

## ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

Thailand Research Fund (TRF) Senior Research Scholar

ปี 2557-2559

การพัฒนาวัคซีนใหม่และการสร้างศักยภาพเพื่อความยั่งยืนในการวิจัยวัคซีนของประเทศไทย

New Vaccines and Sustainable Capacity Development for Vaccine Research in Thailand

### บทคัดย่อ

เป้าหมายและขอบเขตของการวิจัย คือ การพัฒนาศักยภาพและความสามารถของศูนย์วิจัยวัคซีน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้สามารถพัฒนาและคิดค้นวัคซีนได้อย่างครบวงจร ขอบเขตครั้งนี้ครอบคลุม การพัฒนาวัคซีนใช้เลือดออกและวัคซีนโรคภูมิแพ้ไรฝุ่น ซึ่งเป็นผลการดำเนินงานเพียง 2 ปี (เนื่องจากหัวหน้าโครงการวิจัย, ศ. นพ.เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, ได้รับแต่งตั้งให้เป็นผู้บริหารของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงต้องขอยุติโครงการก่อนเวลาที่กำหนด) 1). ผลการวิจัยวัคซีนเพื่อป้องกันโรคไข้เลือดออกด้วยวิธี prime-boost โดยการให้ tetravalent DNA ด้วยวิธี electroporation ร่วมกับการฉีด tetravalent live attenuated vaccines (ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ในหนูและลิง พบว่าการฉีดวัคซีนแบบ heterologous prime-boosting ไม่ว่าจะเป็นการให้วัคซีนชนิดเชื้ออ่อนกำลัง (tetravalent live-attenuated vaccine, TLAV) เป็นวัคซีนกระตุ้นนำ และให้ดีเอ็นเอวัคซีน (tetravalent DNA vaccine, TDNA) เป็นวัคซีนกระตุ้นซ้ำ หรือการให้สลับกัน ช่วยทำให้ปริมาณ neutralizing antibody (NtAb) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติถึง 10 เท่า เมื่อเทียบกับก่อนการได้รับวัคซีนกระตุ้นซ้ำ และ ผลการทดสอบในลิงเพื่อดูประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกีทั้งสี่ซีโรไทป์ พบว่าวัคซีน DNA สูตรผสมสี่สายพันธุ์ เมื่อใช้วิธีฉีดวัคซีน แบบ prime/boost คือ Live-attenuated vaccine primed/DNA vaccine boosted สามารถป้องกันลิงไม่ให้ติดเชื้อไวรัสเด็งกี ได้ 3 สายพันธุ์คือ serotype 1, 2, 3 ได้ 100% แต่สามารถป้องกัน สายพันธุ์ Serotype 4 ได้เพียง 60% เท่านั้น แผนการวิจัยในอนาคตจึงต้องปรับคุณสมบัติวัคซีนสำหรับสายพันธุ์ serotype 4 โดยอาจ พัฒนาใหม่โดยใช้เทคโนโลยีอื่น ได้แก่ mRNA และ viral-like particles แทน DNA vaccine ต่อไป 2). การพัฒนา humanized mouse model โดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากสายสะดือในหนู NSG พบว่ามีความสำเร็จในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม สรุปลังยังไม่สามารถใช้เป็น animal model ที่เหมาะสมในการใช้ เพื่อทดสอบวัคซีน เพราะปริมาณ human B-cells ยัง ไม่เพียงพอในการทดสอบการสร้างแอนติบอดี 3). โครงการพัฒนาวัคซีนภูมิแพ้ไรฝุ่น ได้ออกแบบ adjuvant-free animal model สำหรับภูมิแพ้ไรฝุ่น เพื่อประเมิน HDM allergy DNA therapeutic vaccines, มีการเตรียม virus-like particle สำหรับ multi-copies ของ Der p2 protein vaccine เพื่อใช้ในการฉีดวัคซีนแบบ heterologous prime boost ในอนาคต และประเมิน Component-resolved diagnosis of HDM allergy โดยใช้ตัวอย่างน้ำเหลืองของผู้ที่มีผลการตรวจ ImmunoCap เป็นบวก จำนวน 222 ราย พบว่า 54% (119/222) มี specific IgE ต่อ recDer p23 ในขณะที่ 67% (148/222) มี specific IgE ต่อ recDer p2 ซึ่งยืนยันว่า Der p23 เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของไรฝุ่น ผลผลิตเชิงประจักษ์ด้านการนำไปใช้

ประโยชน์ของประเทศ จากการได้รับทุนครั้งนี้ คือ เป็นผลทำให้ศูนย์วิจัยวัคซีนแห่งนี้ ได้พัฒนาศักยภาพและความสามารถที่เข้มแข็งขึ้นจริงจนสามารถช่วยตอบโจทย์ท้าทายในช่วงโรคระบาดร้ายแรงของโควิด-19 โดยสามารถวิจัยและพัฒนาวัคซีนโควิด-19 ขึ้นมาอย่างรวดเร็ว ทั้ง 2 เทคโนโลยีคือ DNA และ mRNA vaccines ทั้งนี้สามารถทำการทดสอบ mRNA vaccine ในหนูทดลองและในลิงโดยใช้ระยะเวลาเพียง 4 เดือน ซึ่งเป็น การทำลายสถิติการพัฒนาวัคซีนของประเทศ ผลการทดลองพบว่าสามารถกระตุ้น neutralizing antibody ได้สูงมากเป็นที่น่าสนใจ คือ มีค่าเฉลี่ย 1:40,000 titer ในหนูทดลองและ ประมาณ 1:5,000ในลิง และกำลังเตรียมการผลิตวัคซีนเพื่อทำการทดสอบในมนุษย์ต่อไป โดยคาดว่า ประเทศไทยเราจะเป็นหนึ่งใน 20 วัคซีน โควิด-19 ที่สามารถเข้าสู่การทดสอบในมนุษย์ได้

## ABSTRACT

The ultimate goal is to enhance the capacity and capability of our Chula Vaccine Research Center (ChulaVRC). During the awarded of the grant, we focused on 3 objectives: 1). Dengue vaccine development on prime/boost strategy. 2). Developing humanized mouse model for vaccine testing. 3). House dust mite allergy vaccine. Here are key results: 1). We have performed prime-boost vaccination of tetravalent dengue DNA vaccine (TDNA) by *in vivo* electroporation with tetravalent live attenuated vaccine (TLAV) in mice and non-human primates. We found that either TVLA prime and TDNA boost or TDNA prime and TVLA boost could significantly increase neutralizing antibody titer of 10 times. In non-human primate viral challenge model, TVLA/DNA dengue vaccine prime-boost has shown a 100% protection against 3 serotypes: serotype 1, 2, and 3; but has only 60% protection against serotype 4. We therefore plan to improve the efficacy of the vaccine by using other new technologies including: mRNA and viral-like particles vaccine. 2). Humanized mouse model, we have successfully engrafted human hematopoietic stem cells isolated from human cord blood in NSG mice. Nonetheless B-cells development is not sufficient to be a proper humanized animal model for vaccine testing. 3). House dust mite (HDM) allergy vaccine, adjuvant-free animal model was designed for evaluation of HDM allergy DNA therapeutic vaccines. We have also prepared virus-like particle for multi-copies Der p2 protein vaccine for heterologous prime boost strategy in the future. Component-resolved diagnosis of HDM allergy was evaluated with 222 ImmunoCap positive serum samples. We found that 54% (119/222) and 67% (148/222) had specific IgE to recDer p23 and recDer p2, respectively. This confirms that Der p23 is a major cause of house dust mite allergy. Of note, there is an important post-funded outcome which indicates the impact of this grant has ultimately enhanced the capacity and capability of our ChulaVRC; which is the capability to develop Covid-19 vaccine candidates during the pandemic since

January 2020 in an exceptional speed. Within 4 months, our vaccine research center was able to develop DNA and mRNA vaccines and has the mRNA vaccine tested in mice and non-human primates (NHPs). More importantly the results both in mice and NHPs showed a high neutralizing antibody induction: median NtAb titer 1:40,000 in mice and 1: 5,000 in NHPs. With those convincing results, the mRNA vaccine is then under the GMP production for further clinical development.

**Key words:** *dengue tetravalent DNA vaccine, humanized mice, house dust mite allergy vaccine, Covid19, mRNA vaccine*

## 1. ผลผลิต (Output)

| ผลงาน                                                    | ปีที่ 1 | ปีที่ 2 | รวม |
|----------------------------------------------------------|---------|---------|-----|
| 1. จำนวนนักวิจัยที่สร้างจากโครงการ                       |         |         |     |
| 1.1 สถาบันเดียวกัน (ด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานและด้านคลินิก) | 3       | 3       | 6   |
| 1.2 ต่างสถาบัน (ด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานและด้านคลินิก)     | 3       | 3       | 6   |
| 1.3 จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาเอก                          | 0       | 1       | 1   |
| 1.4 จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาโท                           | 0       | 1       | 1   |
| 2. จำนวนผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ              | 7       | 5       | 12  |
| 3. จำนวนผลงานที่คาดว่าจะจดสิทธิบัตร **                   | 0       | 1       | 1   |

## คณะผู้ดำเนินการวิจัย

- 2.1 ศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม หัวหน้าโครงการวิจัย
- 2.2 Associate professor Alain Jacquet
- 2.3 ผศ.ดร.นสพ.ฐานิสร์ ดำรงวัฒนโกสิน
- 2.4 รศ.ดร.พญ.กนิษฐา ภัทรกุล
- 2.5 ผศ.ดร.ชุตีธ เกตุลอย
- 2.6 อ.ดร.เอกชัย พรหมเพชร
- 2.7 ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล

## ประเภทของวารสารที่ตีพิมพ์

| Journal                                                         | 5-year Impact factor |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------|
| European Journal of Allergy and Clinical Immunology             | 6.28                 |
| Allergology International                                       | 4.13                 |
| HIV Medicine                                                    | 3.56                 |
| Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome                  | 3.5                  |
| International Arch Allergy Immunology                           | 2.92                 |
| Journal of Viral Eradication                                    | 2.82                 |
| Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology                 | 1.74                 |
| AIDS Research and Human Retroviruses                            | 1.67                 |
| International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics | 1.04                 |

## 2. ผลลัพธ์ (Outcome)/ประโยชน์ที่ได้รับ

ผลผลิตเชิงประจักษ์ด้านการนำไปใช้ประโยชน์ของประเทศ จากการได้รับทุนครั้งนี้ คือ เป็นผลทำให้ศูนย์วิจัยวัคซีนแห่งนี้ ได้พัฒนาศักยภาพและความสามารถที่เข้มแข็งขึ้นจริงจนสามารถช่วยตอบโจทย์ท้าทายในช่วงโรคระบาดร้ายแรงของโควิด-19 โดยสามารถวิจัยและพัฒนาวัคซีนโควิด-19 ขึ้นมาอย่างรวดเร็ว ทั้ง 2 เทคโนโลยี คือ DNA และ mRNA vaccines ทั้งนี้สามารถทำการทดสอบ mRNA vaccine ในหนูทดลองและในลิงโดยใช้ระยะเวลาเพียง 4 เดือน ซึ่งเป็นการทำลายสถิติการพัฒนาวัคซีนของประเทศ ผลการทดลองพบว่าสามารถกระตุ้น neutralizing antibody ได้สูงมากเป็นที่น่าพอใจ คือ มีค่าเฉลี่ย 1:40,000 titer ในหนูทดลองและประมาณ 1:5000 ในลิง และกำลังเตรียมการผลิตวัคซีนเพื่อทำการทดสอบในมนุษย์ต่อไป โดยคาดว่า ประเทศไทยจะเป็นหนึ่งใน 20 วัคซีน โควิด-19 ที่สามารถเข้าสู่การทดสอบในมนุษย์ได้

