติบอดีหรือค่าของแอนติบอดี ELISA คำนวณด้วย student's t- test ส่วนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่า plaque reduction คำนวณด้วย Mann-Whitney U test การมีนัยสำคัญพิจารณาจากค่าความน่าจะเป็นที่น้อยกว่า 0.05

4. ผลการวิจัย (ควรมีรูปภาพหรือตาราง)

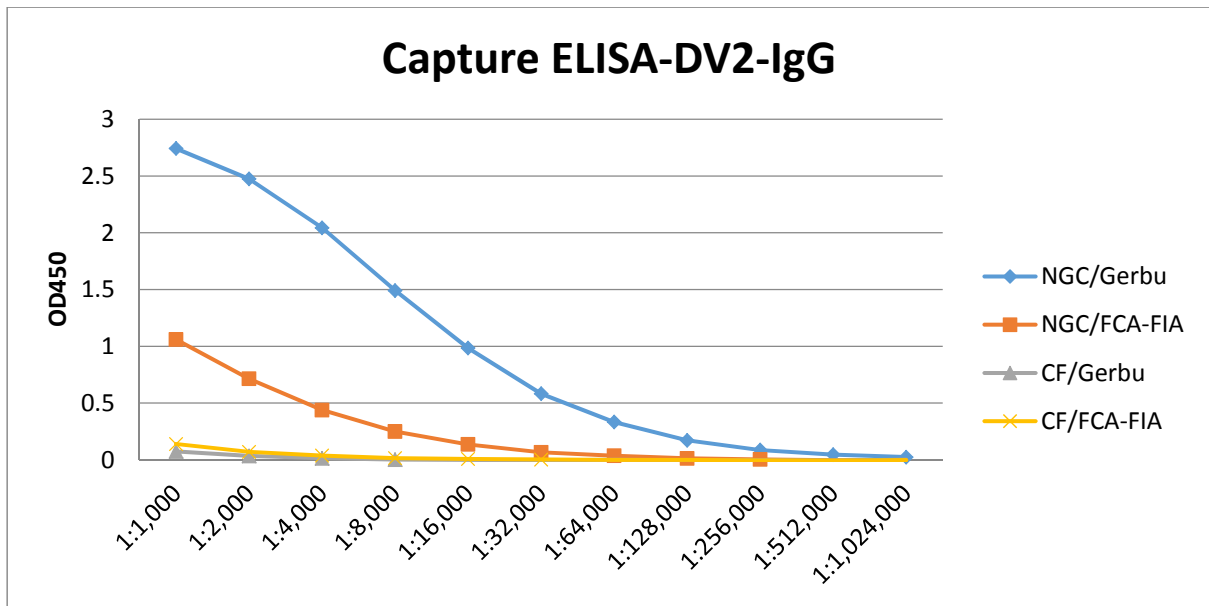
4.1 การพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine โดยใช้ข้อมูล Epitope จาก human MAbs (ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 serotypes)

จากการทดลองฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแอนติเจน 3 ชนิดพบว่า การกระตุ้นหนู BALB/c ด้วย DENV-2 (NGC) ที่ 2.5×10^4 ffu/dose สามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้เมื่อผสมกับสารเสริมฤทธิ์ GERBU adjuvant โดยการใช้ GERBU สามารถกระตุ้นการตอบสนองของหนูทดลองได้ดีกว่า Freund's complete/incomplete (ภาพที่ 2)

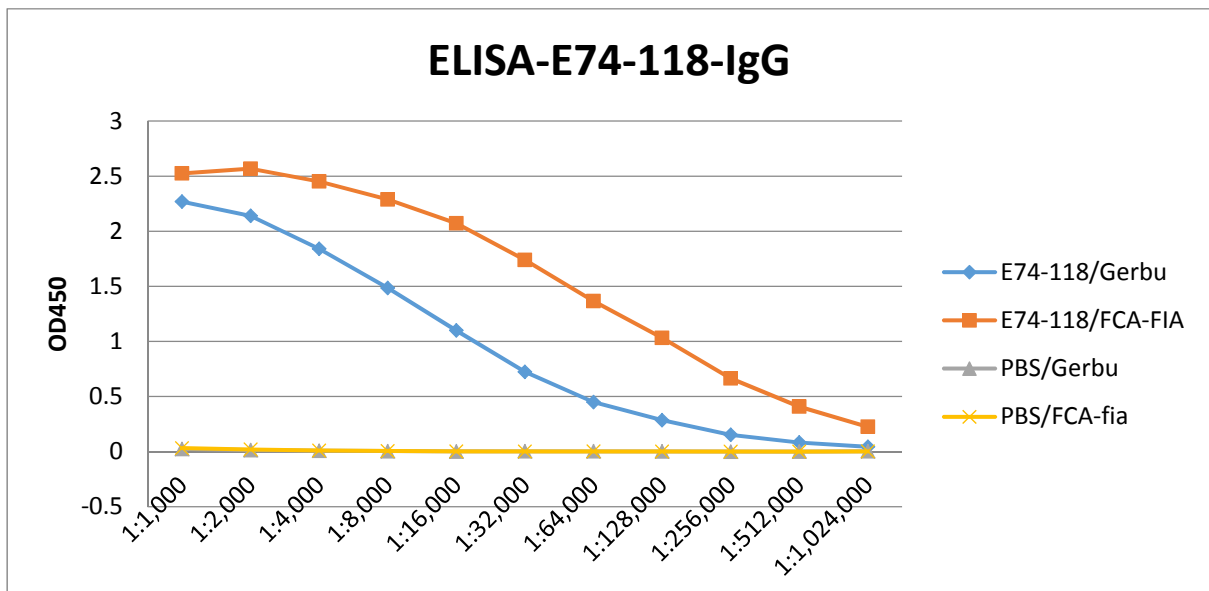
ส่วนการกระตุ้นหนู BALB/c ด้วย rE74-118 (100 μ g/dose) สามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดีทั้งที่ผสมกับ GERBU และ FCA/FIA (ภาพที่ 3)

การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู BALB/c ด้วยเปปไทด์ OF0709-D (100 μ g/dose) สามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้น้อย (รูปภาพที่ 4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์สายสั้นมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้น้อย ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไป เราจะทำการปรับปรุงแก้ไขให้สามารถเพิ่มการตอบสนองภูมิคุ้มกันของหนูทดลองจากฉีดกระตุ้นโดยเปปไทด์สายสั้น ซึ่งอาจจะทำได้โดยการเพิ่มการ label เปปไทด์สายสั้นด้วยสาร hapten เช่น Conjugate keyhole limpet hemocyanin (KLH) Carrier Protein Immunogens ซึ่งมีรายงานวิจัยพบว่าสามารถเพิ่มการตอบสนองภูมิคุ้มกันของหนูทดลองได้ดี

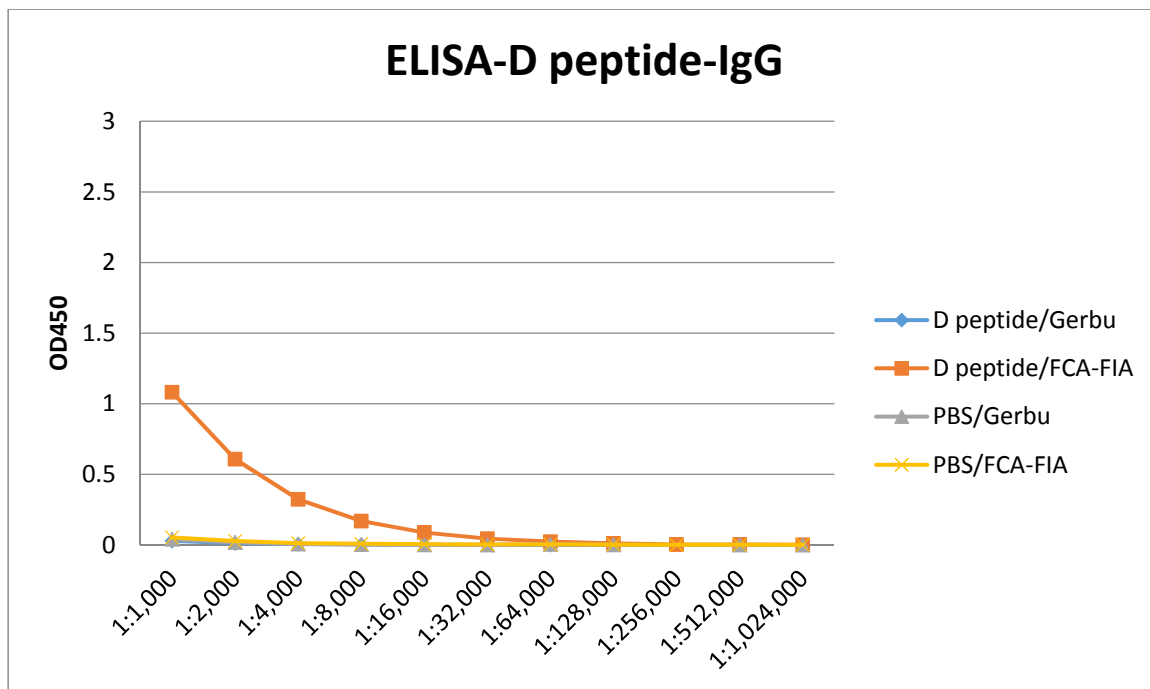
(<http://www.piercenet.com/cat/klh-carrier-protein-immunogens>)



ภาพที่ 2 ระดับการหลังแอนติบอดีหลังจากการกระตุ้นด้วย DENV-2 (NGC) ที่ผสมกับ GERBU และ FCA/FIA



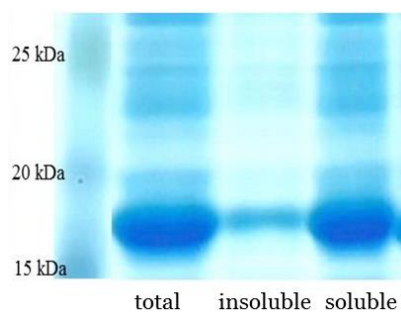
ภาพที่ 3 ระดับการหลังแอนติบอดีหลังจากการกระตุ้นด้วย rE74-118 ที่ผสมกับ GERBU และ FCA/FIA



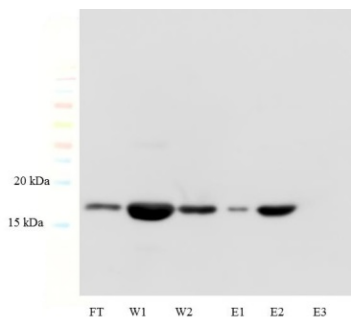
ภาพที่ 4 ระดับการหลังแอนติบอดีหลังจากการกระตุ้นด้วย rE74-118 ที่ผสมกับ GERBU และ FCA/FIA

4.1.2 การ Express recombinant protein

ได้ทำการ express recombinant protein ส่วน envelope ของ Dengue virus (rE74-118), ซึ่งเป็นส่วนที่ทดสอบแล้วว่าจับกับ neutralizing antibodies ต่อ Dengue virus ทั้ง 4 serotypes โดยทำการ express ใน *E. coli* (shuffle) โดยใช้ pET-32b system โดย expressed protein ที่ได้เป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ (soluble part) ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Hitrap affinity column ตามด้วยการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting โดยใช้ Fraction E2 (แสดงผลดังภาพที่ 5 และ 6) เพื่อใช้ต่อไปในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง (Immunogen)