## 3. ผลกระทบ (Impact)

ทำให้สื่อมวลชนนานาชาติทั้งจากประเทศอังกฤษประเทศอเมริกาและประเทศญี่ปุ่นมีการกล่าวถึงศักยภาพในการพัฒนา วัคซีนโควิด-19 ของประเทศไทยที่ได้ผลดีในการทดสอบในลิง กำลังเตรียมการที่จะทำการทดสอบในอาสาสมัครต่อไปซึ่งมีไม่กี่ประเทศในโลกที่เข้าสู่ขั้นตอนนี้ ทั้งนี้หากผลการวิจัยสามารถเข้าสู่ก่อนนำไปใช้ได้จริงในปี 2564 ก็จะช่วยแก้ปัญหาการระบาดร้ายแรงของลูกโควิด-19 ได้ ที่สำคัญกว่านั้นคือศักยภาพและความสามารถของศูนย์วิจัยวัคซีนที่ได้รับทุนวิจัยจาก สกว. ครั้งนี้ รวมทั้งประสบการณ์การพัฒนาวัคซีนโควิด-19

ได้อย่างครบวงจรทำให้ในอนาคตอันใกล้สามารถพัฒนาวัคซีนอื่นได้รวดเร็วยิ่งขึ้นอย่างครบวงจรได้อย่างแน่นอน

## เนื้อหางานวิจัย ของโครงการวิจัยหลักๆ

### Tetravalent dengue DNA vaccine

หลังจากผู้วิจัยได้นำเสนอการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในลิง โดยการให้วัคซีนแบบ Heterologous prime-boost ซึ่งใช้ tetravalent live attenuated vaccine (TLAV) เป็น primer vaccine และให้ tetravalent DNA vaccine (TDNA) เป็น booster vaccine โดยพบว่าลิงกลุ่มที่ได้รับวัคซีนนี้ (N=5) มีภูมิคุ้มกันเพิ่มมากขึ้น และสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกี ซีโรไทป์ 2 ได้ 100%

ผู้วิจัยจึงจะทดสอบเพิ่มเติมเพื่อดูประสิทธิภาพของการให้วัคซีนรูปแบบดังกล่าว โดยจะเพิ่มจำนวนลิงที่ใช้ในการทดสอบ (N=24) และแบ่งกลุ่มลิงที่ได้รับวัคซีน ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย เพื่อทดสอบการป้องกันเชื้อไวรัส โดยการ challenge ด้วยเชื้อไวรัสเด็งกีทั้งสี่ซีโรไทป์ ซึ่งการทดสอบใหม่นี้จะมีการปรับปรุงสูตรวัคซีน TLAV และปรับเพิ่มปริมาณ TDNA ที่ใช้ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดก่อนนำไปใช้ศึกษาในคนต่อไป

อย่างไรก็ตามในปีที่ผ่านมา ผู้วิจัยประสบปัญหาเรื่องการเตรียมลิง ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย เพื่อให้มีจำนวนเท่าๆ กัน ในแต่ละกลุ่มย่อย จำนวน 4 กลุ่ม ประกอบกับปัญหาเรื่องการรอฟื้นที่ในการใช้เลี้ยงดู ณ Primate Research Center, Bogor ประเทศอินโดนีเซีย จึงทำให้งานวิจัยเป็นไปได้ล่าช้ากว่าเป้าหมายที่ระบุไว้ ซึ่งเพิ่งจะได้เริ่มการทดสอบเมื่อวันที่ 26 กันยายน 2559 ที่ผ่านมา โดยคาดว่าผลการทดสอบทั้งหมดจะแล้วเสร็จประมาณวันที่ 30 เมษายน 2560

แผนการทดสอบประสิทธิภาพของการให้วัคซีนแบบ Heterologous Prime-boost (TLAV + TDNA) ณ  
Primate Research Center, Bogor Agricultural University, Indonesia

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการให้วัคซีนแบบ Heterologous prime-boost
  - 1.1 การปรับปรุงประสิทธิภาพของวัคซีน TLAV
    - 1.1.1 ปรับเปลี่ยนสายพันธุ์เชื้อไวรัสเด็งกี ซีโรไทป์ 3 และ 4 ที่ใช้เป็นวัคซีนต้นแบบ
    - 1.1.2 ปรับเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสเด็งกี ซีโรไทป์ 3 และ 4 ในสูตรผสมรวม
  - 1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของการ boost ด้วย TDNA
    - 1.2.1 การทดสอบการ boost ด้วย TDNA จำนวน 1 หรือ 2 ครั้ง โดยพิจารณาจากปริมาณ NtAbs ที่ Day 74 (14 วันหลังจาก boost) ซึ่งถ้าปริมาณ NtAbs อยู่ในระดับต่ำ จะทำการ boost ด้วย TDNA อีกครั้ง
    - 1.2.2 ปรับเพิ่มปริมาณ TDNA เป็น 2 mg/dose (0.5 mg/serotype)

2. เพื่อทดสอบความสามารถของวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสเด็งกี โดยการ challenge ลิงแบบสุ่ม ด้วยเชื้อไวรัสเด็งกีครบทั้ง 4 สายพันธุ์ และติดตามไวรัสในกระแสเลือด ติดต่อกันวันเว้นวัน เป็นระยะเวลา 14 วัน

#### แผนการทดลอง

*Macaca fascicularis* หรือลิงหางยาว (Cynomolgous หรือ long-tailed monkey) ที่ผ่านการทดสอบว่าเป็น flavivirus naïve (DENV and JEV) จำนวนทั้งสิ้น 36 ตัว ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มแบบสุ่ม ดังนี้

| Group                      | Primed vaccine | Boosted vaccine                                                | No. of NHPs |
|----------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------|-------------|
| 1 Heterologous Prime-boost | TLAV           | TDNA <sup>+</sup><br>(total 2 mg/dose)<br>จำนวน 1 หรือ 2 ครั้ง | 24          |
| 2 Control <sup>++</sup>    | PBS            | -                                                              | 12          |

<sup>+</sup> การ boost ด้วย TDNAs จำนวน 1 หรือ 2 ครั้ง ขึ้นกับปริมาณ NtAbs ที่ตรวจพบได้จาก Day 74 (14 วัน หลังจาก boost ด้วย TDNAs จำนวน 1 ครั้ง)

โดยปริมาณ *tDNAs total concentration 2 mg (0.5 mg/serotype)*

<sup>++</sup> กลุ่ม control ใช้ร่วมกับมหาวิทยาลัยมหิดล

#### ตารางการฉีดวัคซีน และการ challenge ลิงด้วยเชื้อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์

##### กลุ่มที่ 1 : TLAV + TDNA (จำนวน 1 หรือ 2 ครั้ง) (N = 24)

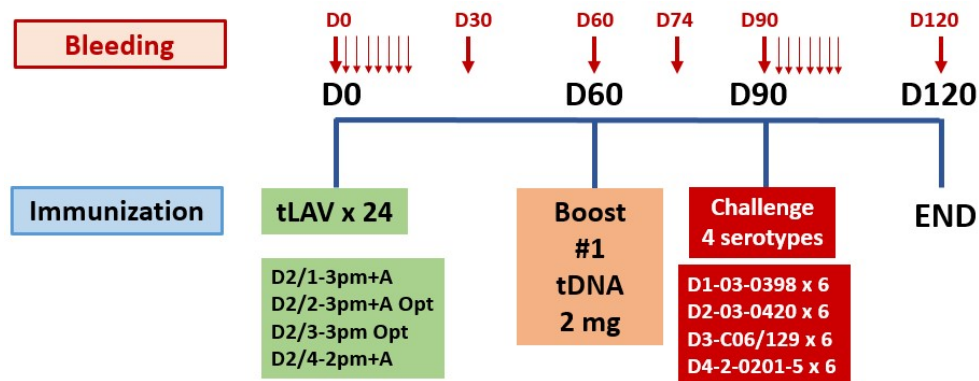
ลิงทั้งหมด จำนวน 24 ตัว (Flavivirus naïve) จะถูกฉีดนำ (*prime*) ด้วย *TLAV* ทาง subcutaneous route **ในวันที่ 0** หลังจากนั้นจะถูกเจาะเลือดเพื่อตรวจติดตามปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ในวันที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14

จากนั้นจะถูกฉีดกระตุ้น (*boost*) ด้วย *TDNA ปริมาณ 2 mg (0.5 mg/serotype) จำนวน 1 ครั้ง* ด้วยวิธี *intradermal electroporation* **ในวันที่ 60** โดยหลังจากได้รับวัคซีนกระตุ้นเป็นเวลา 14 วัน (**วันที่ 74**) ลิงจะถูกเจาะเก็บเลือดเพื่อนำไปตรวจหาระดับ neutralizing antibodies ต่อเชื้อไวรัสทั้ง 4 ซีโรไทป์ เพื่อนำผลที่ได้มาใช้ในการประกอบการตัดสินใจสำหรับการทดสอบต่อว่าจะเลือกทางเลือกใด

##### ทางเลือกที่ 1 : Virus challenge

ถ้าปริมาณ neutralizing antibodies ต่อเชื้อไวรัสทั้ง 4 ซีโรไทป์ อยู่ใน**ระดับที่สูง** (สูงกว่าการทดสอบในลิงครั้งก่อนที่ลิงได้รับการกระตุ้นด้วย TDNA จำนวน 3 ครั้ง คือประมาณ 1,280) ลิงทั้งหมดจะถูกแบ่งกลุ่มแบบสุ่ม ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว เพื่อนำไป **challenge ด้วยเชื้อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์** **ในวันที่ 90** และหลังจากนั้นจะถูกเจาะเลือดเพื่อตรวจติดตามปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ในวันที่ 92, 94, 96,

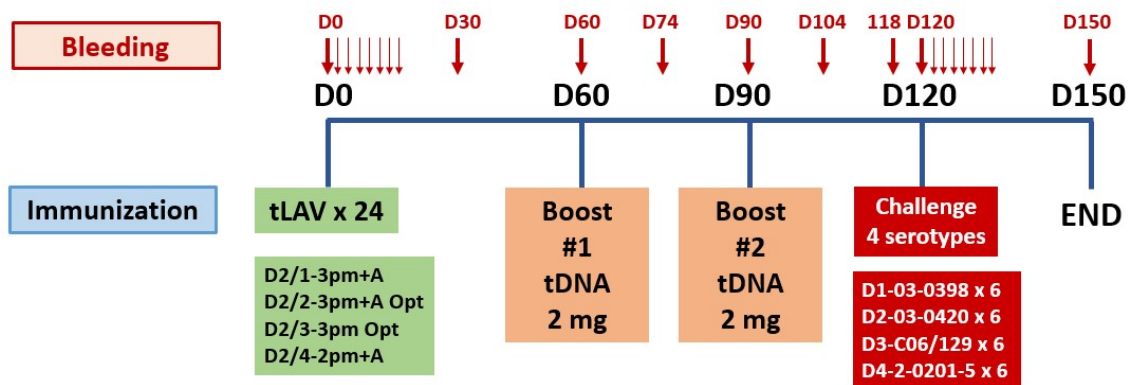
98, 100, 102 และ 104 หลังจาก challenge และถูกเจาะเก็บเลือดครั้งสุดท้ายในวันที่ 120 เพื่อตรวจหา anamnestic response รายละเอียดของการเจาะเลือดแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 1: แสดงตารางการฉีดวัคซีน ของกลุ่มที่ 1 (ทางเลือกที่ 1) กรณีที่ปริมาณ NtAb อยู่ในระดับสูง จึงจะถูกแบ่งกลุ่มแบบสุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว จำนวน 4 กลุ่ม และถูก challenge ด้วยเชื้อไวรัสตั้งที่ กลุ่มละ 1 ซีโรไทป์ ที่ปริมาณ  $1 \times 10^5$  FFU ในวันที่ 90 ของการทดสอบ

## ทางเลือกที่ 2 : Additional TDNA boosting

ถ้าปริมาณ neutralizing antibodies ต่อเชื้อไวรัสทั้ง 4 ซีโรไทป์ อยู่ในระดับที่ต่ำ จึงทั้งหมดจะถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน TDNA เพิ่มอีก 1 ครั้ง ในวันที่ 90 และถูกแบ่งกลุ่มแบบสุ่ม ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว เพื่อนำไป challenge ด้วยเชื้อไวรัสตั้งที่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ ในวันที่ 120 และหลังจากนั้นจะถูกเจาะเลือดเพื่อตรวจติดตามปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ในวันที่ 122, 124, 126, 128, 130, 132 และ 134 หลังจาก challenge และถูกเจาะเก็บเลือดครั้งสุดท้ายในวันที่ 150 เพื่อตรวจหา anamnestic response รายละเอียดของการเจาะเลือดแสดงในตารางที่ 2



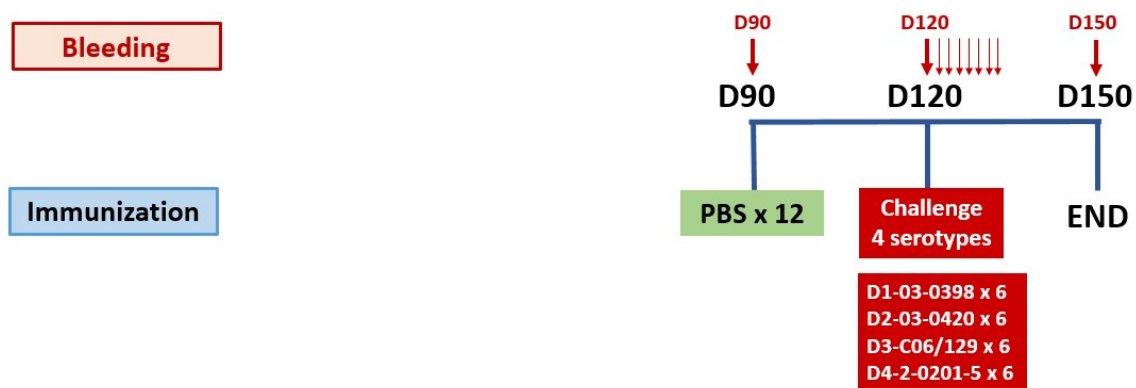
ภาพที่ 2 : แสดงตารางการฉีดวัคซีน ของกลุ่มที่ 1 (ทางเลือกที่ 2) กรณีที่ปริมาณ NtAb อยู่ในระดับต่ำ จึงจะถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน TDNA เพิ่มอีก 1 ครั้ง ในวันที่ 90 จากนั้นจึงจะถูกแบ่งกลุ่มแบบสุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

จำนวน 4 กลุ่ม และถูก challenge ด้วยเชื้อไวรัสเด็งกี กลุ่มละ 1 ซีโรไทป์ ที่ปริมาณ  $1 \times 10^5$  FFU ในวันที่ 120 ของการทดสอบ

### กลุ่มที่ 2 : Control (N = 12)

กลุ่ม control นี้ได้ใช้ร่วมกับโครงการของมหาวิทยาลัยมหิดล (ดร.รจนกร พูลมานะอุสาทะกุล เป็นผู้ประสานงาน) ทั้งนี้เพื่อประหยัดงบประมาณในการเลี้ยงดู ผู้วิจัยจึงได้วางแผนให้กลุ่ม control นั้น เริ่มดำเนินการในวันที่ 90 ของการทดสอบ โดยจะนับเป็น Day 0 ของการทดลอง

ลิงทั้งหมด จำนวน 12 ตัว (Flavivirus naïve) จะถูกฉีดด้วย PBS ในวันที่ 90 (หรือ Day 0) หลังจากนั้นจะถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อย เพื่อ challenge ด้วยเชื้อไวรัสเด็งกี ทั้ง 4 ซีโรไทป์ ทาง subcutaneous route ในวันที่ 120 (หรือ Day 30) รายละเอียดของการเจาะเลือดแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 3 : แสดงตารางการฉีดวัคซีน ของกลุ่มที่ 2 (กลุ่มควบคุม) ลิงจะถูกฉีดด้วย PBS ในวันที่ 90 (Day 0) จากนั้นลิงจะถูกแบ่งกลุ่มแบบสุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว จำนวน 3 กลุ่ม สำหรับ challenge ด้วยเชื้อไวรัสเด็งกี ซีโรไทป์ 1, 3 และ 4 และ กลุ่มละ 6 ตัว จำนวน 1 กลุ่ม สำหรับ challenge ด้วยเชื้อไวรัสเด็งกี ซีโรไทป์ 2 ที่ปริมาณ  $1 \times 10^5$  FFU ในวันที่ 120 (Day 30) ของการทดสอบ

การทดสอบนี้ได้เริ่มดำเนินการเจาะเก็บเลือด day -30 เพื่อ screening หาลิงที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ทดสอบไปแล้วเมื่อวันที่ 26 ก.ย. 59 ที่ผ่านมา คาดว่าการทดลองในลิง และการทดสอบทางห้องปฏิบัติการจะแล้วเสร็จประมาณ เม.ย. 60

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดการเจาะเลือดของลิงที่ได้รับวัคซีนในกลุ่มที่ 1 Option 1 : TLAV + TDNA จำนวน 1 ครั้ง

| Day | Event      | Total blood (ml) | Whole blood (ml) |     | EDTA blood (ml) |                        |                   |      | Clotted blood (ml) |                  |                                  |
|-----|------------|------------------|------------------|-----|-----------------|------------------------|-------------------|------|--------------------|------------------|----------------------------------|
|     |            |                  | Total            | CBC | Total           | Viral load (vol x no.) | Other (vol x no.) | PBMC | Total              | PRNT (vol x no.) | Liver f <sup>n</sup> (vol x no.) |
| -30 | Screening  | 10.5             | 0.5              | 0.5 | 5               |                        | 0.3x8             | √    | 5                  | 0.5x4            | 0.5x1                            |
| 0   | Immunizing | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 2   |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 4   |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 6   |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 8   |            | 2.7              | 0.5              | 0.5 | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      |                    |                  |                                  |
| 10  |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 12  |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 14  |            | 3.2              |                  |     | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      | 1                  | 0.5x1            |                                  |
| 30  |            | 8.7              | 0.5              | 0.5 | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 5                  | 0.5x4            | 0.5x1                            |
| 60  | Boost #1   | 7.2              |                  |     | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 4                  | 0.5x4            |                                  |
| 74  |            | 7.2              | 0.5              | 0.5 | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 4                  | 0.5x4            |                                  |
| 90  | Challenge  | 2.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      | 1                  | 0.5x1            |                                  |
| 92  |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 94  |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 96  |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 98  |            | 2.7              | 0.5              | 0.5 | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      |                    |                  |                                  |
| 100 |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 102 |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 104 |            | 3.2              |                  |     | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      | 1                  | 0.5x1            |                                  |
| 120 |            | 8.7              | 0.5              | 0.5 | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 5                  | 0.5x4            | 0.5x1                            |

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดการเจาะเลือดของลิงที่ได้รับวัคซีนในกลุ่มที่ 1 Option 2 : TLAV + TDNA จำนวน 2 ครั้ง

| Day | Event      | Total blood (ml) | Whole blood (ml) |     | EDTA blood (ml) |                        |                   |      | Clotted blood (ml) |                  |                                  |
|-----|------------|------------------|------------------|-----|-----------------|------------------------|-------------------|------|--------------------|------------------|----------------------------------|
|     |            |                  | Total            | CBC | Total           | Viral load (vol x no.) | Other (vol x no.) | PBMC | Total              | PRNT (vol x no.) | Liver f <sup>n</sup> (vol x no.) |
| -30 | Screening  | 10.5             | 0.5              | 0.5 | 5               |                        | 0.3x8             | √    | 5                  | 0.5x4            | 0.5                              |
| 0   | Immunizing | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 2   |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 4   |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 6   |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 8   |            | 2.7              | 0.5              | 0.5 | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      |                    |                  |                                  |
| 10  |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 12  |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 14  |            | 3.2              |                  |     | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      | 1                  | 0.5x1            |                                  |
| 30  |            | 8.7              | 0.5              | 0.5 | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 5                  | 0.5x4            | 0.5x1                            |
| 60  | Boost #1   | 7.2              |                  |     | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 4                  | 0.5x4            |                                  |
| 74  |            | 7.2              | 0.5              | 0.5 | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 4                  | 0.5x4            |                                  |
| 90  | Boost #2   | 7.2              |                  |     | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 4                  | 0.5x4            |                                  |
| 104 |            | 6.7              | 0.5              | 0.5 | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 3                  | 0.5x3            |                                  |
| 118 |            | 1.6              |                  |     | 0.6             |                        | 0.15x2            |      | 1                  | 0.5x1            |                                  |
| 120 | Challenge  | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 122 |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 124 |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 126 |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 128 |            | 2.7              | 0.5              | 0.5 | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      |                    |                  |                                  |
| 130 |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 132 |            | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |
| 134 |            | 3.2              |                  |     | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      | 1                  | 0.5x1            |                                  |
|     |            |                  |                  |     |                 |                        |                   |      |                    |                  |                                  |
| 150 |            | 8.7              | 0.5              | 0.5 | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 5                  | 0.5x5            | 0.5x1                            |

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดการเจาะเลือดของลิงที่ได้รับวัคซีนในกลุ่มที่ 2 Control

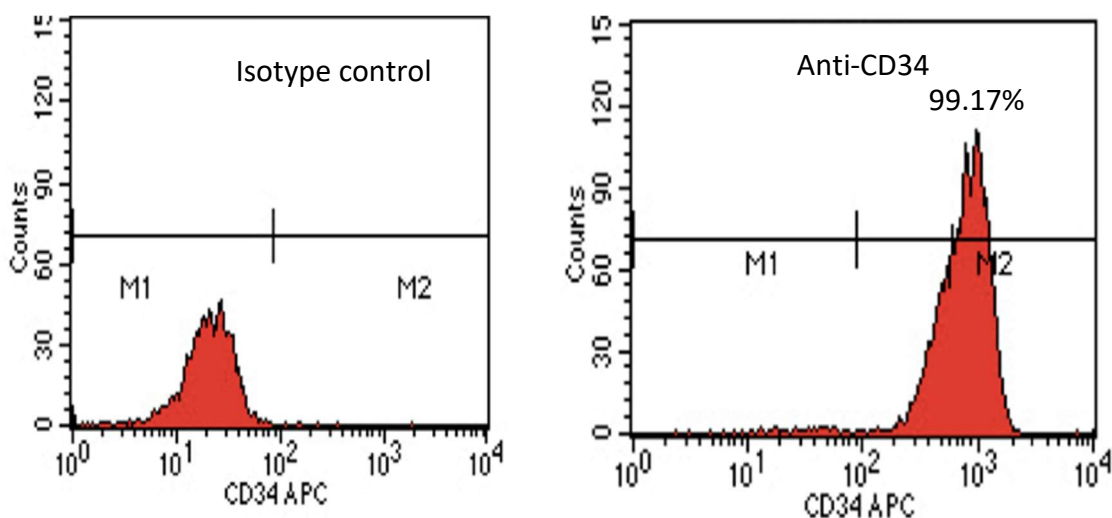
| Day      | Event        | Total blood (ml) | Whole blood (ml) |     | EDTA blood (ml) |                        |                   |      | Clotted blood (ml) |                  |                                  |                   |
|----------|--------------|------------------|------------------|-----|-----------------|------------------------|-------------------|------|--------------------|------------------|----------------------------------|-------------------|
|          |              |                  | Total            | CBC | Total           | Viral load (vol x no.) | Other (vol x no.) | PBMC | Total              | PRNT (vol x no.) | Liver f <sup>n</sup> (vol x no.) | Other (vol x no.) |
| 60 (-30) | Screening    | 10.7             | 0.5              | 0.5 | 5               |                        | 0.3x8             | √    | 5.2                | 0.6x1, 0.5x1     | 0.5                              | 0.2x5             |
| 90 (0)   | Immunization | 9.2              |                  |     | 5               |                        | 0.3x8             | √    | 4.2                | 0.6x1, 0.5x1     |                                  | 0.2x5             |
| 120 (30) | Challenge    | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |                   |
| 122 (32) |              | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |                   |
| 124 (34) |              | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |                   |
| 126 (36) |              | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |                   |
| 128 (38) |              | 2.7              | 0.5              | 0.5 | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      |                    |                  |                                  |                   |
| 130 (40) |              | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |                   |
| 132 (42) |              | 1.6              |                  |     | 1.6             | 0.2x4                  |                   |      |                    |                  |                                  |                   |
| 134 (44) |              | 4.4              |                  |     | 2.2             | 0.2x4                  | 0.15x2            |      | 2.2                | 0.6x1, 0.5x1     |                                  |                   |
| 150 (60) |              | 7.7              | 0.5              | 0.5 | 3.2             |                        | 0.2x8             | √    | 4                  | 0.6x1, 0.5x1     | 0.5x1                            | 0.2x2             |