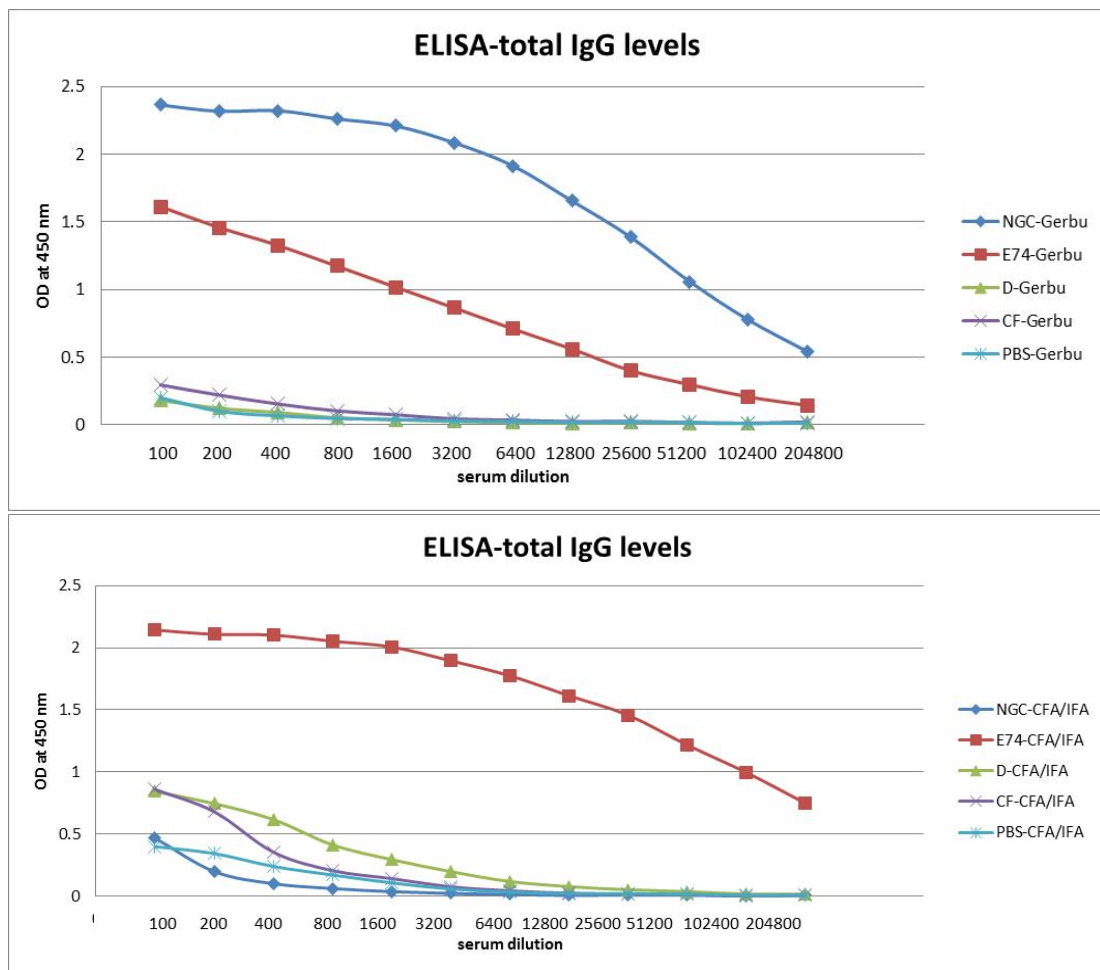
ภาพที่ 5 การ express rE74-118 ใน *E. coli* strain shuffle โดยมีขนาดของ expressed protein อยู่ที่ 17 kDa



ภาพที่ 6 โปรตีน rE74-118 ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์และตรวจการจับกับ MAb โคโลน 54, Flow through = FT, W1 = wash 1, W2 = wash 2, E1 = Elution1, E2 = Elution2, E3 = Elution 3

4.1.3 การวัดปริมาณ IgG ที่จับเฉพาะกับ envelope protein

ปริมาณ IgG antibodies ที่จับเฉพาะกับ envelope protein ได้ถูกวัดโดยวิธี ELISA โดย recombinant envelope protein ผสมกับ carbonate buffer จะถูก coated บน 96 well microtiter plates ที่ความเข้มข้น 300 ng/well แล้ว Incubated ไว้ 1 คืนแล้วล้างหลุมด้วย PBS ที่ผสม 0.05% Tween -20 (PBS-T) แล้ว plate ถูก blocked ด้วย 200 μ l/well blocking buffer (1% BSA ใน PBS-T) นาน 2 ชม. ที่ 37°C 1 ชั่วโมง หลังจากล้างอีก 3 ครั้ง plates จะถูกเติมด้วยสารละลาย TMB 100 μ l และหยุดปฏิกิริยาด้วย 2 N H_2SO_4 จำนวน 25 μ l โดยผลการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 7



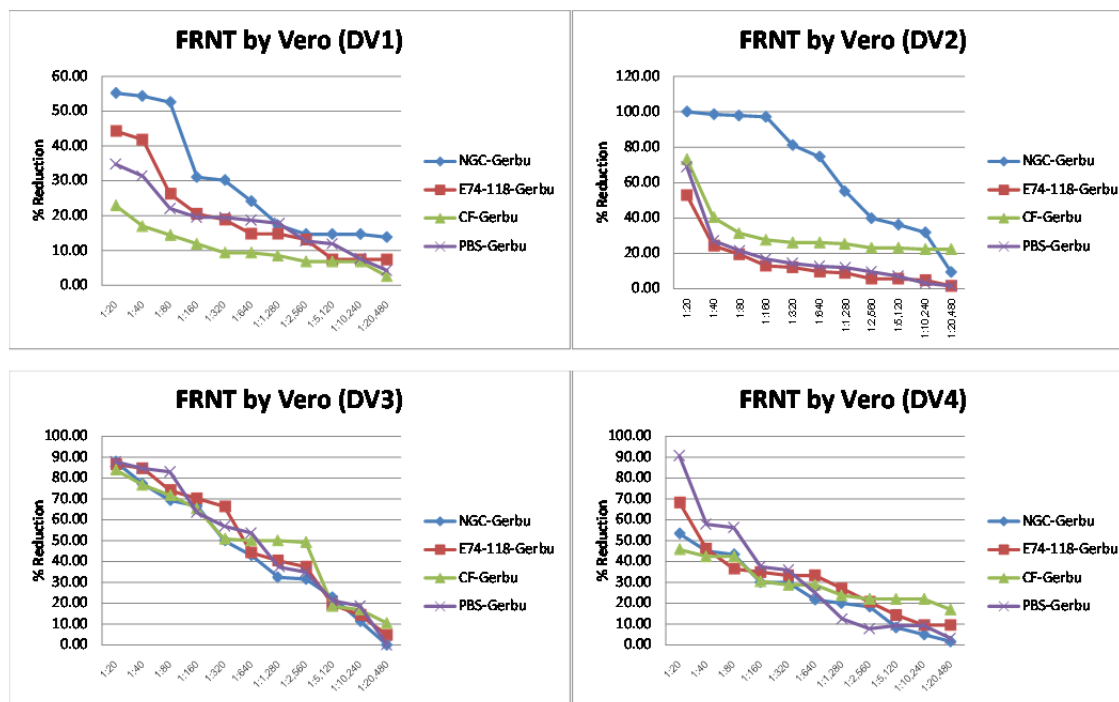
ภาพที่ 7 ระดับของ IgG ที่เฉพาะกับ Dengue E protein. พบว่า NGC (positive control) และ recombinant E protein สามารถกระตุ้นการสร้าง anti-E IgG ได้ในสัตว์ทดลอง ส่วน peptide D, PBS (negative control) และ culture fluid (Negative control) กระตุ้นให้เกิดการสร้าง IgG ในระดับที่ต่ำมาก การใช้ GERBU เป็น adjuvants จะสามารถกระตุ้นการสร้าง IgG ได้ดีกว่าการใช้ FCA/FIA

4.1.4 การทำ Focus reduction neutralization test (FRNT)

โดยสรุป ซีรัมของหนูที่ถูก Inactivated ด้วยความร้อนที่ 56°C เป็นเวลา 3 นาที จะถูกนำมาทำ serially diluted 2 เท่า จากความเข้มข้น 1:20 ถึง 1:20,480 โดยผสมกับ serum free media แล้วจึงผสมกับ ไวรัสไข่เลือดออกแต่ละซีโรไทป์ แล้ว Incubated ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะเติม 100 μl ของ 2 % Carboxy Methyl Cellulose (CMC) medium (ผสม 3% FBS) แล้ว Incubated เป็นเวลา 2 – 3 วัน หลังจากนั้นเซลล์จะถูก fixed ด้วย 3.7% formaldehyde และเซลล์จะถูกทำให้ permeabilized ด้วย 0.1 % Triton X-100 และถูก stained ด้วย anti-dengue human antibody และ anti-human-ALEXA488 โดยการทดลองทั้งหมดจะทำ 3 ซ้ำ (Triplicate) โดยผลการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 8A

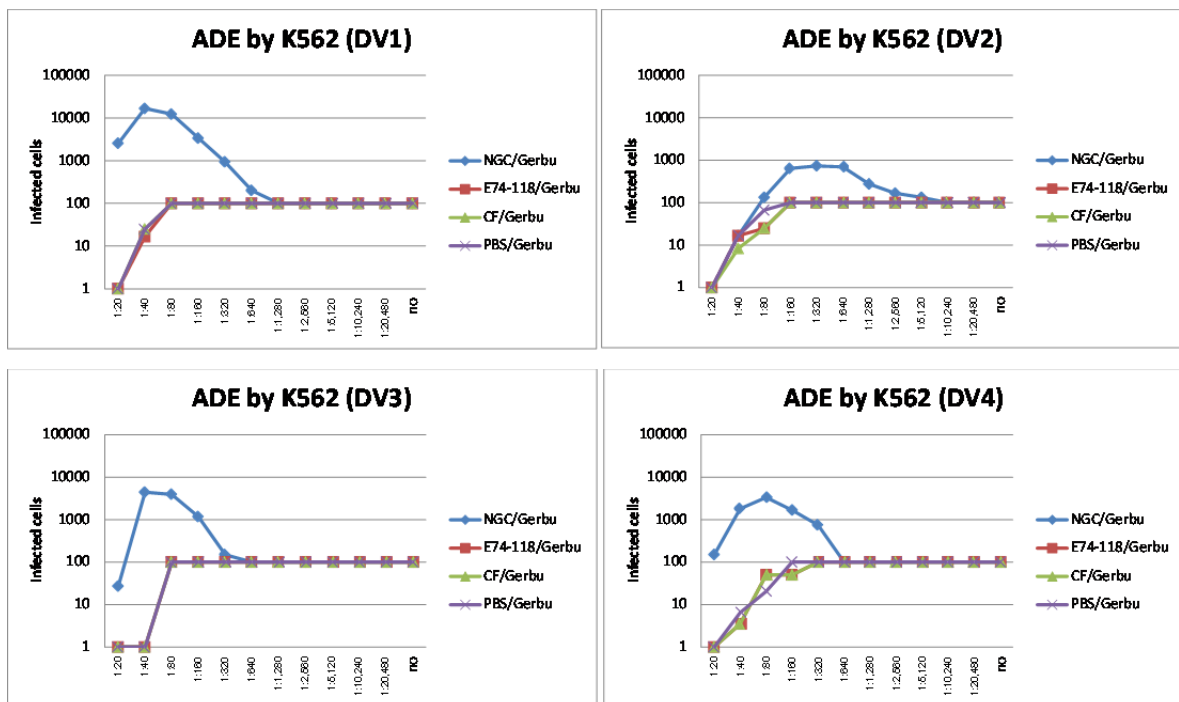
4.1.5 การทำ ADE assay โดยใช้ K562 cell

นำซีรัมหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย antigen ต่างๆ มาทำ serial dilution ที่ความเข้มข้น 2 เท่า จากความเข้มข้น 1:20 ถึง 1:20,480 ใน complete-RPMI medium แล้วจึงผสมกับไวรัสเดงกีแต่ละซีโรไทป์ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม K562 cell ลงไป 1×10^5 cell/well บ่มไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการ fix ด้วย 3.7% formaldehyde และ permeabilize ด้วย 0.1 % Triton X-100 และย้อมด้วย anti-dengue human antibody, anti-human-HRP และ DAB ตามลำดับ โดยการทดลองทั้งหมดจะทำ 3 ซ้ำ (Triplicate) โดยผลการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 8B



ภาพที่ 8A การทำ Focus reduction neutralization test (FRNT) ใน Vero cell

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย rE74-118 มีฤทธิ์สูงกว่ากลุ่ม negative control ที่ถูกกระตุ้นด้วย PBS เล็กน้อย และน้อยกว่ากลุ่ม positive control ที่ถูกกระตุ้นด้วย DENV-2 (NGC)