## Humanized mouse model

### Humanized Mice Model Construction for Vaccines and Immunology Researches

1. Set up the protocol for haematopoietic stem cells (CD34+) isolation from umbilical cord blood

ในระยะเริ่มต้นของโครงการได้ทำการแยก Haematopoietic stem cell (HSCs, CD34+) จากเลือดสายสะดือ (umbilical cord blood) เพื่อใช้ในการปลูกถ่ายสู่หนู NOS-SCID IL-2R  $\gamma^{\text{null}}$  (NSG) ผลการแยก CD34+ cells พบว่าสามารถแยก CD34+ ได้ในระดับที่น่าพอใจ คือมี purity ของ CD34+ สูงกว่า 99% (รูปที่ 1) ซึ่งเซลล์ที่แยกได้นี้จะนำไปเลี้ยงและปลูกถ่ายในหนูเพื่อสร้าง humanized mice ต่อไป



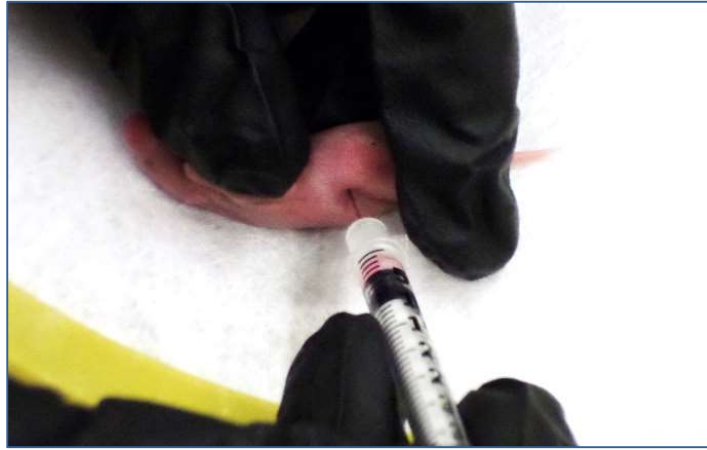
รูปที่ 1: Purity ของ CD34+ ที่แยกได้จาก umbilical cord blood

2. Engraftment of CD34+ cells in immunodeficient mice (NOD-scid IL-2 $\gamma^{\text{null}}$ , NSG) mice  
การปลูกถ่าย HSCs ในหนู NSG สามารถทำได้สองวิธี ได้แก่ การปลูกถ่ายในลูกหนูเกิดใหม่ (อายุไม่เกิน 5 วัน) และการปลูกถ่ายในหนูโตเต็มวัย ซึ่งมีวิธีการต่างกัน ได้แก่

#### 2.1 การปลูกถ่ายในลูกหนูเกิดใหม่ (engraftment in newborn mouse)

สามารถทำได้โดยการการนำ HSCs ที่แยกได้ในข้อ 1 เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum 10%, IL-3, IL-6 และ stem cell factor อย่างละ 10 ng/uL โดยเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์ประมาณ  $2.5 \times 10^5$  เซลล์ มา reconstitute ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (serum-free media) ปริมาตร 30-50 uL มาฉีดเข้าในบริเวณตับ

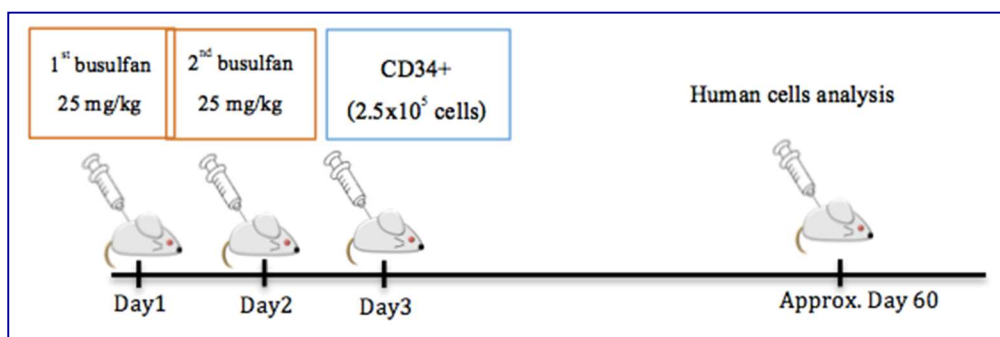
(intrahepatic injection) ดังแสดงในรูปที่ 2 วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของคนในหนูหลังจากที่ฉีด HSCs ไปแล้วเป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 2: การฉีด HSCs เข้าไปบริเวณตับ (Intrahepatic injection) ของลูกหนูเกิดใหม่

## 2.2 การปลูกถ่ายในหนูโตเต็มวัย (engraftment in adult mouse)

การปลูกถ่าย HSCs ในหนูโตเต็มวัยนั้น จากงานวิจัยที่ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ พบว่าจะต้องมีการให้ยาที่มีฤทธิ์ไปทำลายเซลล์หนูในไขกระดูกเพื่อให้ HSCs ของคนสามารถเข้าไปเจริญเติบโตและพัฒนาได้ ในการทดลองนี้จะให้ยา Busulfan 25 mg/kg จำนวน 2 doses ห่างกัน 24 ชั่วโมงโดยฉีดทางช่องท้อง เมื่อฉีด Busulfan ครบ 24 ชั่วโมงแล้วก็จะฉีด HSCs ประมาณ  $2.5 \times 10^5$  เซลล์ที่แยกและเลี้ยงในข้อ 1 ผ่านทางหลอดเลือดดำที่บริเวณหาง (tail vein) หลังจากฉีด HSCs ครบ 8 สัปดาห์แล้ว ก็จะวิเคราะห์ดูปริมาณเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของคนในหนูต่อไป

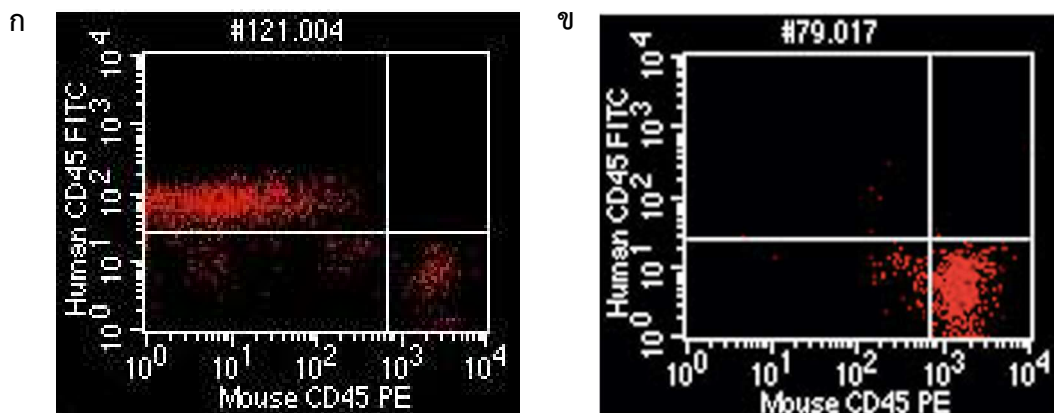


รูป 3 กระบวนการฉีด busulfan และ HSCs ในหนูโตเต็มวัย

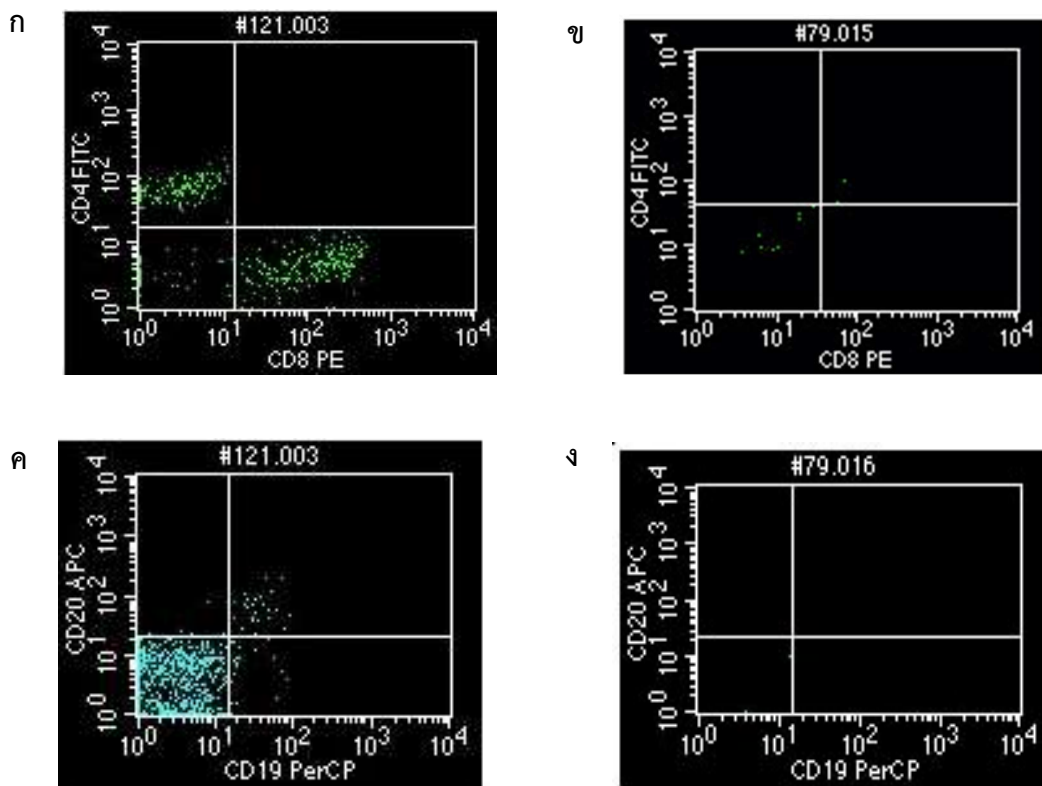
### 3. การวิเคราะห์เซลล์คนในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายHSCs (Human cells engraftment analysis)

เมื่อครบ 8 สัปดาห์หลังจากที่ปลูกถ่าย HSCs ในหนู NSG (newborn หรือ adult) จะทำการเจาะเลือดหนูเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของคน โดยการวัด CD45+ cells ซึ่ง CD45 เป็น marker ซึ่งจะแสดงออกในเซลล์เม็ดขาวทุกชนิดของคน โดยทำการวัดปริมาณเซลล์ในเลือดที่มีการแสดงออก mouse CD45 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออก human CD45+ นอกจากนี้ จะมีการวิเคราะห์เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของคนแต่ละชนิด ได้แก่ T cells, B cells, monocyte และ dendritic cells ในหนูที่มีปริมาณ human CD45+ มากกว่า 30%