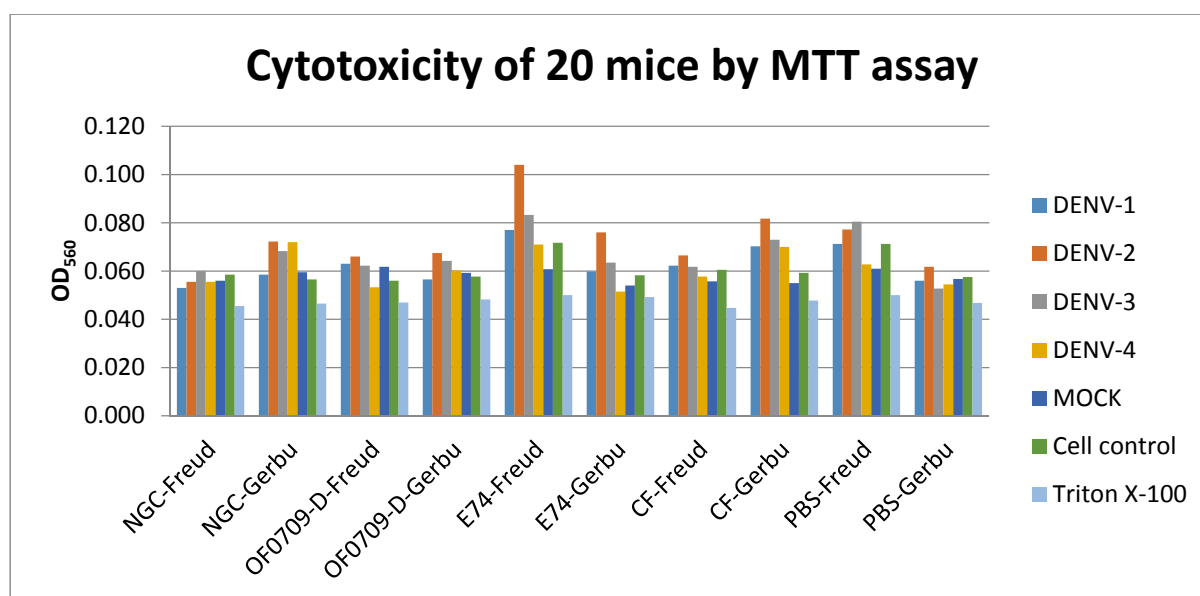
ภาพที่ 8B การทำ ADE assay ใน K562 cell หนูกลุ่มทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วย rE74-118 ไม่กระตุ้นให้เกิดการติดเชื้อไวรัสใน Fc bearing cell เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มทดลองที่กระตุ้นด้วย DENV-2 (NGC)

4.1.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ม้ามหนูทดลองและทำให้ติดเชื้อไวรัส DENV

เซลล์ม้ามจากหนูทดลองทุกตัวจะถูกเตรียมโดยผสมใน 5 ml ของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่มี L-glutamine แล้วบดให้เข้ากันอย่างแผ่วเบาโดยใช้ Forceps แล้วปั่นแยก centrifuge ที่ 500 rpm cell pellet จะถูก Incubated ด้วย red blood cell lysis butter (1 ส่วนของ 0.17 mol/L Tris กับ 9 ส่วนของ 0.16 mol/L ammonium chloride) เป็นเวลา 4 นาที เซลล์จะถูกล้างแล้วเติมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสมกับ 5% fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะ (100ug/ml penicillin และ 100 µg/ml streptomycin) แล้วเซลล์ม้ามจะถูกนำมาเลี้ยงบน 96 well plate ชนิดกันแบน โดยใส่ 1×10^5 cells/well กับอาหารเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงใน Incubator (humidified 5 % CO_2) ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชม หลังจากนั้น เซลล์ม้ามจะถูกนำมาติดเชื้อไวรัส DENV serotypes 1, 2, 3, 4 (ตามลำดับ) โดยมี multiplicity of Infection (MOI) ที่ 0.01 โดยใช้ 20 µl ของ supernatant ของ C6/36 non-Infected cells เป็น mock infected หลังจากให้ติดเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง 100 µl ของ supernatant จะถูกเก็บเพื่อนำมาทดสอบวัดปริมาณ cytokine และ cell culture โดยจะถูกนำมาวัดปริมาณเซลล์ (cytotoxicity analysis) โดยใช้วิธี colorimetric MTT (tetrazolium) assay

4.1.7 การทำ Colorimetric MTT assay

Cytotoxic activity ของ T-cells ที่อยู่ในเซลล์ splenocyte culture จะถูกทดสอบโดยใช้วิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) หลังจาก Infection ด้วยเชื้อไวรัส Dengue แต่ละซีโรไทป์ (ตามลำดับ) เป็นเวลา 3 วัน cell culture จะถูกเติมด้วย MTT dye 10 μ l (5 mg/ml) และเซลล์จะถูก Incubated อีกครั้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น medium จะถูกค่อยๆ เอาออกและมาเติมด้วย 100 μ l ของ DMSO เพื่อทำละลายกับ formazan crystals. เพลทจะถูกเขย่าเป็นเวลา 5 นาทีและจะถูกนำมาวัดค่า absorbance ของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ spectrophotometric microplate reader ที่ 560 nm โดยผลการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 9

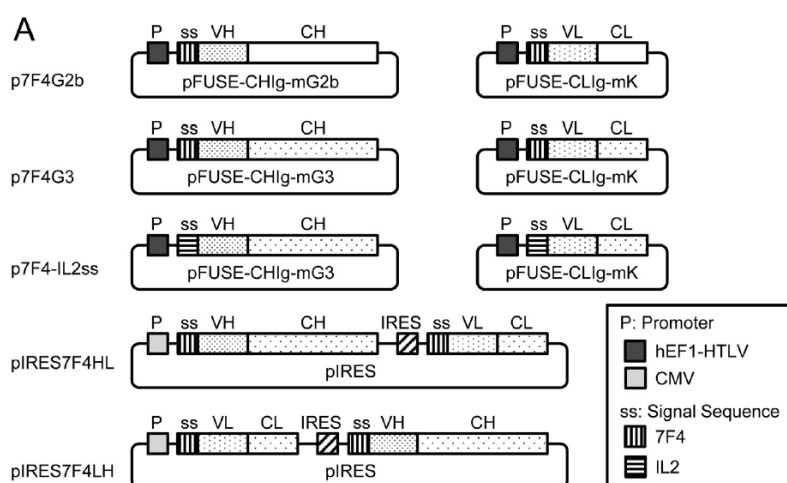


ภาพที่ 9 เซลล์ม้ามจากหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย NGC-GERBU, E74-Freud, และ E74-GERBU ไม่แสดงการลดลงของ cell viability หลังจากให้ติดเชื้อไวรัส DENV แต่ละซีโรไทป์ เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อ และ mock infected cells

4.2 การสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody genes จาก MABs โคลน 7F4 และ ทดสอบการสร้างแอนติบอดีที่ยังเชื่อไวรัสไข้เลือดออก ในหนูทดลองที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmid DNA ที่สร้างได้

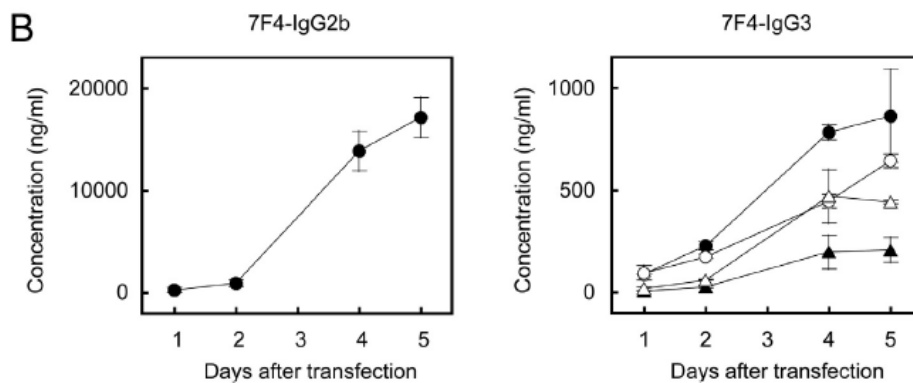
4.2.1 การสร้างแอนติบอดีในหลอดทดลอง

ก่อนที่จะทดสอบการสร้างแอนติบอดีที่ยังเชื่อ DENV ในหนูทดลอง พลาสมิดที่จะถูกทดสอบการผลิตสารแอนติบอดีในหลอดทดลองก่อน (รูปที่ 10A) และ ในรูปที่ 10B แสดงถึงช่วงเวลาของ IgG2b ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 293T ที่ถูกทรานสเฟกด้วย 2 ไมโครกรัมของ p7F4G2b (ประกอบด้วย 1 ไมโครกรัมของพลาสมิดที่มี แอนติบอดียีนส่วน heavy chain และ แอนติบอดี light chain) ถึงแม้ว่าจำนวนของ แอนติบอดี 7F4-IgG2b จะถูกผลิตได้ต่ำใน 1-2 วันแรกหลังจากถูกทรานสเฟก แต่หลังจากนั้น 4-5 วัน สามารถวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีได้ถึง 15,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในทางกลับกัน แอนติบอดี พลาสมิด 7F4-IgG3 วัดได้ 800 ng/ ml หลังจากทรานสเฟกได้ 4-5 วัน หลังจากนั้นได้พยายามเพิ่มการสร้างแอนติบอดีจากพลาสมิด 7F4-IgG3 ด้วยการเปลี่ยน signal peptide (IL2ss; 2 ไมโครกรัม ของ p7F4-IL2ss พลาสมิด) หรือ เวกเตอร์ (pIRES: 2ไมโครกรัม ของ pIRES7F4HL พลาสมิด หรือ pIRES7F4LH) แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นทางผู้วิจัย จึงใช้พลาสมิด p7F4G2b และ p7F4G3 ในการศึกษาในหนูทดลองในขั้นตอนถัดไป



ภาพที่ 10 A การผลิต recombinant antibodies ในหลอดทดลอง (In vitro expression) โดย Plasmids เหล่านี้จะถูก transfect เข้าใน cells 293T โดยแต่ละ Plasmid จะมียีนส่วนของ 7F4 H-หรือ L-chain variable region ใส่เข้าไปใน pFUSE vectors ที่มียีนส่วน constant region ของ H-chain (pFUSE-CHlg-mG3 สำหรับสร้าง IgG2b หรือ IgG3 subclasses ตามลำดับ) หรือ L-chains (pFUSE-CLlg-mK สำหรับ K chain) ที่ได้สร้างไว้แล้ว (Yamanaka et al, 2013) ในการทำ Transfection แต่ละครั้ง จะทำการผสมพลาสมิดต่อไปนี้ ในอัตราส่วนที่เท่าๆกัน; พลาสมิดที่มียีนของ MAb 7F4 ได้แก่ pFUSE-CHlg-mG2b และ pFUSE-CLlg-mK (p7F4G2b) หรือ pFUSE-CHlg-mG3 และ pFUSE-CLlg-mK (p7F4G3) พลาสมิด p7F4-IL2ss สร้างจากการผสมกันของ H- L- chain- expression plasmids ที่มีการเปลี่ยนแปลง original signal sequence ที่เดิมมาจาก 7F4 hybridoma cell ไปเป็น IL2ss ส่วน pIRES-7F4-HL และ pIRES-7F4-LH คือพลาสมิดของเวกเตอร์ pIRES ที่มี 7F4-hybridoma-derived signal sequence, ยีน variable

region และยีน pFUSE-vector-derived constant region, ซึ่งออกแบบมาเพื่อให้ผลิต H และ L chains แบบ bicistronic ซึ่ง P: promoters ที่ได้มาจาก human elongation factor 1 (hEF1-HTLV: สี่เหลี่ยมสีดำ) และ cytomegalovirus (CMV: สี่เหลี่ยมสีเทา) ss: signal sequences ของแอนติบอดี 7F4 (■) และ IL2 (▣) IRES: internal ribosome entry site, VH และ VL: H และ L chain variable region genes, ตามลำดับ ซึ่งมาจาก 7F4 hybridoma. VL และ CL: H และ L chain constant region genes, ตามลำดับ มาจากเวกเตอร์ pFUSE



รูปที่ 10 B ความเข้มข้นของ 7F4-IgG2b (ด้านซ้าย) และ 7F4-IgG3 (ด้านขวา) ใน culture fluids หลังจาก transfect ในเซลล์ 293T โดยได้เป็น ng/ml โดยที่ 7F4-IgG2b ผลิตมาจาก p7F4G2b และ 7F4-IgG3 ผลิตจาก p7F4G3 (จุดดำ), p7F4-IL2ss (จุดขาว), pIRES7F4HL (สามเหลี่ยมสีดำ), หรือ pIRES7F4LH (รูปสามเหลี่ยมสีขาว) แต่ละตัวเลขแสดงให้เห็นถึงค่าเฉลี่ยของค่าที่ได้จากสามหลุม โดยค่า SD แสดงในรูปบาร์ (bar).