ผลการปลูกถ่าย HSCs ในหนูแรกเกิดชุดแรก 9 ตัว พบว่ามีหนูที่สามารถปลูกถ่ายเซลล์คนได้ 67% (6/9) **รูปที่ 4** แสดงอัตราส่วนระหว่างเซลล์คนและเซลล์หนูที่ได้รับการปลูกถ่าย (ก) และไม่ได้ปลูกถ่าย (ข) ส่วน **รูปที่ 5** แสดงปริมาณ T cells และ B cells ในหนูแรกคลอดที่การปลูกถ่ายเซลล์คนสำเร็จ พบว่าหนูที่สามารถปลูกถ่าย HSCs ได้จะสามารถตรวจพบเซลล์ของคนทั้งชนิด CD4+, CD8+ (ก) และ B cells (ข) ส่วนหนูที่ไม่ได้ปลูกถ่ายไม่สามารถตรวจพบทั้ง CD4+, CD8+ (ค) และ B cells (ง)



**รูปที่ 4** ปริมาณเซลล์คนและเซลล์หนูที่ได้รับการปลูกถ่าย (ก) และไม่ได้ปลูกถ่าย (ข)



รูปที่ 5 ปริมาณ T cells (ก) และ B cells (ข) ในหนูแรกคลอดที่ได้รับการปลูกถ่าย HSCs และปริมาณ T cells (ค) และ B cells (ง) ในหนูแรกคลอดที่ไม่ได้รับการปลูกถ่าย HSCs

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากที่ก่อนหน้านี้ประสบปัญหาไม่สามารถ breed หนู BRG ได้ ทำให้ไม่สามารถดำเนินงานวิจัยได้และโครงการล่าช้ากว่ากำหนด จึงได้เปลี่ยน Immunodeficient mouse เป็นสายพันธุ์ NSG ซึ่งเลี้ยงง่าย มีอัตราการให้ลูกสูง และหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสามารถปลูกถ่าย HSCs ในหนูแรกคลอดได้โดยไม่ต้องฉายรังสีและให้อัตราความสำเร็จในการปลูกถ่ายสูง เมื่อเปลี่ยนสายพันธุ์หนูพบว่า มีอัตราการให้ลูกหนูสูง ประมาณ 10 ตัวต่อครอก ทำให้สามารถดำเนินโครงการได้อย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ขณะนี้ได้ปลูกถ่าย HSCs ในหนูแรกคลอดไปแล้วประมาณ 55 ตัว และปลูกถ่ายในหนูโตเต็มวัยประมาณ 20 ตัว ขณะนี้ได้ทยอยวัดปริมาณเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของคนในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายครบ 8 สัปดาห์

ในหนูที่ปลูกถ่ายแล้ว มีจำนวน 9 ตัวที่ได้เจาะเลือดวิเคราะห์อัตราการปลูกถ่าย โดยพบว่า 6 ใน 9 ตัว มี human CD45+ ใน peripheral blood และในหนูบางตัวมี human CD45+ สูงถึงประมาณ 90% และเมื่อทำการวิเคราะห์ human immune cell subsets พบว่า ในหนูที่ปลูกถ่ายเซลล์ได้สำเร็จสามารถตรวจพบ helper T cell, cytotoxic T cell และ B cell ทุกตัว แต่ระดับอาจแตกต่างกันไป ส่วน immune cells ตัวอื่นได้แก่

monocyte และ dendritic cells ยังไม่ได้รับการทดสอบ อย่างไรก็ตามก็ได้ set up protocol เพื่อใช้ในการตรวจวัดเรียบร้อยแล้ว นอกจากนี้ ยังมีแผนที่จะวัดระดับ Total human IgM และ Total human IgG เพื่อตรวจสอบว่า humanized mice สามารถสร้าง human Ig แต่ละประเภทได้หรือไม่ ในปริมาณอย่างน้อยเพียงใด

กล่าวโดยสรุปคือ เมื่อใช้หนูสายพันธุ์ NSG เป็น recipient สามารถสร้าง humanized mice ดังแผนที่ได้วางไว้ มีอัตราการการปลูกถ่ายค่อนข้างสูง มี multi-lineage hematopoiesis โดยเฉพาะอย่างยิ่ง T cells, B cells โดยหนูที่สามารถปลูกถ่ายได้สำเร็จจะนำไปใช้ในการทดสอบวัคซีนต่อไป โดยขณะนี้เรามีวัคซีนที่พัฒนาโดยศูนย์วิจัยวัคซีน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พร้อมทดสอบประสิทธิภาพใน humanized mice ได้แก่ วัคซีนเอดส์ และ วัคซีนไข้เลือดออก

### House Dust mite DNA vaccine

The goal of the present project is the development of an efficient therapeutic vaccine against HDM allergy and based on DNA plasmid expressing a secreted form of the major HDM allergen Der p 2 and delivered *in-vivo* by electroporation.

The project was subdivided into four sections:

- 1) Design of an adjuvant-free animal model of HDM allergy in order to evaluate the DNA therapeutic vaccinations
- 2) Optimization of the DNA therapeutic vaccinations in the established mouse model of HDM allergy at the level of some adjuvants able to activate cytosolic DNA sensors
- 3) To prepare a Virus-like particles based-protein vaccine containing multi-copies of Der p 2 for future heterologous prime boost vaccinations.
- 4) Component-resolved diagnosis of HDM allergy.

#### **1) Adjuvant-free animal model of HDM allergy.**

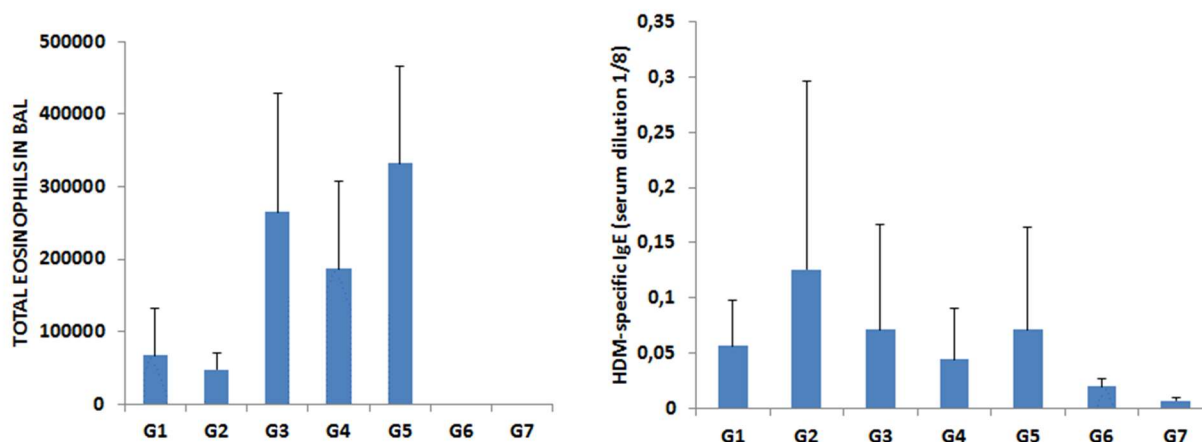
In our previous evaluation of prophylactic DNA vaccinations in mice, we sensitized naïve mice with Der p 2 formulated with a potent Th2 adjuvant (Alum) and challenged intranasally with total HDM allergen extracts. The therapeutic efficacy of our vaccine cannot be tested using the same animal model as the Th2 response induced by the injections of Der p 2/alum is too potent that

the reversion into Th1/Treg biased immunity is too difficult. Consequently, and to be more close to the natural HDM sensitizations (airway sensitizations), groups of naïve Balb/C mice were sensitized with low-LPS content commercial HDM allergen extracts (Greer, USA) through intranasal administrations following five different protocols, in order to set the protocol which induces the highest level of allergic airway inflammation:

| Group (n) | Sensitization |              |              | Challenge    |              |              |
|-----------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|           | Day 1         | Day 2        | Day 3        | Day 17       | Day 18       | Day 19       |
| G1 (5)    | 2µg/40µl      | 2µg/40µl     | 2µg/40µl     | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    |
| G2 (5)    | 20µg/40µl     | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    | 2µg/40µl     | 2µg/40µl     | 2µg/40µl     |
| G3 (5)    | 2µg/40µl      | 2µg/40µl     |              | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    |
| G4 (4)    | 10µg/10µl     |              |              | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    |
| G5 (5)    | 2µg/40µl      |              | 2µg/40µl     | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    | 20µg/40µl    |
| G6 (3)    | PBS           | PBS          | PBS          | 10µg/40µl    | 10µg/40µl    | 10µg/40µl    |
| G7 (2)    | No treatment  | No treatment | No treatment | No treatment | No treatment | No treatment |

Groups 6 (no sensitization but challenge) and 7 (background, naïve animals) were used as negative controls. At the end of the challenge, animals were sacrificed to collect the blood as well as to perform bronchoalveolar lavages to detect the presence of HDM-specific IgE antibodies and the infiltration of inflammatory cells in the airways (mainly eosinophils).

Our results indicated that the protocol performed in group 5 (two sensitizations with 2µg/40µl at two days interval + three challenges with 20µg/40µl) produced the highest cell infiltrates in the airways including the highest amount of eosinophils (Fig.1). The five protocols were shown to induce as well comparable HDM extract-specific IgE, compared with the groups 6 and 7. Consequently, we decided to select the protocol from the group 5 in the future vaccination experiments for the induction of allergy.



**Fig.1.** Total amount of eosinophils from BAL fluids and HDM allergen-specific IgE from sensitized mice using different protocols

## 2) Optimization of therapeutic DNA vaccinations

During the first semester in 2015, the research activities were interrupted because of the unavailability of mice until June 2015. Indeed, the Mahidol animal Facilities were infected by *Pseudomonas aeruginosa*.

In June 2015, the following therapeutic vaccinations were initiated in sensitized mice. In this experiment, Balb/C mice were sensitized with low-LPS content commercial HDM allergen extracts (Greer, USA) through intranasal administrations at days 1 and 3 (2µg/40µl). Animals were vaccinated at days 14 and 24 using protocols shown below, in order to evaluate different adjuvants able to activate cytosolic DNA sensors and prime-boost vaccinations:

- n=7 Allergic control group (NO VACCINE)
- n=5 DNA Der p 2 20 µg (electroporation)
- n=5 DNA Der p 2 20 µg + cGAMP 10 µg (electroporation)
- n=5 DNA Der p 2 20 µg + CpG 10 µg (electroporation)
- n=5 DNA Der p 2 20 µg + cGAMP/CpG 10µg
- n=5 DNA Der p 2 20 µg/cGAMP 10 µg (prime) + Der p 2 5 µg/cGAMP10 µg (boost, intramuscular)
- n=5 DNA Der p 2 20 µg (prime)+Der p 2 5 µg (boost, intramuscular)
- n=2 No sensitization/no vaccine BUT challenge

n=1 Naïve

We decided to combine DNA with such adjuvants as *in-vivo* DNA delivery by electroporations would directly administrate the DNA vaccine into the cytosol, an area rich in DNA sensors which are important for the immunogenicity of DNA vaccines. The cyclic dinucleotide cGAMP is an activator of the cytosolic DNA sensor STING whereas CpG can activate TLR9.

With the exception of one naïve animal, all the mice were subsequently intranasally challenged three times at days 36-38 with the same HDM allergen extracts (20 µg/40 µl). The animals were sacrificed on days 41 and 42 to collect the bronchoalveolar lavage fluids, the spleen as well as the serum. The immunological read-outs (cell infiltrates in BAL, T-cell proliferation for cytokine detection, specific IgG1, IgG2a and IgE) were performed to characterize the Der p 2-specific immune response.

#### Der p 2-specific antibody responses

As shown in Fig.2, the allergic control group developed very low Der p 2-specific IgE if we compared the IgE production with the one measured in naïve mice. This result was quite expected as these animals were sensitized and challenged with HDM extracts which contained few amount of Der p 2. In all the vaccinated groups, the Der p 2 specific IgE production was comparable and weak. No statistically difference was measured.

With the exception of mice vaccinated with DNA Der p 2 alone or adjuvanted with cGAMP (homologous or heterologous prime-boost) in which a significant specific IgG1 production was measured, no specific IgG1 was detected (Fig.2), even after the vaccinations. For the specific IgG2a response, we measured the development of comparable Der p 2-specific IgG2 following the vaccinations with DNA Der p 2 (+/- cGAMP), DNA Der p 2 + CpG, DNA Der p 2 /cGAMP (prime) + recDer p 2 /cGAMP (boost) or unadjuvanted DNA Der p 2 (prime)+unadjuvanted recDer p 2 (boost). Surprisingly, no specific IgG2a was measured for the vaccine DNA Der p 2 + cGAMP/CpG. Following the challenge, the intensity of the IgG2a response was not modified. We could conclude from the data that the DNA adjuvantation with CpG or cGAMP, under our experimental conditions, did not improve the specific IgG production.

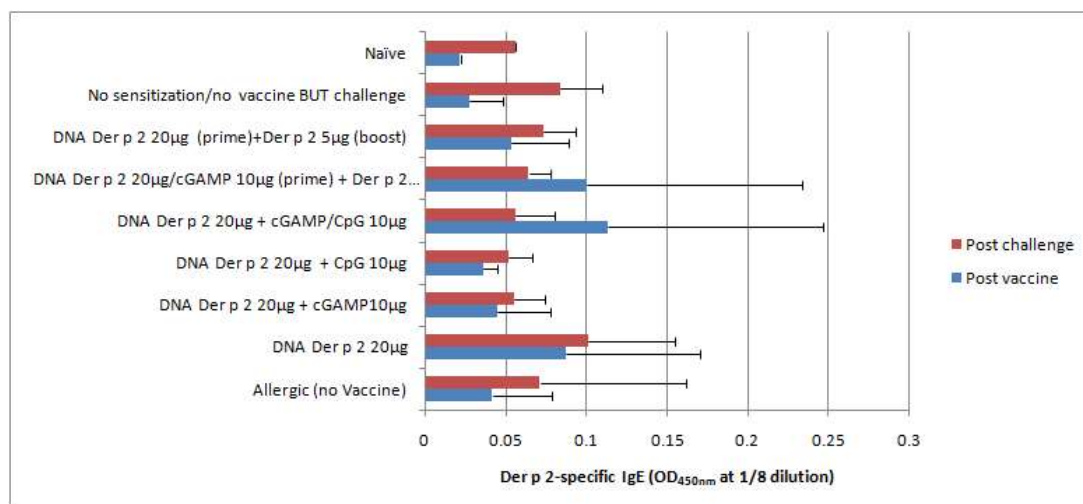
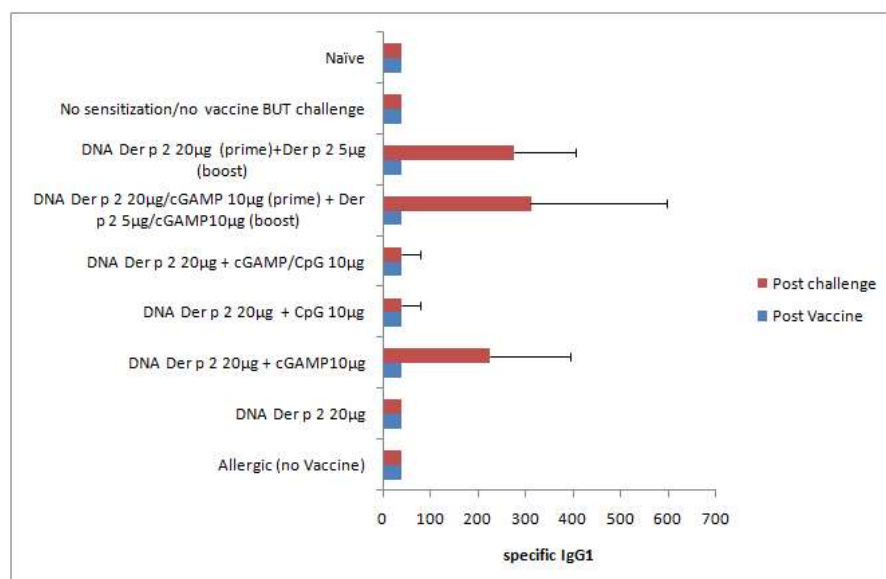
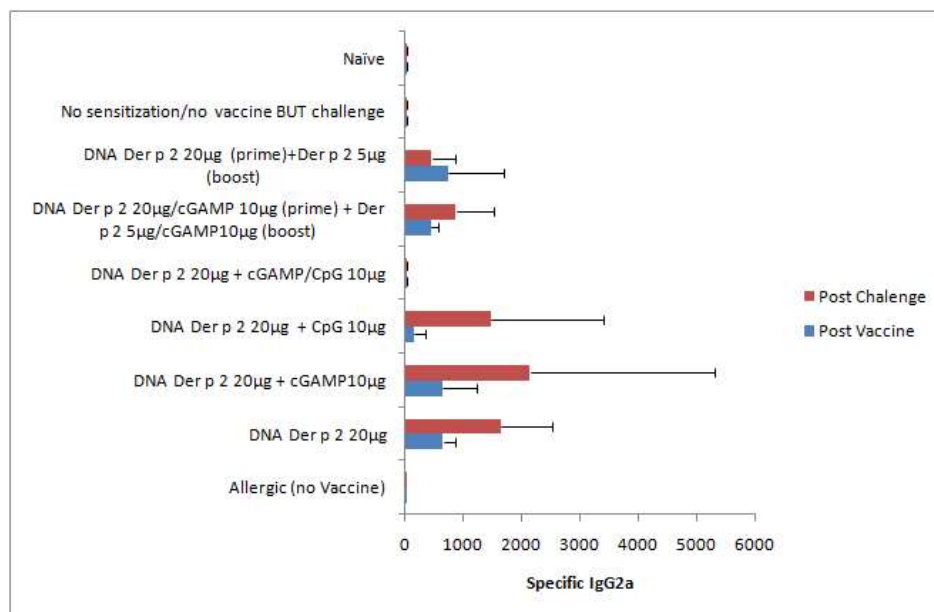


Fig.2. Der p 2 specific IgE detection Post vaccination #2 and after the challenge.

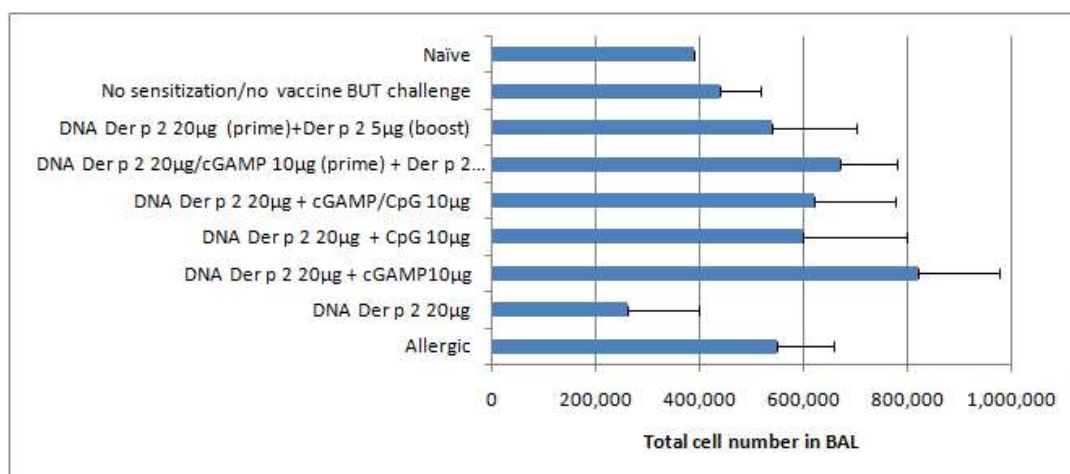




**Fig.3.** Der p 2 specific Ig1 and IgG2a detection Post vaccination #2 and after the challenge.

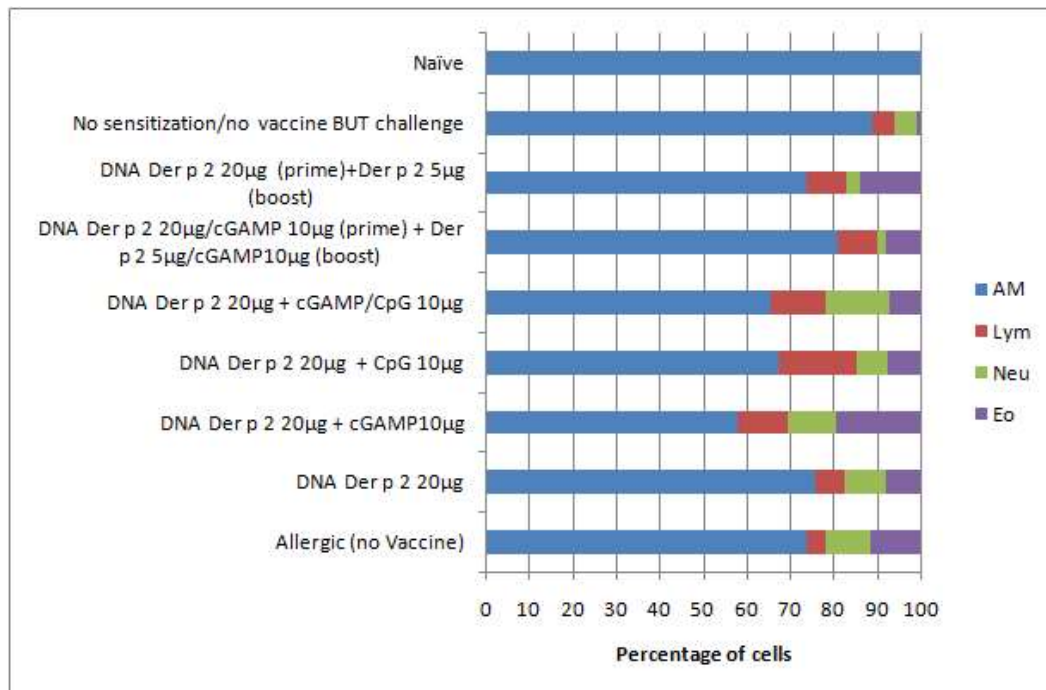
#### Airway inflammation analysis

We first determined the total amount of cells in the bronchoalveolar lavage fluids. As shown in Fig.4, there is no marked difference at the level of this cell amount between groups. We can observe also an abnormal elevated amount of cell infiltrates in naïve mice compared with the allergic group and the vaccinated animals. We noticed also the poor level of airway inflammation in the allergic group as the level of the total cell infiltrates was low.



**Fig.4.** Total cell number in BAL fluids

Following a specific staining of the cells from the BAL fluids, we estimated the percentage of alveolar macrophages (AM), lymphocytes, neutrophils and eosinophils (Fig.5). As expected, only AM was detected in the BAL fluid from naïve mice. In the allergic group, very few eosinophils were detected (around 10%) confirming that such allergic control group did not develop HDM allergy appropriately. Such level of eosinophilia or even higher percentage was measured in any vaccinated groups.