4.2.2 การศึกษาระดับปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้ในหนู

การศึกษาระดับปริมาณแอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อไวรัส (neutralizing antibody) ในหนูทดลอง ICR ที่ได้รับการฉีด พลาสมิด p7F4G2b ในกลุ่มของหนูทดลอง 12 ตัวที่ได้ถูกฉีดพลาสมิดที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และหลังจากนั้น 7 วัน ซีรัมจากหนูแต่ละตัวจะถูกวัดระดับ neutralizing antibody ระดับปริมาณของพลาสมิดที่ใช้คือ 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม ซึ่งจะเป็นตัวแทนของจำนวนทั้งหมดของ heavy chain และ light chain พลาสมิด

ค่าเฉลี่ยของระดับ plaque reduction ที่มากกว่า 95% จะถูกพบที่ซีรัมที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 1:2 ในทุกระดับปริมาณของพลาสมิด (รูป 11A) ซึ่งที่ระดับปริมาณของพลาสมิดที่ 50 ไมโครกรัมจะให้ค่า plaque reduction อยู่ที่ 84-100%, ที่ระดับ 100 ไมโครกรัมจะให้ค่าอยู่ที่ 87-100% และที่ ระดับ 200 ไมโครกรัมจะให้ค่าอยู่ที่ 97-100% ในขณะที่ค่า plaque reduction ของซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5 จะให้ค่าที่ระดับปริมาณของพลาสมิดที่ 50, 100 และ 200 นาโนกรัม อยู่ที่ 49-98 % (เฉลี่ย 87%), 85-96 % (เฉลี่ย 88 %) และ 88-99% (เฉลี่ย 94%) ตามลำดับ นอกจากนี้ความเข้มข้นของแอนติบอดี 7F4-IgG2b ที่ฉีดในหนู ICR ถูกทดสอบโดยการเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของระดับ plaque reduction ในซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5 (รูป 11A) กับค่า% โค้งมาตรฐาน plaque reduction ถูกสร้างกับ แอนติบอดี 7F4-IgG2b ที่มี

การเจือจางลดลงทุกๆ 2 เท่า (2-fold dilution) ที่เตรียมจากซีรัมจากหนู naïve ICR ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5 naïve (รูป 11B) ดังที่แสดงในรูป 11C ที่ระดับ 200 นาโนกรัม ของ พลาสมิด p7F4G2b จากซีรัม แอนติบอดี 7F4-IgG2b ให้ความเข้มข้น 410 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรหรือประมาณ 2 เท่าของระดับแอนติบอดีที่ผลิตจากพลาสมิด 100 นาโนกรัม (240 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพลาสมิด p7F4G2b ที่ใช้ฉีดเข้าไปในหนู ICR ถึงแม้ว่าหนูที่ได้รับพลาสมิด p7F4G2b ที่ระดับ 50 ไมโครกรัมยังสามารถผลิตแอนติบอดี 7F4-IgG2b ได้สูงถึง 220 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.3 เสมือนการเร่งผลิตแอนติบอดี (Rapid antibody production)

ข้อดีของภูมิคุ้มกันที่รับมา (passive immunity) คือสามารถให้สารแอนติบอดีมีอยู่ในระบบหมุนเวียนโลหิตอย่างรวดเร็ว ดังนั้นระยะเวลาของการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีจึงถูกทดสอบในหนู ICR และ BALB/c ที่ได้รับการฉีดพลาสมิด p7F4G3 ในกลุ่มหนูทดลองจำนวน 10 ตัว ที่มีช่วงอายุระหว่าง 6 สัปดาห์ จะถูกเจาะเก็บเลือด 3 วัน ก่อนที่จะมีการฉีดพลาสมิด หลังจากที่มีการฉีดพลาสมิด p7F4G3 100 ไมโครกรัม จะมีการเจาะเก็บเลือดในวันที่ 3, 5, 7, และ 9 ซีรัมจากหนูแต่ละตัวจะถูกทดสอบด้วยวิธี neutralization test และ ELISA เพื่อที่จะวัดการสร้างแอนติบอดีที่มีต่อเชื้อ DENV ซีโรไทป์ 1 ยกเว้นในกลุ่มของหนู BALB/c ที่จะรวมซีรัมของหนู (pooled serum) ทั้งหมดเพื่อทดสอบ neutralization test ส่วนวิธีที่ใช้ในการวัดเพื่อหาความสมดุลของการเกิดแอนติบอดี enhancing และ neutralizing จะทำการทดสอบจากซีรัมที่รวมจากหนูทุกตัว (pooled serum)

ในหนู ICR ค่าเฉลี่ย ของระดับ plaque reduction หลังจาก 3 วันที่มีการฉีดพลาสมิด จากซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วน 1:2 อยู่ที่ มากกว่า 70 % รูป 12A ซึ่งระดับ plaque reduction จะเพิ่มขึ้นเป็น 94-98% ในวันที่ 5 ถึง 9 ซึ่งระดับของ plaque reduction ในซีรัมของวันที่ 3 ถึง 9 นั้นเป็นระดับที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ 3 วันก่อนที่จะมีการฉีดพลาสมิดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ถึงแม้ว่าระดับ plaque reduction จากซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5 จะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วน 1:2 ซึ่งค่าเฉลี่ยของระดับ plaque reduction ในวันที่ 5 ถึง 9 มีระดับที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ 3 วันก่อนที่จะมีการฉีดพลาสมิดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ส่วนผลของค่าระดับแอนติบอดีจากการวัดด้วย ELISA รูปที่ 12B ได้สนับสนุนผลการทดลองของช่วงเวลาที่ทำการทดสอบ neutralization ซึ่งผลการทดสอบ neutralization ชี้ให้เห็นว่า ซีรัมที่เจือจางในอัตราส่วน 1:2 จะมีความไวต่อการทดสอบ (sensitive) มากกว่าการใช้ซีรัมเจือจางในอัตราส่วน 1:5 หรือด้วยวิธี ELISA และสามารถทำการตรวจสอบ Neutralizing antibodies ได้ใน 3 วันหลังจากที่มีการฉีดพลาสมิด

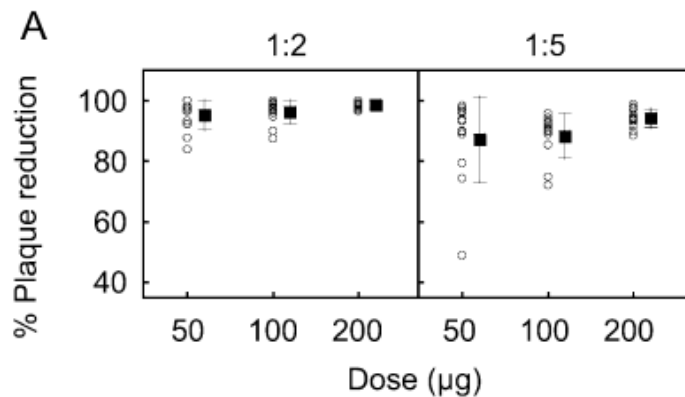
การวัดระดับความสมดุลของการเกิด neutralizing และ enhancing แอนติบอดี ในซีรัมที่มีการฉีดพลาสมิด p7F4G3 ในหนู ICR ว่าจะมีการผลิต Neutralizing antibodies ในหนูที่รักษาคุณสมบัติของแอนติบอดี 7F4-IgG3 หรือไม่ (รูปที่ 12C) pooled serum จากหนูที่ฉีด p7F4G2b จะถูกนำมาใช้อ้างอิง ซีรัมจากหนูที่ฉีด p7F4G2b ที่เจาะเก็บในวันที่ 9 หลังจากที่มีการฉีดพลาสมิดจะทำให้เซลล์เกิดการติดเชื้อมากกว่าซีรัมควบคุมที่ไม่มีการฉีดพลาสมิด และแสดงให้เห็นถึงการเกิด enhancing ในซีรัมที่มีการเจือจางในอัตราส่วน 1:5 และ 1:10 ในระบบที่ไม่มีสาร complement ให้ค่าสูงเป็น 0.87 เท่า สูงกว่าค่า cut-off ที่ 0.31 ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างการเกิดหรือไม่เกิด enhancing ของการทดสอบครั้งนี้ กราฟการตอบสนอง

ต่อระดับของแอนติบอดีที่ได้มาจากซีรัมหนูที่ถูกฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G2b มีความสอดคล้องกับแอนติบอดี 7F4-IgG2b จากการสร้างในหลอดทดลองที่มาจากทรานสเฟกพลาสมิด p7F4G2b ในเซลล์เลี้ยง อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์จะมีการติดเชื้อที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมในกลุ่มควบคุม (serum free control) ที่แสดงถึงการเกิด neutralizing ซึ่งพบว่าทุกระดับการเจือจางของแอนติบอดีให้ผลที่เหมือนกัน (1:5, 1:10) ในระบบที่มีการใส่สาร complement ระดับของแอนติบอดีที่ทำให้เกิด enhancing/neutralizing มีความสอดคล้องกับผลการทดลองของการศึกษาซีรัมหนูก่อนหน้านี้ ในทางตรงกันข้าม อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture fluid) ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ 297T ที่มีการทรานสเฟกของ p7F4G3 และซีรัมจากหนู ICR ที่ถูกฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G3 ไม่แสดงถึงการเกิด enhancing ทั้งในระบบที่ใส่และไม่ใส่สาร complement ของทุกระดับของการเจือจางแอนติบอดีของการศึกษานี้ ในระบบที่ไม่มีการใส่สาร complement การเกิด enhancement จะอยู่ที่ 0.09 เท่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture fluid) และ 0.01 ในซีรัมหนู ซึ่งจะต่ำกว่าค่า cut-off ของการเกิด enhancing ของการศึกษาในครั้งนี้ที่ 0.31 จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า แอนติบอดี 7F4-IgG3 ที่ได้จากหนูทดลองสามารถรักษาคุณสมบัติที่ปราศจากการเกิด enhancement ได้เหมือนกับแอนติบอดีที่ผลิตได้ในหลอดทดลอง

ในหนู BALB/c รูป 13A และ B ช่วงเวลาของการเกิด neutralizing และการวัดระดับของแอนติบอดีด้วย ELISA ให้ผลที่คล้ายคลึงกับผลที่ได้จากหนู ICR กล่าวคือระดับของแอนติบอดีที่วัดด้วย ELISA จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในซีรัมที่เก็บก่อน 3 วัน ที่จะมีการฉีดพลาสมิด และหลัง 3 วันหลังจากที่มีการฉีด ($p < 0.001$: รูปที่ 13B) ความเข้มข้นของแอนติบอดี 7F4-IgG3 ในซีรัมจากหนู BALB/c ที่มีการฉีด พลาสมิด p7F4G3 ได้ถูกประเมินกับเปอร์เซ็นต์โค้งมาตรฐานของ plaque reduction ที่สร้างด้วย ทุกระดับการเจือจางลดลงของแอนติบอดี 7F4-IgG ทุกๆ 2 เท่า (serial 2 fold dilution) ที่ถูกทำการเจือจางใน ซีรัมหนูที่ทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:5 ของหนู naïve BALB/c ซึ่งจะพบความเข้มข้นของแอนติบอดี 7F4-IgG3 ที่ 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 และ ที่ 229-252 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 5-9 รูปที่ 13D แอนติบอดีที่ถูกสร้างจากหนู BALB/c ที่ฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G3 จะไม่มีการเกิด enhancing ซึ่งจะพบได้จากการทดสอบระดับของ enhancement ที่ต่ำกว่าค่า cut-off ที่ใช้การศึกษาในครั้งนี้ (รูปที่ 13E) ผลการทดลองทั้งหมดในหนู BALB/c เหล่านี้จะสนับสนุนผลการทดลองจากหนู ICR นั่นคือ สามารถสร้างแอนติบอดีได้อย่างรวดเร็วและเป็นแอนติบอดีที่ปราศจากการเกิด enhancing ที่สร้างมาจากการฉีดพลาสมิด p7F4G3