**Fig.5.** Percentage of inflammatory cells in BAL fluid

From these present data, we can consider that, using the same experimental protocol to trigger allergy with the same batches of reagents (See Fig.1), the development of HDM allergic response was very weak. Consequently, it is quite impossible to estimate the vaccine efficacy of our different DNA vaccine formulations in the present experiment. One explanation could be that such animals were not healthy as these mice were housed at Mahidol animal facilities previously contaminated with *P. aeruginosa*. It must be pointed also that an abstract issued at the World Allergy Congress (WAC 2015, Seoul, October 2015, 9196 Cyclic Gamp-AMP(cGAMP) Induces Allergic Inflammation, Ozasa et al.) could indicate that cGAMP could trigger Th2 response using a HDM

allergy model, suggesting that cGAMP would not be appropriate to formulate vaccines against this form of allergy

Before initiating new DNA vaccine experiments, we decided to reconstruct the recombinant DNA vaccine under GLP, using brand new reagents fully documented at the level of expiry date, catalog/batch number. Indeed, such GLP grade must be reached in order to validate any experimental results from *in-vivo* vaccinations using the plasmid pHIS-Der p 2 in preclinical studies. Such conditions are mandatory for future clinical trials. Consequently, the plasmid reconstruction was also fully documented into a lab book with labeled pages. The complete sequencing of the pHIS-Der p 2 confirmed the authenticity of the recombinant plasmid. The plasmid will be very soon used in transfection assays to demonstrate its capacity to express but also to secrete Der p 2. Once we will confirm Der p 2 production, we will initiate new therapeutic DNA vaccinations.

### **3) VLP-Der p 2 production**

In order to produce a virus-like particle (VLP) exposing multicopies of the major HDM allergen Der p 2, we used a recent technology called SpyTag/SpyCatcher (collaboration with Prof. Adam Sander, Copenhagen University) in conjugation with the use of the bacteriophage AP205 capsid protein. This capsid protein, when expressed in *E.coli*, can self-assemble to produce a VLP. A fusion protein between this coat protein and a split unit of *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding protein FbaB (SpyCatcher) can always self assemble into VLP in *E.coli*. If any antigen is expressed in fusion with the second split unit form FbaB (a short peptide tag called SpyTag), the conjugation of these two proteins (SpyCatcher-AP205 coat on one hand, SpyTag-Antigen on the other hand) induces the spontaneous formation of an isopeptide bond between a Lys and an Asp present in two split units of FbaB. This technology offers a simple way to conjugate antigen to VLPs. The major HDM allergen Der p 2 was expressed in the Shuffle bacteria strain as SpyTag-Der p 2-(His)<sub>6</sub>. Following IPTG induction, the soluble Der p 2 protein was purified onto immobilized Ni<sup>2+</sup> column. The recombinant protein was subsequently conjugated to the SpyCatcher-AP205 coat protein to produce such VLP-Der p 2. The conjugation was estimated onto SDS-PAGE. Such VLP-Der p 2 will be produced in a larger scale to initiate *in-vivo* experiments using heterologous prime boost protocol (DNA-Der p 2 prime, VLP-Der p 2 boost).

#### 4) Component-resolved diagnosis of HDM allergy.

We evaluated the IgE reactivity to recDer p 2, recDer p 13 and recDer p 23 in a cohort of HDM allergic patients (ImmunoCap positive, N = 222) from the King Chulalongkorn Memorial, Children, Ramathibodi and Phramongkutklao hospitals. To our knowledge, it is the first component-resolved diagnosis of the HDM allergy performed in Thailand. Fifty four percent of the HDM-positive sera (n=119) showed specific IgE reactivity to recDer p 23 whereas IgE reactivity to recDer p 2 was detected in 67% of the same mite-allergic individuals (n=148), confirming that Der p 23 is a major allergen. A significant positive correlation between OD values to Der p 23 and to Der p 2 was evidenced although several patients were monosensitized to one of these two allergens (Pearson's correlation,  $P < 0.0001$ ). We further evaluated the influence of recDer p 23 oligosaccharides on its IgE binding properties. By comparing the OD values of Der p 23 positive sera obtained from the ELISA against recDer p 23 with deglycosylated recDer p 23, we confirmed that the glycan structure of recDer p 23 did not impact the IgE binding. Using Fifteen out of 222 patients displayed specific IgE to rDer p 13 (7%). Our data therefore confirm that Der p 13 is classifiable as a minor allergen in that it is a target of IgE antibody in a low proportion of the HDM-allergic population.

ภาคผนวก (Publications): 12 เรื่องดังแนบ

#### การเชื่อมโยงกับต่างประเทศ

1. **Dr.Nicolas Collins**, Vaccine Formulation Laboratory (VFL), University of Lausanne (UNIL), Lausanne, Switzerland โดยได้ส่ง adjuvants 3 ชนิด มาให้ทดลองใช้
2. **Adrian McDermott**, Chief Immunology Core Laboratory, Vaccine Research Center, NIAID, NIH, USA มีความเชี่ยวชาญด้าน B cells
3. **Carl R Alving**, Chief, Laboratory of Adjuvant & Antigen Research, US Military HIV Research Program, Walter Reed Army Institute of Research, USA มีความเชี่ยวชาญด้าน adjuvants

4. **Georges Thiry**, Vaccine Development Consultant, Belgium มีความเชี่ยวชาญด้านการผลิตวัคซีนในระดับ GMP (Good Manufacturing Practice)
5. **Jerome Kim**, Director, International Vaccine Institute (IVI), Korea มีความเชี่ยวชาญด้านการผลิตวัคซีนโดยเฉพาะวัคซีนที่เป็นความต้องการของประเทศกำลังพัฒนา
6. **Richard M Schwartz**, Chief, Vaccine Production Program, Vaccine Research Center, NIAID, NIH, USA มีความเชี่ยวชาญด้าน plasmid DNA vaccines
7. **Christophe Barnier-Quer**, Vaccine Formulation Laboratory, Department of Biochemistry, University of Lausanne มีความเชี่ยวชาญด้าน adjuvants

#### การได้รับทุนวิจัยจากต่างประเทศ

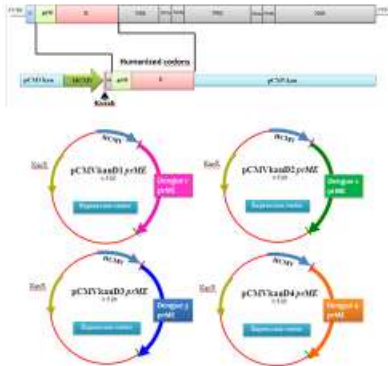
1. ทุน Clinical Trial Unit, AIDS Clinical Trial Group (ACTG), NIAIDs, NIH, USA ในฐานะเป็น co-PI ร่วมกับ ศ.นพ.สุวัฒน์ จริยาเลิศศักดิ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นโครงการวิจัยทางคลินิกด้าน โรคเอดส์ วัณโรคและ โรคไวรัสตับอักเสบ
2. ทุนขยายเวลาเพิ่มของ สวทช. (สิ้นสุดวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2560) โครงการทดสอบ tetravalent dengue vaccine LAV/DNA prime/boost ในหนูและลิงเป็นเงิน 22,282,400 บาท

รางวัลที่ได้รับ: ศ. นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม ได้รับรางวัล สมเด็จพระวันรัตของแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย

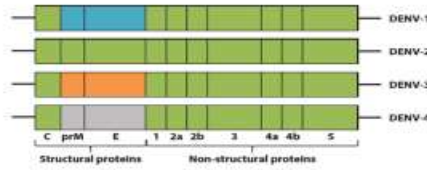
ปี 2558

# Dengue

## Dengue Prime-boost Immunization Strategy



**Tetraivalent DNA Vaccine (TDNA)**



**Tetraivalent Live Attenuated Vaccine (TLAV)**



## Dengue Prime-boost Immunization Strategy : Preclinical Study

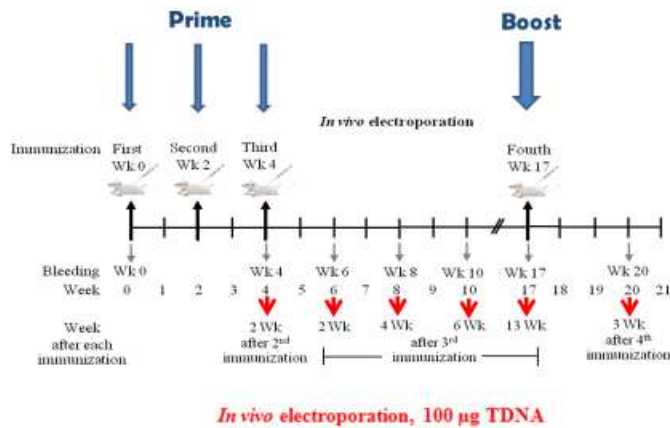


Vaccine immunogenicity



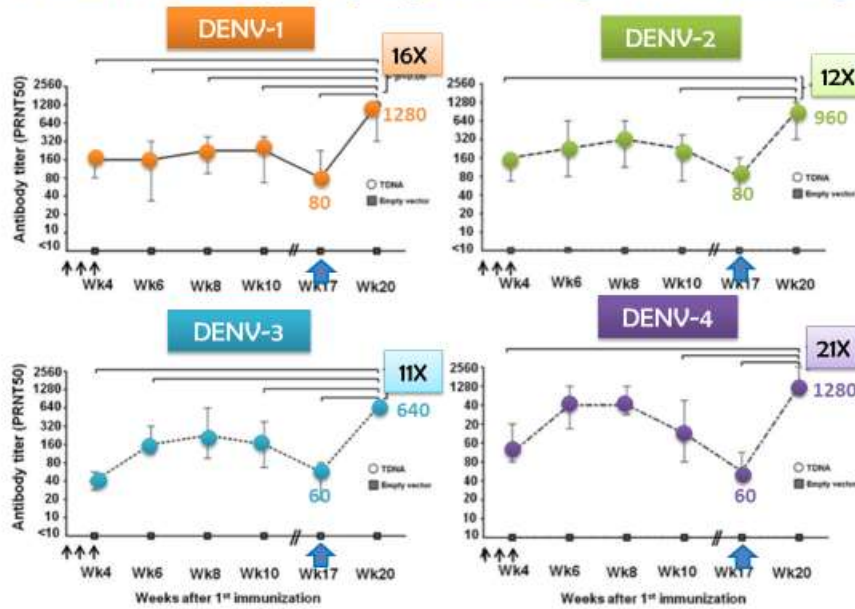
Vaccine immunogenicity  
and its protective efficacy

*Macaca fascicularis*  
(Cynomolgous macaque)



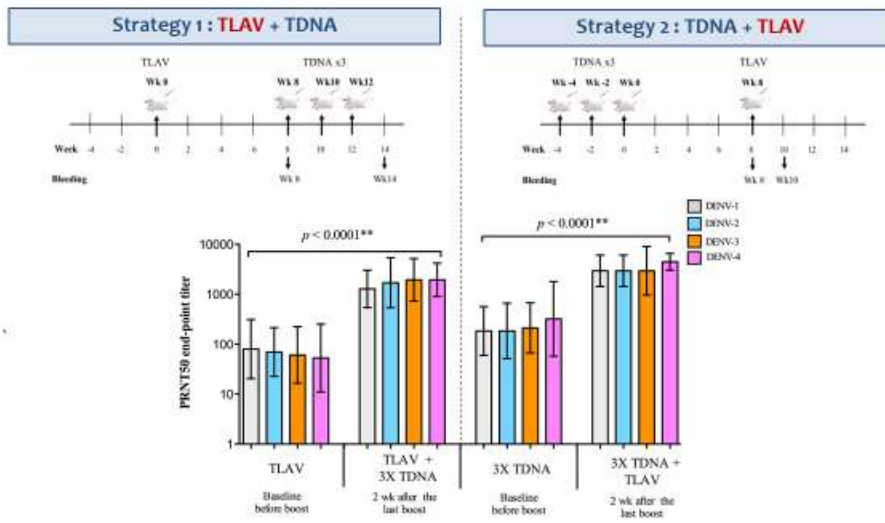
Promptchara E. PlosOne 2014; 9: e92643.

### Kinetics of NAb response pre/post homologous TDNA boosting



TDNA can be used as a booster vaccine.

Promptchara E. PlosOne 2014; 9: e92643.



Both TLAV and TDNA vaccine beside being a booster, can also be a good primer vaccine.