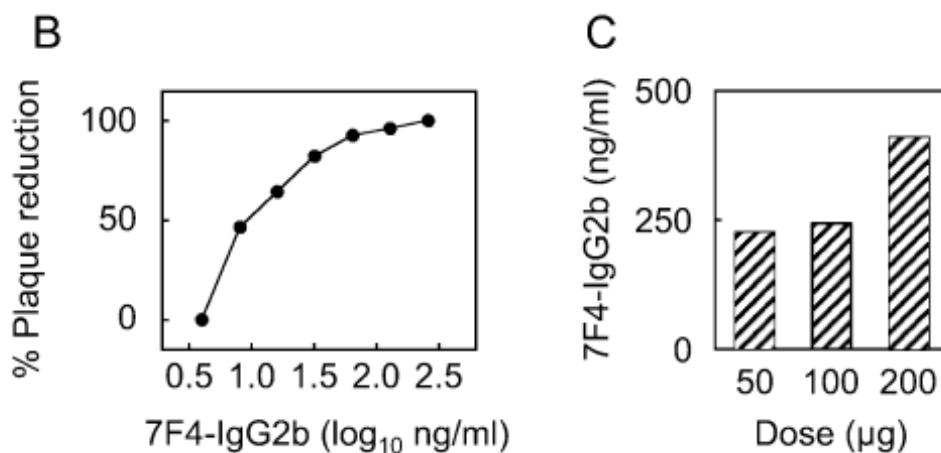
4.2.4 ช่วงระยะเวลาของแอนติบอดี (Duration of Antibody)

หนู BALB/c จำนวน 10 ตัวที่ถูกใช้ในการทดลอง ตามรูปที่ 13 ถูกทดสอบการรักษาระดับการสร้าง Neutralizing antibodies ในซีรัมได้ยาวนานกว่า 3 เดือน ซีรัมที่จะใช้ในการทดสอบจะต้องทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:2 ตามตารางที่ 1 จากผลการทดสอบพบว่าถึงแม้ระดับของการเกิด plaque reduction จะลดลงตามระยะเวลา แต่ก็ยังอยู่ในระดับที่สูง ($>90\%$) เป็นเวลากว่า 3 เดือนที่มีการทดสอบ ซึ่งไม่มีความแตกต่างของการลดอย่างมีนัยสำคัญจากระดับการเกิด plaque reduction ในวันที่ 17 ($P > 0.05$) ซึ่ง Neutralizing antibodies นี้ยังคงรักษาคุณสมบัติที่ปราศจากการเกิด enhancing ที่มีค่าต่ำกว่าค่า cut-off ที่ ≤ 0.15 เป็นเวลากว่า 3 เดือน จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า Neutralizing antibodies ที่ปราศจากการเกิด enhancing จากหนูที่ได้รับการฉีดพลาสมิด p7F4G3 คงอยู่ได้ยาวนาน



ภาพที่ 11 ระดับปริมาณ Dose-dependent ของการสร้าง Neutralizing antibody ในหนูทดลอง ICR ที่ถูกฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G2b โดยในหนึ่งกลุ่มใช้หนู 12 ตัว และได้รับปริมาณของ p7F4G2b ที่ 50, 100 หรือ 200 ไมโครกรัม จากนั้นเก็บซีรัมของหนูในวันที่ 7 และนำมาทดสอบ neutralization test กับไวรัส DENV serotype 1 สายพันธุ์ Mochizuki

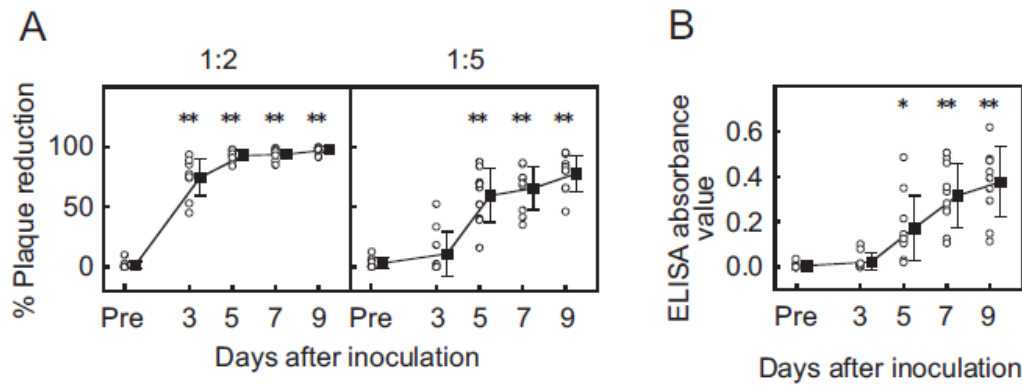
ภาพที่ 11 (A) ระดับการลดลงของจำนวน plaque (Plaque reduction levels) โดยการใช้การเจือจางซีรัม 1:2 (ด้านซ้าย) หรือ 1:5 (ด้านขวา) ข้อมูลของซีรัมหนูแต่ละตัวจาก 12 ตัวนั้นนำมา plot (วงกลม) พร้อมทั้งค่าเฉลี่ย (สีเหลี่ยม) และแทนค่า SD ด้วยบาร์ (bars)



ภาพที่ 11 B การทดสอบ Rapid antibody production ในหนูทดลอง

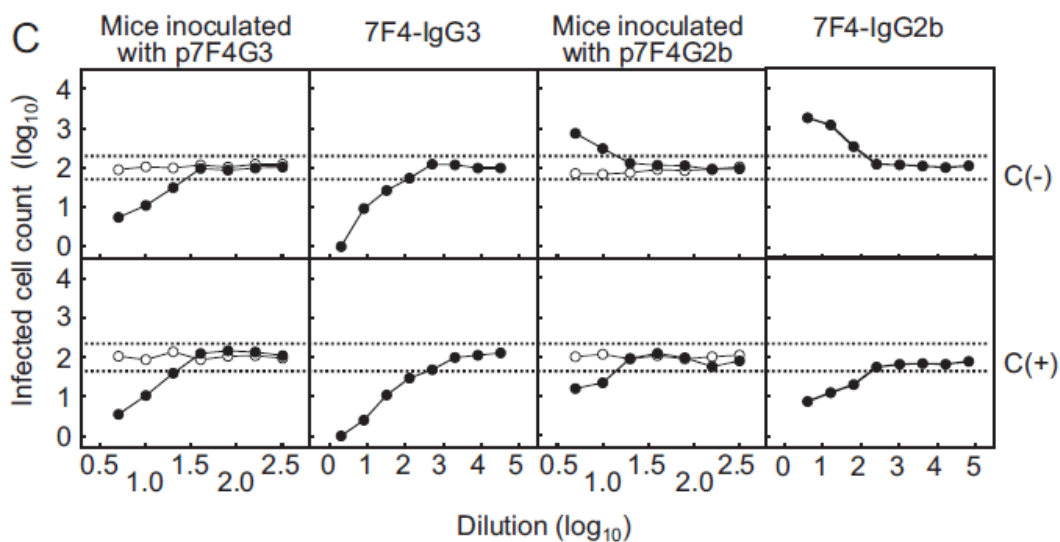
กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของเปอร์เซ็นต์การลดลงของ plaque ที่ใช้ 7F4-IgG2b ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ของ 7F4-IgG2b จาก p7F4G2b ที่ transfect ในเซลล์ 293T นั้นคือนำเจือจาง 2 เท่าใน ซีรัมหนู ICR naïve (1:5 dilution) และทดสอบใน neutralization test

ภาพที่ 11 C ความเข้มข้นของ 7F4-IgG2b คำนวณได้จากซีรัมหนูที่ฉีด p7F4G2b โดยขึ้นอยู่กับค่าเฉลี่ยของการลดลงของ plaque แสดงด้วยซีรัมที่เจือจาง 1:5 (A, ด้านขวา) และกราฟมาตรฐานที่สร้างด้วย 7F4-IgG2b (B) และแสดงความเข้มข้นเป็น ng/ml



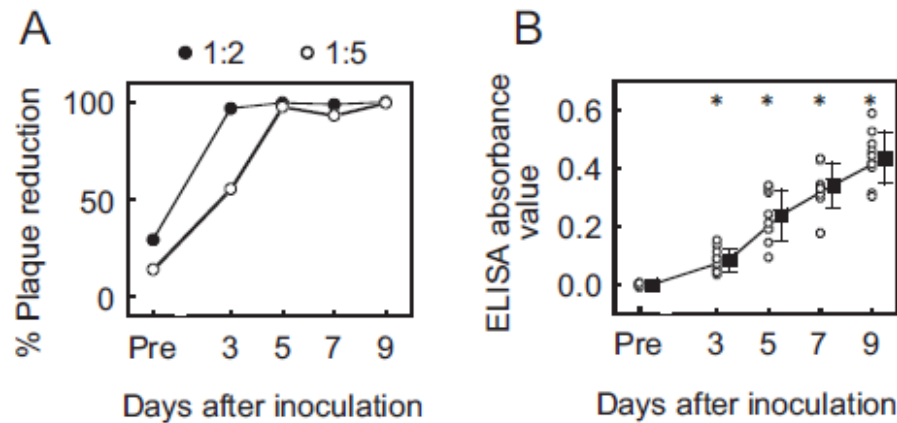
ภาพที่ 12 ช่วงระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของระดับ Neutralizing antibody ในหนู ICR ที่ถูกฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G3 โดยหนู 10 ตัวได้รับการฉีด p7F4G3 100 ไมโครกรัม จากนั้นเก็บซีรัมหนู 3 วันก่อนฉีด (Pre) และวันที่ 3, 5, 7, และ 9 หลังฉีด แล้วนำมาทดสอบด้วย neutralization test ร่วมกับไวรัสแดงกีชนิดที่ 1 สายพันธุ์ Mochizuki และทดสอบ ELISA

ภาพที่ 12 (A) ระดับการลดลงของ plaque ทดสอบโดยนำซีรัมมาเจือจาง 1:2 (ด้านซ้าย) หรือ 1:5 (ด้านขวา) ภาพที่ 12 (B) ศึกษาระดับแอนติบอดีด้วย ELISA โดย รูป A และ B เป็นข้อมูลซีรัมหนูแต่ละตัวนำมา plot (วงกลม) พร้อมค่าเฉลี่ย (สี่เหลี่ยม) และแทนค่า SD ด้วยบาร์ (bars) ส่วนดอกจัน (*,**) แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยของการลดลงของ plaque ที่ใช้ซีรัมที่เก็บก่อนฉีด 3 วัน: *P < 0.01, **P < 0.001



ภาพที่ 12 C ความสมดุลระหว่างการยับยั้งและการส่งเสริมฤทธิ์ในซีรัมหนูที่ได้รับการฉีด p7F4G3 (ด้านซ้าย) และ 7F4-IgG3 ที่ได้จากการ tranfect พลาสมิด p7F4G3 ในเซลล์ 293T (panel ที่ 2 จากซ้าย) และจากการอ้างอิงแสดงในกราฟของการตอบสนองต่อปริมาณแอนติบอดีสร้างด้วยข้อมูลจากซีรัมหนู ICR ที่ฉีด p7F4G2b (panel ที่ 2 จากขวา) และ 7F4-IgG2b (ด้านขวา) การทดลองจะทำการไม่มีการมีอยู่ (panel ด้านบน) หรือการมีอยู่ (panel ด้านล่าง) ของ complement ซึ่งรวมซีรัมหนูทั้ง 10 ตัวที่เก็บก่อนฉีด 3 วัน (จุดขาว) หรือวันที่ 9

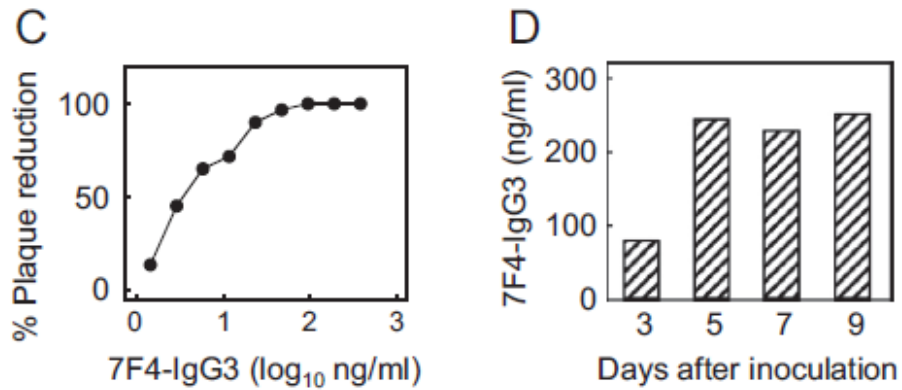
หลังจากฉีด (จุดดำ) ก่อนใช้ในการทดลอง โดย culture fluid จากเซลล์ 293T ประกอบไปด้วย 10^4 ng/ml 7F4-IgG3 หรือ 7F4-IgG2b ส่วนของ Dot lines แสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ของจำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อ $\pm$ 2SD, คำนวณจาก negative control 8 ตัวอย่าง



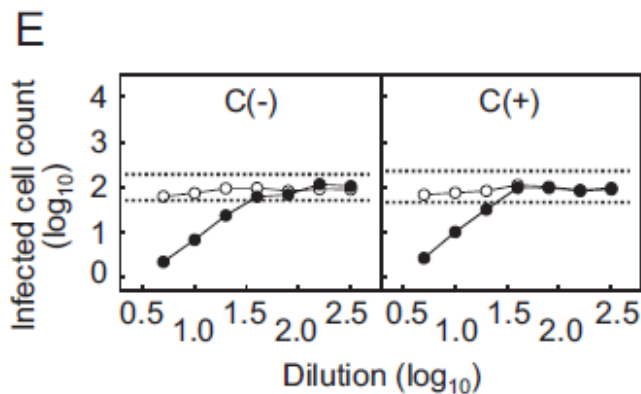
ภาพที่ 13 ระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของระดับ Neutralizing antibody ในหนู BALB/c ที่ถูกฉีดด้วยพลาสมิด p7F4G3 ใน 1 กลุ่มมีหนูทั้งหมด 10 ตัว ฉีดด้วย p7F4G3 ปริมาณ 100 ไมโครกรัม โดยเก็บซีรัมหนู 3 วัน ก่อนฉีด (Pre) และวันที่ 3, 5, 7, และ 9 หลังฉีด จากนั้นนำมาทดสอบด้วย neutralization test ร่วมกับ ไวรัสแดงที่ชนิดที่ 1 สายพันธุ์ Mochizuki พร้อมทั้งทดสอบ ELISA และ neutralizing/enhancing antibody balance assay

ภาพที่ 13 (A) ระดับการลดลงของ plaque ทดสอบโดยนำซีรัมมาเจือจาง 1:2 (จุดดำ) หรือ 1:5 (จุดขาว) โดยรวมซีรัมของหนูทั้ง 10 ตัวก่อนนำมาใช้

ภาพที่ 13 (B) ศึกษาระดับแอนติบอดีด้วย ELISA, plot กราฟ (จุดขาว) ด้วยข้อมูลซีรัมของหนูแต่ละตัว พร้อมด้วยพร้อมค่าเฉลี่ย (สี่เหลี่ยม) และแทนค่า SD ด้วยบาร์ (bars) ส่วนดอกจัน (*) แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยของการลดลงของ plaque ที่ใช้ซีรัมที่เก็บก่อนฉีด 3 วัน ($P < 0.001$)



ภาพที่ 13 (C) กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของเปอร์เซ็นต์การลดลงของ plaque ที่ใช้ 7F4-IgG3 โดย ปริมาตรของ 7F4-IgG3 ที่ได้จากการ transfect ตัว p7F4G3 ในเซลล์ 293T นำมาเจือจาง 2 เท่า (serial dilution, 2-fold) ใน 1:5 dilution ของซีรัมหนู BALB/c naïve แล้วนำไปใช้ใน neutralization test ภาพที่ 13 (D) ความเข้มข้นของ 7F4-IgG3 คำนวณในซีรัมหนูที่ฉีด p7F4G3 โดยใช้ค่าเฉลี่ยของการลดลงของ plaque ที่แสดงด้วยซีรัมที่เจือจาง 1:5 มาคำนวณ (A) และกราฟมาตรฐานที่สร้างด้วย 7F4-IgG3 (C) และ แสดงความเข้มข้นเป็น ng/ml



ภาพที่ 13 (E) ความสมดุลระหว่างการยับยั้งและการส่งเสริมฤทธิ์ในซีรัมหนู BALB/c ที่ได้รับการฉีด p7F4G3 การทดลองใช้ร่วมกับการไม่มี (panel ซ้าย) หรือการมีอยู่ (panel ขวา) ของ complement ซึ่งซีรัมหนูที่เก็บ ก่อนฉีด 3 วัน (จุดขาว) หรือวันที่ 9 หลังจากฉีด (จุดดำ) นำมารวมกันในหนูแต่ละตัวเพื่อใช้ในการทดลอง ซึ่ง Dot lines แสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ของจำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อ $\pm$ 2SD, คำนวณจาก negative control 8 ตัวอย่าง

จำนวนวัน หลังฉีด Plasmid ใน หนูทดลอง	Plaque reduction level ^b	Fold enhancement ^c	จำนวนวัน หลังฉีด หนู ทดลอง	Plaque reduction level ^b	Fold enhancement
17	98.2%	0.04	60	97.8%	0.13
30	97.0%	0.12	75	95.6%	0.08
48	93.2%	0.15	90	93.7%	0.13

ตารางที่ 2 แสดงระยะเวลาจำนวนวันของแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งไวรัส (Neutralizing) โดยปราศจากการส่งเสริมการติดเชื้อ (Enhancing) จากซีรัมหนู BALB/c หลังจากการฉีด 1 ครั้งด้วย p7F4G3^a

^a เก็บเลือดหนูทั้ง 10 ตัวใช้ในการทดลองที่แสดงในรูปที่ 13 ทุกๆ 15 วัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน

^b ในการทดสอบ neutralizing antibodies จะทำการเจือจาง pool sera ในอัตราส่วน 1:2

^c คำนวณการเพิ่มขึ้นของ infected cell เทียบกับระดับควบคุม โดยการเจือจางซีรัมพร้อมด้วยการส่งเสริมฤทธิ์สูงสุด, ที่ได้รับในการทดสอบโดยไม่เติม complement และแสดงในรูปของ log₁₀ โดยค่า cut off ในการทดลองครั้งนี้ ที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของ enhancing และ neutralizing คือ 0.31

5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

5.1 การพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine โดยใช้ข้อมูล Epitope จาก human MAbs (ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 serotypes)

จากผลการศึกษาเอพิโทปของ NhuMAbs ที่ยับยั้งเชื้อไวรัสได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ผลิตขึ้นได้ทั้ง 3 โคลน พบว่ามี immunodominant epitope อยู่ที่ domain II ของ envelope protein (EDII) โดยมี minimum binding site อยู่ที่ E74-118 คณะผู้วิจัยจึงทำการสร้าง recombinant protein (rE74-118) และสังเคราะห์ peptide (OF0709-D) เพื่อฉีดเข้าไปในหนู BALB/c และศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่า rE74-118 สามารถกระตุ้นการหลังแอนติบอดีได้ดี แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ไม่ด้นัก แต่ที่น่าสนใจคือไม่กระตุ้นให้เกิด ADE ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่า antigen ที่มีขนาดเล็ก อาจกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่ด้นัก แต่จะลดการเกิด enhancing activity เมื่อเทียบกับการใช้ full E immunogen หากมีการพัฒนา antigen ชนิดนี้ให้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสให้ดีขึ้น เช่น การเพิ่ม essential neutralizing epitope บริเวณอื่น หรือ T cell epitope ก็อาจจะทำให้ได้ neutralizing activity ที่ดีขึ้น โดยจะต้องไม่เพิ่ม enhancing activity ในขณะที่ OF0709-D peptide กระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำได้ไม่ด้นัก น่าจะเป็นเพราะขนาดของ antigen ที่สั้นไป ทำให้ถูกกำจัดได้ง่าย จำเป็นต้องหาสารเสริมฤทธิ์ตัวอื่นในการฉีดทดลองครั้งต่อไป ซึ่งในครั้งนี้ได้ทำการทดสอบสารเสริมฤทธิ์ 2 ชนิด คือ GERBU และ FCA/FIA พบว่าสามารถกระตุ้นการหลังแอนติบอดีได้ใกล้เคียงกัน แต่ GERBU เมื่อผสมกับ control DENV-2 (NGC) สามารถกระตุ้นการหลังแอนติบอดีได้ดีกว่าผสมกับ FCA/FIA โดยพบว่ามากกว่าถึงเกือบ 3 เท่า ซึ่งงานวิจัยนี้น่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนา ideal vaccine และระบบนำส่งวัคซีนต่อไปได้

5.2 การสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody gene จาก MABs โคลน 7F4 และ ทดสอบการสร้างแอนติบอดียับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออก ในหนูทดลองที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmid DNA ที่สร้างได้

ถึงแม้ว่าการใช้วัคซีนจะสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้ในคนและสัตว์ ก็ยังมีการพัฒนาการสร้างและใช้ passive แอนติบอดีในการรักษาโรค ซึ่ง passive แอนติบอดีนี้จะมีระยะการคงตัวอยู่ในร่างกายคนและสัตว์สั้นกว่าแอนติบอดีที่ได้จากการใช้วิธี active Immunization แต่แอนติบอดีที่ได้จากวิธี passive นี้ มีข้อได้เปรียบคือ สามารถออกแบบให้อยู่ในรูปแบบที่ต้องการได้ง่ายกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการพัฒนาวัคซีนต่อไวรัส Dengue ที่ยังคงมีปัญหาของ enhancing แอนติบอดีที่อาจก่อให้เกิด Antibody Dependent Enhancement (ADE) ได้ ซึ่งการใช้เทคโนโลยีใหม่ๆ ทางวิศวกรรมแอนติบอดีที่สามารถสร้าง Fc - modified antibodies ที่ไม่จับกับเซลล์ที่มี Fc γ receptor แต่ยังคงสามารถยับยั้ง (neutralize) ไวรัสได้ดี

ในการวิจัยครั้งนี้ เราเลือก mouse MAb โคลน 7F4 ที่ไม่ก่อให้เกิด enhancing activity เพราะเป็นแอนติบอดีชนิด IgG3 มีการพัฒนาวัคซีนที่สามารถลดการเกิด enhancing antibodies (Crill et al, 2012; Hughes et al, 2012) โดยไปจัดการกับ cross-reactive immunodominant epitopes ที่ fusion peptide และ domain III ของ E protein ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิด Enhancing antibodies โดยจะลดการเกิดปฏิกิริยา enhancing โดยไม่เปลี่ยนแปลงความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัส (ในสัตว์ทดลอง) ดังนั้นการวิเคราะห์ epitope จึงมีความสำคัญมากสำหรับการออกแบบวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก ซึ่งถึงแม้ว่าจะสามารถลดปฏิกิริยา enhancing ได้ส่วนหนึ่ง แต่ก็ยังคงไม่สามารถกำจัดได้ทั้งหมด ปัจจุบันมีวิธีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ วิธีการ express แอนติบอดีในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian cell) ที่สามารถสร้างแอนติบอดียับยั้งไวรัส Dengue ได้ในสัตว์ทดลอง โดยไม่ก่อให้เกิด enhancing activity เลย

มีรายงานการวิจัยการใช้ adeno virus vector ในการ express แอนติบอดีในสัตว์ทดลอง เพื่อป้องกันโรค (Lewis et al, 2002; Fang et al, 2007; Zuber et al, 2008; Johnson et al, 2009; Balazs et al, 2011; Shimada et al, 2013; Adam et al, 2014) ซึ่งมีการเริ่มใช้วิธีนี้ครั้งแรกกับหนูทดลองโดย express แอนติบอดีเพื่อยับยั้ง human immunodeficiency virus type 1 แต่ไม่ได้มีการรายงานถึงการคงอยู่ของแอนติบอดีในระยะยาว (Muthumani et al, 2013) ในการวิจัยครั้งนี้ เราพบว่าหนูทดลองที่ได้รับการฉีดด้วย Antibody expressing plasmid สามารถสร้างแอนติบอดีที่ยับยั้งไวรัส Dengue-1 (มากกว่า 90% plaque reduction โดย dilute ซีรัมจากหนูในอัตราส่วน 1:2) โดยสามารถตรวจพบแอนติบอดีดังกล่าวจากหนูได้นานถึง 3 เดือน มีรายงานวิจัยจำนวนมาก ที่ประเมินความปลอดภัยของ DNA วัคซีน ทั้งทาง preclinical และ clinical ทั้ง ๆ ที่ ยังมีความกังวลเกี่ยวกับการรวมตัวระหว่าง DNA vaccine กับ cellular DNA แล้วจะพัฒนาไปสู่การเกิดโรคความผิดปกติของระบบ autoimmune (Li et al, 2012) ซึ่ง DNA vaccine มีข้อได้เปรียบคือ การคงตัวที่ทนทานยาวนานของ DNA ในการ express แอนติเจนและแอนติบอดี (Wolff and Budker, 2005) โดยมีงานวิจัยที่รายงานว่า การใช้ DNA vaccine สามารถ express แอนติบอดีในสัตว์ทดลองได้นานถึง 7 เดือน (Tjelle et al, 2004) ข้อจำกัดของการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือ ต้องใช้ DNA plasmid ที่มีความเข้มข้นสูงในการฉีดเข้าหนูทดลอง เพื่อที่จะ express ให้ได้แอนติบอดียับยั้งไวรัสไข้เลือดออกที่มีปริมาณมากพอ ซึ่งต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพวิธีการในการนำ plasmid เข้าสู่ร่างกายหนูทดลอง และเพิ่มปริมาณการ express แอนติบอดีในหนูทดลองจึงจะสามารถลดปริมาณการใช้ plasmid DNA

ได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การ express แอนติบอดีในหลอดทดลองไม่ได้เพิ่มขึ้น แม้จะใช้การเพิ่มโดยวิธีต่างๆ เช่น IL2ss5 signal sequences หรือจากการใช้ vector PIRE5 (รูปที่ 1) โดยใช้ plasmid p7F4-IL2ss, PIRE57F4HL, หรือ PIRE57F4LH ก็ไม่ได้ผลดีขึ้น (ไม่มีการแสดงผลการทดลอง) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อปรับปรุงการเพิ่มการ express แอนติบอดี รวมทั้งเพิ่มการได้รับ plasmid เข้าสู่เซลล์โดยการทำ codon optimization และเพิ่มการคงอยู่ของแอนติบอดีในกระแสเลือด (antibody half-life) ดังที่เคยมีการรายงานไว้ (Kubota et al, 2009; Vincent and Zurini 2012; Muthumani et al, 2013) และจากการที่ แอนติบอดีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ (โคลน 7F4) จับเฉพาะและยับยั้งกับไวรัส DENV-1 ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อใช้ plasmid จาก แอนติบอดีมนุษย์ที่สามารถยับยั้งไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นประโยชน์มากที่สุดเพื่อที่จะพัฒนา DNA วัคซีนที่ express แอนติบอดีที่ยับยั้งไวรัสไข้เลือดออกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในมนุษย์

โดยสรุป การวิจัยครั้งนี้ได้รายงานการใช้ plasmid DNA ที่สามารถ express แอนติบอดีที่ยับยั้งไวรัสไข้เลือดออก DENV-1 ในหนูทดลอง โดยแอนติบอดีสามารถคงอยู่ในกระแสเลือดสัตว์ทดลองได้นานถึง 3 เดือน หลังจากฉีด plasmid DNA ให้หนูทดลอง เพียงครั้งเดียว โดยไม่เกิดปฏิกิริยา Enhancement ในหนูทดลองเลย ในทางทฤษฎีแล้ว plasmid DNA ไม่น่าจะก่อให้เกิดความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองและการเพิ่มการติดเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นปัญหาที่เคยเกิดขึ้นกับการใช้วัคซีนที่รวมเชื้อหลายสายพันธุ์ (combined vaccines) ดังที่เคยมีรายงานจากผลการทดสอบ dengue tetravalent vaccine (Coller et al, 2011; Wilder-Smith et al, 2014) ถึงแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้จะไม่ได้มีการทดสอบการป้องกันเชื้อไวรัสไข้เลือดออกสายพันธุ์ 1 ในหนูทดลอง โดยการ challenge หนูทดลองด้วยเชื้อไวรัส แต่การที่แอนติบอดีที่สามารถยับยั้งไวรัสไข้เลือดออก สามารถ express ในหนูทดลองที่ได้รับการฉีด plasmid DNA เข้าไปได้ก็น่าจะเป็นงานวิจัยที่ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนา DNA วัคซีนที่จะสร้างแอนติบอดียับยั้งเชื้อไวรัส Denv ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ต่อไปในอนาคต

6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 การพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก ชนิด Peptide Epitope based vaccine โดยใช้ข้อมูล Epitope จาก human MAbs (ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 serotypes)

จากผลการศึกษาเอพิโทปของ NhuMAbs ที่ยับยั้งเชื้อไวรัสได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ผลิตขึ้นได้ทั้ง 3 โคลน พบว่ามี immunodominant epitope อยู่ที่ domain II ของ envelope protein (EDII) โดยมี minimum binding site อยู่ที่ E74-118 คณะผู้วิจัยจึงทำการสร้าง recombinant protein (rE74-118) และสังเคราะห์ peptide (OF0709-D) เพื่อฉีดเข้าไปในหนู BALB/c และศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่า rE74-118 สามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดี แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ไม่ด้นัก แต่ที่น่าสนใจคือไม่กระตุ้นให้เกิด ADE ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่า antigen ที่มีขนาดเล็ก อาจกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่ด้นัก แต่จะลดการเกิด enhancing activity เมื่อเทียบกับการใช้ full E immunogen หากมีการพัฒนา antigen ชนิดนี้ให้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสให้ดีขึ้น เช่น การเพิ่ม essential neutralizing epitope บริเวณอื่น หรือ T cell epitope ก็อาจจะทำให้ได้ neutralizing activity ที่ดีขึ้น โดยจะต้องไม่เพิ่ม enhancing activity ในขณะที่ OF0709-D peptide กระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำได้ไม่ด้นัก น่าจะเป็นเพราะขนาดของ antigen ที่สั้นไป ทำให้ถูกกำจัดได้ง่าย จำเป็นต้องหาสารเสริมฤทธิ์ตัวอื่นในการฉีดทดลองครั้งต่อไป ซึ่งในครั้งนี้ได้ทำการทดสอบสารเสริมฤทธิ์ 2 ชนิด คือ GERBU และ FCA/FIA พบว่าสามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ใกล้เคียงกัน แต่ GERBU เมื่อผสมกับ control DENV-2 (NGC) สามารถกระตุ้นการหลั่งแอนติบอดีได้ดีกว่าผสมกับ FCA/FIA โดยพบว่ามีมากกว่าถึงเกือบ 3 เท่า ซึ่งงานวิจัยนี้น่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนา ideal vaccine และระบบนำส่งวัคซีนต่อไปได้

ข้อเสนอแนะงานที่ควรจะทำต่อไปสำหรับการพัฒนา peptide vaccine

- 6.1.1 การวัดปริมาณ cytokine; ซีรัมของหนูทดลอง และ culture supernatants ของเซลล์ม้ามหนูทดลอง จะถูกนำมาวัดระดับของ IFN- γ TNF- α , IL-5, และ IL-10 โดยเซลล์ม้ามหนูทดลองจะถูกนำมาสกัด RNA โดยใช้ Trizol และสร้าง cDNA จาก RNA แล้วจึงเพิ่มปริมาณ gene expression ของ T cell cytokine โดยวิธี PCR
- 6.1.2 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองด้วย peptide peptide ควรจะถูกนำไป conjugated กับ hapten โดย OF0709-D peptide จะถูกนำไป conjugated กับ mCKLH carrier protein แล้วจึงนำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง BALB/c mice.
- 6.1.3 หลังจากได้ Immunogen ที่สามารถสร้าง Neutrallizing antibody ได้ จะนำ Immunogen นั้นมาทดสอบ protective efficacy ในหนูทดลอง IFN $\alpha\beta\gamma$ gene Knockout mice ที่พัฒนาไว้ในห้องปฏิบัติการของ Dr. Takeshi Kurosu ต่อไป

6.2 การสร้าง Plasmid DNA โดยใช้ข้อมูล antibody gene จาก MAbs โคลน 7F4 และ ทดสอบการสร้างแอนติบอดียับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออก ในหนูทดลองที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย Plasmid DNA ที่สร้างได้

การวิจัยครั้งนี้ได้รายงานการใช้ plasmid DNA ที่สามารถ express แอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออก DENV-1 ในหนูทดลอง โดยแอนติบอดีสามารถคงอยู่ในกระแสเลือดสัตว์ทดลองได้นานถึง 3 เดือน หลังจากฉีด plasmid DNA ให้หนูทดลอง เพียงครั้งเดียว โดยไม่เกิดปฏิกิริยา Enhancement ในหนู

ทดลองเลย ในทางทฤษฎีแล้ว plasmid DNA ไม่น่าจะก่อให้เกิดความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองและการเพิ่มการติดเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นปัญหาที่เคยเกิดขึ้นกับการใช้วัคซีนที่รวมเชื้อหลายสายพันธุ์ (combined vaccines) ดังที่เคยมีรายงานจากผลการทดสอบ dengue tetravalent vaccine (Coller et al, 2011; Wilder-Smith et al, 2014) ถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะไม่ได้มีการทดสอบการป้องกันเชื้อไวรัสใช้เลือดออกserotype 1 ในหนูทดลอง โดยการ challenge หนูทดลองด้วยเชื้อไวรัส แต่การที่แอนติบอดีที่สามารถยับยั้งไวรัสใช้เลือดออก สามารถ express ในหนูทดลองที่ได้รับการฉีด plasmid DNA เข้าไปได้ก็น่าจะเป็นงานวิจัยที่ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนา DNA วัคซีนที่จะสร้างแอนติบอดียับยั้งเชื้อไวรัส Denv ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะงานที่ควรจะทำต่อไปสำหรับการพัฒนา Antibody expressed plasmid vaccine

ควรมีการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อปรับปรุงการเพิ่มการ express แอนติบอดี รวมทั้งเพิ่มการได้รับ plasmid เข้าสู่เซลล์โดยการทำให้ codon optimization และเพิ่มการคงอยู่ของแอนติบอดีในกระแสเลือด (antibody half-life) ดังที่เคยมีการรายงานไว้ (Kubota et al, 2009; Vincent and Zurini 2012; Muthumani et al, 2013) และจากการที่ แอนติบอดีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ (โคลน 7F4) จับเฉพาะและยับยั้งกับไวรัส DENV-1 ดังนั้นจึงควรมีการศึกษามากต่อไปเพื่อใช้ plasmid จาก แอนติบอดีมนุษย์ที่สามารถยับยั้งไวรัสใช้เลือดออกทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์มากที่สุดเพื่อที่จะพัฒนา DNA วัคซีนที่ express แอนติบอดีที่ยับยั้งไวรัสใช้เลือดออกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในมนุษย์ ซึ่งเราจะใช้แอนติบอดีมนุษย์ที่สามารถยับยั้งไวรัสใช้เลือดออกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เราได้ผลิตและทดสอบไว้แล้ว (Setthapramote et al, 2012; Sasaki et al, 2013)

7. บรรณานุกรม (Bibliography)

- Adam VS, Crosariol M, Kumar S, Ge MQ, Czack SE, Roy S, et al. Adeno-associatedvirus 9-mediated airway expression of antibody protects old and immunodeficient mice against influenza virus. *Clin Vaccine Immunol* 2014;21: 1528–33.
- Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang L, Baltimore D. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* 2011; 481:81–4.
- Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, et al. Lethal anti-body enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1000790.
- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomized, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014; 384:1358–65.
- Chan KR, Ong EZ, Ooi EE. Therapeutic antibodies as a treatment option for dengue fever. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11:1147–57.
- Coller BA, Clements DE, Martyak T, Yelmene M, Thorne M, Parks DE. Advances in flavivirus vaccine development. *Idrugs* 2010; 13:880–4.
- Coller BA, Clements DE, Bett AJ, Sagar SL, Ter Meulen JH. The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine* 2011; 29:7267–75.
- Crill WD, Hughes HR, Trainor NB, Davis BS, Whitney MT, Chang GJ. Sculpting humoral immunity through dengue vaccination to enhance protective immunity. *Front Immunol* 2012; 3:334.
- Fang J, Yi S, Simmons A, Tu GH, Nguyen M, Harding TC, et al. An antibody delivery system for

- regulated expression of therapeutic levels of monoclonal antibodies in vivo. *Mol Ther* 2007; 15:1153–9.
- Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet* 2014; 385:453–65.
- Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003; 60:421–67.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370:1644–52.
- Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 2012;30:4301–6.
- Huisman W, Martina BE, Rimmelzwaan GF, Gruters RA, Osterhaus AD. Vaccine-induced enhancement of viral infections. *Vaccine* 2009; 27:505–12.
- Hombach J, Cardoso MJ, Sabchareon A, Vaughn DW, Barrett AD. Scientific consultation on immunological correlates of protection induced by dengue vaccines report from a meeting held at the World Health Organization 17–18 November 2005. *Vaccine* 2007; 25:4130–9.
- Hughes HR, Crill WD, Chang GJ. Manipulation of immunodominant dengue virus E protein epitopes reduces potential antibody-dependent enhancement. *Virology* 2012; 9:115.
- Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 2014; 32:1326–37.
- Jindal H, Bhatt B, Malik JS. Dengue vaccine: a valuable asset for the future. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10:2245–6.
- Johnson PR, Schnepf BC, Zhang J, Connell MJ, Greene SM, Yuste E, et al. Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys. *Nat Med* 2009; 15:901–6.
- Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A. A simple assay system for infection-enhancing and –neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods* 2010; 163:360–7.

- Konishi E, Miyagawa Y. Balance of infection-enhancing and neutralizing antibodies induced by a dengue tetravalent DNA vaccine in a mouse model. *Microbes Infect* 2011; 13:1091–8.
- Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci* 2009; 100:1566–72.
- Lai CJ, Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Donau O, Engle RE, et al. Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody and protection against DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys by passively transferred humanized antibody. *J Virol* 2007; 81:12766–74.
- Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, et al. Engineered anti-body Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:4005–10.
- Lewis AD, Chen R, Montefiori DC, Johnson PR, Clark KR. Generation of neutralizing activity against human immunodeficiency virus type 1 in serum by antibody gene transfer. *J Virol* 2002; 76:8769–75.
- Li L, Saade F, Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. *J Biotechnol* 2012; 162:171–82.
- Moi ML, Lim CK, Chua KB, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using FcγR-expressing cells. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1536.
- Morens DM, Halstead SB, Marchette NJ. Profiles of antibody-dependent enhancement of Dengue virus type 2 infection. *Microb Pathog* 1987; 3:231–7.
- Muthumani K, Flingai S, Wise M, Tingey C, Ugen KE, Weiner DB. Optimized and enhanced DNA plasmid vector based in vivo construction of a neutralizing anti-HIV-1 envelope glycoprotein Fab. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9:2253–62.
- Pierson TC, Diamond MS. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 747–94.
- Rodrigo WW, Alcena DC, Rose RC, Jin X, Schlesinger JJ. An automated Dengue virus

microneutralization plaque assay performed in human Fc γ receptor-expressing CV-1 cells. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80:61–5.

Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P,

Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, con-trolled phase 2b trial. *Lancet* 2012; 380:1559–67.

Sasaki T, Setthapramote C, Kurosu T, Nishimura M, Asai A, Omokoko MD, Pipattanaboon C,

Pitaksajjakul P, Limkittikul K, Subchareon A, Chaichana P, Okabayashi T, Hirai I, Leangwutiwong P, Misaki R, Fujiyama K, Ono K, Okuno Y, *Ramasoota P*, Ikuta K. Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection. *Antiviral Res.* 2013 Jun;98(3):423-31.

Setthapramote C, Sasaki T, Puiprom O, Limkittikul K, Pitaksajjakul P, Pipattanaboon P,

Sasayama M, Leuangwutiwong P, Phumratanaprapin W, Chamnachanan S, Kusolsuk T, Jittmittraphap A, Asai A, Arias JF, Hirai I, Kuhara M, Okuno Y, Kurosu T, *Ramasoota P*^{*}, Ikuta K^{*}. Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue-virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423:867-872

Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of

the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R. *J Biol Chem* 2001;276:6591–604.

Shimada M, Abe S, Takahashi T, Shiozaki K, Okuda M, Mizukami H, et al. Prophylaxis and

treatment of Alzheimer's disease by delivery of an adeno-associatedvirus encoding a monoclonal antibody targeting the amyloid Beta protein. *PLOS ONE* 2013; 8:e57606.

Sjatha F, Takizawa Y, Kotaki T, Yamanaka A, Konishi E. Comparison of infection-neutralizing

and –enhancing antibody balance induced by two distinct genotype strains of dengue virus type 1 or 3 DNA vaccines in mice. *Microbes Infect* 2013; 15:828–36.

Thomas SJ, Endy TP. Current issues in dengue vaccination. *Curr Opin Infect Dis* 2013;

16:429–34.

- Tjelle TE, Corthay A, Lunde E, Sandlie I, Michaelsen TE, Mathiesen I, et al. Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation. *Mol Ther* 2004; 9:328–36.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000; 181:2–9.
- Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Eng J. Med* 2015; 372:113–23.
- Vincent KJ, Zurini M. Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates. *Biotechnol J* 2012; 7:1444–50.
- Wilder-Smith A, Macary P. Dengue: challenges for policy makers and vaccine developers. *Curr Infect Dis Rep* 2014; 16:404
- Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *AdvGenet* 2005; 54:3–20.
- Yamanaka A, Kotaki T, Konishi E. A mouse monoclonal antibody against dengue virus type 1 Mochizuki strain targeting envelope protein domain II and displaying strongly neutralizing but not enhancing activity. *J Virol* 2013; 87:12828–37.
- Yamanaka A, Kosugi S, Konishi E. Infection-enhancing and –neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *J Virol* 2008; 82:927–37.
- Yamanaka A, Suzuki R, Konishi E. Evaluation of single-round infectious, chimeric dengue type 1 virus as an antigen for dengue functional antibody assays. *Vaccine* 2014; 32:4289–95.
- Yamanaka A, Pitaksajakul P, Ramasoota P, Konishi E. Expression of enhancing-activity-free

neutralizing antibody against dengue type 1 virus in plasmid-inoculated mice. Vaccine. 2015 Aug 7. pii: S0264-410X(15)01067-1. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.089.

Zuber C, Mitteregger G, Schuhmann N, Rey C, Knackmuss S, Rupprecht W, et al. Delivery of single-chain antibodies (scFvs) directed against the 37/67 kDa laminin receptor into mice via recombinant adeno-associated viral vectors for prion disease gene therapy. J Gen Virol 2008; 89:2055–61.

8. การเชื่อมโยงกับต่างประเทศหรือรางวัลที่ได้รับ

ทีมวิจัยของเราได้มีความร่วมมือกับนักวิจัยจาก Research Institute for Microbial diseases (RIMD) เกี่ยวกับ Epitope mapping of NhuMAbs against Dengue virus และ งานวิจัยด้านการพัฒนาดีเอ็นเอ วัคซีนป้องกันไข้เลือดออก กับ BIKEN Endowed Department for Dengue Vaccine Development Osaka University, Osaka, Japan

ผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

8.1 ผลงานตีพิมพ์

Yamanaka A, Pitaksajakul P, Ramasoota P, Konishi E. Expression of enhancing-activity-free neutralizing antibody against dengue type 1 virus in plasmid-inoculated mice. Vaccine. 2015 Aug 7. pii: S0264-410X(15)01067-1. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.089.

8.2 นักศึกษาปริญญาเอก

นาย สุรเชษฐ เบญจธรรมารักษ์ นักศึกษาปริญญาเอก หลักสูตร Ph.D. (Trop Med) คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กำลังทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง “Plasmid DNA expressing Neutralizing human antibodies against 4 serotypes on Dengue virus in mice” ภายใต้การควบคุม ของ รศ. พงศ์ราม ดร. ปานน้ำทิพย์ ดร ชลทิพย์ Professor Konishi และ Assist Professor Yamanaka.

8.3 รางวัล	สถาบันที่ให้รางวัล	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
1. รางวัลผลงานประดิษฐ์คิดค้นดีเด่น สภาวิจัยแห่งชาติ	คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	2559
2. รางวัลนิสิตเก่าดีเด่น	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2559

9. รายชื่อนักวิจัยทั้งหมด

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ นาย พงศ์ราม นามสกุล รามสูต

Name Mr. Pongrama Surname Ramasoota

คุณวุฒิ สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต (สพบ), MPH (Urban Health), M.Sc. (Microbiology),
Ph.D. (Microbiology)

อาชีพ พนักงานมหาวิทยาลัย

ตำแหน่ง หัวหน้าศูนย์ความเป็นเลิศการวิจัยแอนติบอดี, รองศาสตราจารย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Collaborative Professor, Osaka University

หน่วยงานที่สังกัด ศูนย์ความเป็นเลิศการวิจัยแอนติบอดี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

420/6 ถ.ราชวิถี เขตราชเทวี จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10400

โทรศัพท์ 02-354-9100-2 ต่อ 1562-4 โทรสาร 02-354-9167

e-mail : pongrama.ram@mahidol.ac.th

ที่อยู่ถาวร 116/ 1 ซอย ลาดพร้าว 94 ถนน ลาดพร้าว เขตวังทองหลาง กรุงเทพฯ 10310

หมายเลขโทรศัพท์ 02-9352922-3, 081-5527589

คณะนักวิจัย

(๑) ชื่อ (นางสาว) ปานน้ำทิพย์ นามสกุล พิทักษ์สัจจะกุล

Name (Miss.) Pannamthip Surname Pitaksajjakul

คุณวุฒิ วทบ. (เคมี), M.Sc.(Trop Med), Ph.D. (Trop Med)

อาชีพ พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่ง อาจารย์

หน่วยงานที่สังกัด ศูนย์ความเป็นเลิศการวิจัยแอนติบอดี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

420/6 ถ.ราชวิถี เขตราชเทวี จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10400

โทรศัพท์ 02-354-9100-2 ต่อ 1562-4 โทรสาร 02-354-9167

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) pannamthip.pit@mahidol.ac.th

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่ 089-9858305

(๒) ชื่อ นางสาว ชลทิพย์ นามสกุล พิพัฒนาบุรณ์

Name (Miss.) Chonlatip Surname Pipattanaboon

สัญชาติ ไทย

คุณวุฒิ วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) เกียรตินิยมอันดับ 1, M.Sc.(Trop Med), Ph.D. (Trop Med)

อาชีพ พนักงานมหาวิทยาลัยมหิดล ตำแหน่ง นักวิจัย

หน่วยงานที่สังกัดและรหัสไปรษณีย์ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการวิจัยแอนติบอดี

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล 420/6 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี
กรุงเทพ 10400 หมายเลขโทรศัพท์ 02-306-9186 โทรสาร 02-643-5616

ที่อยู่ถาวรและรหัสไปรษณีย์ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการวิจัยแอนติบอดี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

มหาวิทยาลัยมหิดล 420/6 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพ 10400

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) chonlatip.pip@mahidol.ac.th

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่ 087-1550795

(๓) ชื่อ (นาย) อะซุชิ นามสกุล ยามานากะ

Name (Mr.) Atsushi Surname Yamanaka

คุณวุฒิ B.Sc., M.Sc, Ph.D

อาชีพ พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่ง Doctor

หน่วยงานที่สังกัด BIKEN Endowed Department of Dengue Vaccine Development, Research
Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

หมายเลขโทรศัพท์ Tel: 02- 354-5981

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) knmya@biken.osaka-u.ac.jp

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่: 084-325 -9103

(๔) ชื่อ (นาย) เอจิ นามสกุล โคนิชิ

Name (Mr.) Eiji Surname Konishi

คุณวุฒิ B.Sc., M.Sc, Ph.D

อาชีพ พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่ง Professor

หน่วยงานที่สังกัด BIKEN Endowed Department of Dengue Vaccine Development, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

หมายเลขโทรศัพท์ Tel: 02- 354-5981

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) ekon@biken.osaka-u.ac.jp

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่: 089-023-0320

(๕) ชื่อ (นาย) ทาเคชิ นามสกุล คูโรสุ

Name (Mr.) Takeshi Surname Kurosu

คุณวุฒิ DVM., M.Sc, Ph.D.

อาชีพ พนักงานมหาวิทยาลัย ตำแหน่ง Doctor

หน่วยงานที่สังกัด Research Institute of Microbial Disease, Osaka University, Japan

หมายเลขโทรศัพท์ Tel: +81 6 6879 8308

หมายเลขโทรสาร Fax: +81 6 6879 8310

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail) tkurosu@biken.osaka-u.ac.jp (T.Kurosu)