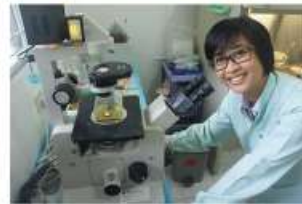
## Prime-boost Study in Non-human Primate



*Macaca fascicularis*  
(Cynomolgus macaque)



Assoc. Prof. Joko Pamungkas



Dr. Fitriya Dewi



## Dengue Vaccines Prime-Boost Study in NHPs

### Exp 1 : DENV-2 Virus Challenge

| Group                 | Prime    | Boost            | No. of NHPs |
|-----------------------|----------|------------------|-------------|
| 1<br>Heterologous     | TLAV     | TDNA x 3         | 5           |
| 2<br>Homologous       | TDNA x 3 | TDNA x 3         | 5           |
| 3<br>Negative Control | NSS      | Empty vector x 3 | 2           |

#### Route of immunization

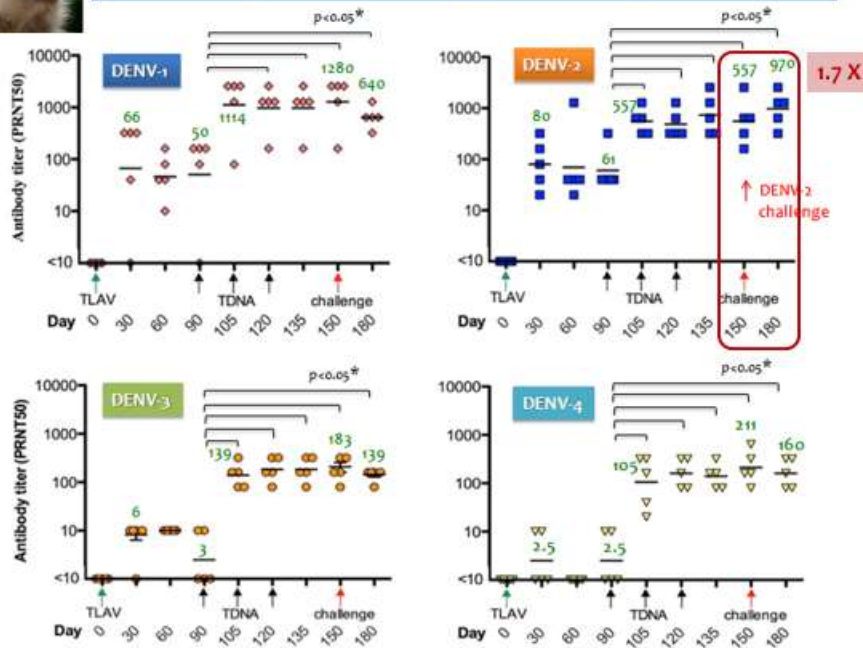
- TLAVs : S.C.
- TDNAs : I.D. (in vivo) electroporation  
total dose 1 mg (0.25 mg/each serotype)



DENV-2 virus  
challenge

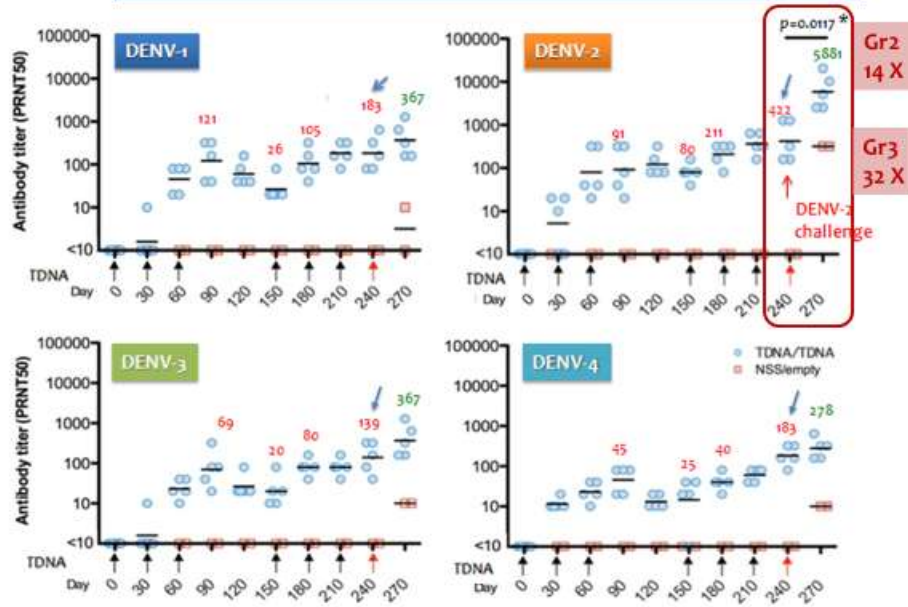


#### Group 1 : Heterologous TLAV / TDNA





## Group 2 : Homologous TDNA / TDNA Group 3 : Negative Control



### Plasma Dengue Viremia after **DENV-2** challenge by q-PCR

| Group                          | NHP               | RNA copies/mL (FFU equivalent/ml) on designated day |                    |                  |                  |                 |                  |                  |                  |               |               |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|---------------|---------------|
|                                |                   | 1                                                   | 2                  | 3                | 4                | 5               | 6                | 7                | 8                | 9             | 10            |
| 1<br>Heterologous<br>TLAV/TDNA | 1/1<br>(J020511A) | U                                                   | U                  | U                | U                | U               | U                | U                | U                | U             | U             |
|                                | 1/2<br>(J070311B) | U                                                   | U                  | U                | U                | U               | U                | U                | U                | U             | U             |
|                                | 1/3<br>(J050111B) | U                                                   | U                  | U                | U                | U               | U                | U                | U                | U             | U             |
|                                | 1/4<br>(J100211A) | U                                                   | U                  | U                | U                | U               | U                | U                | U                | U             | U             |
|                                | 1/5<br>(J100211B) | U                                                   | U                  | U                | U                | U               | U                | U                | U                | U             | U             |
|                                | 1/6<br>(J100211C) | U                                                   | U                  | U                | U                | U               | U                | U                | U                | U             | U             |
| 2<br>Homologous<br>TDNA/TDNA   | 2/1<br>(J070110A) | U                                                   | U                  | U                | U                | U               | U                | U                | U                | U             | U             |
|                                | 2/2<br>(J200110F) | U                                                   | U                  | U                | U                | 380<br>(0.02)   | U                | U                | U                | U             | U             |
|                                | 2/3<br>(J090110A) | 4,495<br>(0.22)                                     | 31,816<br>(1.58)   | 10,802<br>(0.54) | 12,630<br>(0.63) | 4,990<br>(0.25) | 840<br>(0.04)    | U                | U                | 836<br>(0.04) | U             |
|                                | 2/4<br>(J250110B) | U                                                   | U                  | U                | U                | 2,610<br>(0.13) | 990<br>(0.05)    | 420<br>(0.02)    | U                | U             | U             |
|                                | 2/5<br>(J240110A) | U                                                   | U                  | U                | U                | U               | U                | U                | U                | U             | U             |
| 3<br>Control                   | 3/1<br>(J260310A) | 1,529<br>(0.08)                                     | 283,387<br>(14.09) | 95,256<br>(4.74) | 2,377<br>(0.12)  | 8,185<br>(0.41) | 14,163<br>(0.70) | 7,277<br>(0.36)  | 3,029<br>(0.15)  | U             | U             |
|                                | 3/2<br>(J090110D) | 117,704<br>(5.85)                                   | 217,471<br>(10.81) | 56,754<br>(2.82) | 3,242<br>(0.16)  | 6,770<br>(0.34) | 21,047<br>(1.05) | 21,694<br>(1.08) | 15,118<br>(0.75) | U             | 240<br>(0.01) |

## Individual PRNT50 titers and viremia (Pre & Post challenge)

| Group/<br>Monkey No.                   | DENV-2 PRNT50<br>Pre- challenge | DENV-2 PRNT50<br>Post- challenge | Folds change | Viremia | Defined<br>protection |
|----------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|---------|-----------------------|
| <b>Group 1</b><br><b>TLAV/TDNA</b>     |                                 |                                  |              |         |                       |
| No. 1/1                                | 2560                            | 2560                             | 1X           | No      | Yes                   |
| No. 1/2                                | 640                             | 1280                             | 2X           | No      | Yes                   |
| No. 1/3                                | 160                             | 320                              | 2X           | No      | Yes                   |
| No. 1/4                                | 640                             | 1280                             | 2X           | No      | Yes                   |
| No. 1/5                                | 320                             | 640                              | 2X           | No      | Yes                   |
|                                        | GMT = 1280                      | GMT = 2560                       |              |         |                       |
| <b>Group 2</b><br><b>TDNA/TDNA</b>     |                                 |                                  |              |         |                       |
| No. 2/1                                | 1280                            | 1280                             | 1X           | Yes     | Yes                   |
| No. 2/2                                | 320                             | 5120                             | 16X          | Yes     | No                    |
| No. 2/3                                | 160                             | 20480                            | 128X         | Yes     | No                    |
| No. 2/4                                | 160                             | 2560                             | 16X          | Yes     | No                    |
| No. 2/5                                | 1280                            | 10240                            | 8X           | No      | No                    |
|                                        | GMT = 422                       | GMT = 5881                       | 13.9X        |         |                       |
| <b>Group 3</b><br><b>Negative Ctrl</b> |                                 |                                  |              |         |                       |
| No. 3/1                                | <10                             | 320                              | >32          | Yes     | No                    |
| No. 3/2                                | <10                             | 320                              | >32          | Yes     | No                    |

### Score of Solid Protection

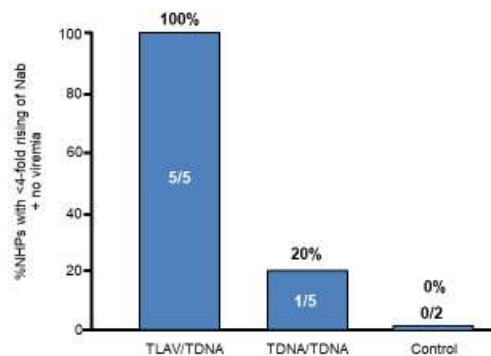
- Absence of viremia
- No anamnestic Ab response (>4X)

Halstead SB, Vaccine 2013, 4501-7.



## Percentage of NHPs were protected against DENV-2 infection

(indicated by solid protection criteria)

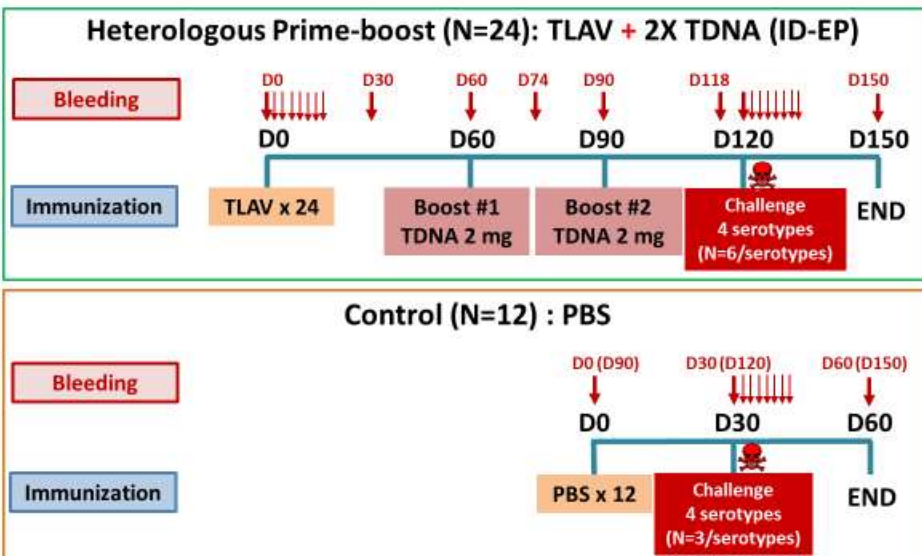


Heterologous TLAV-prime/TDNA-boost could induce a sterilizing immunity.

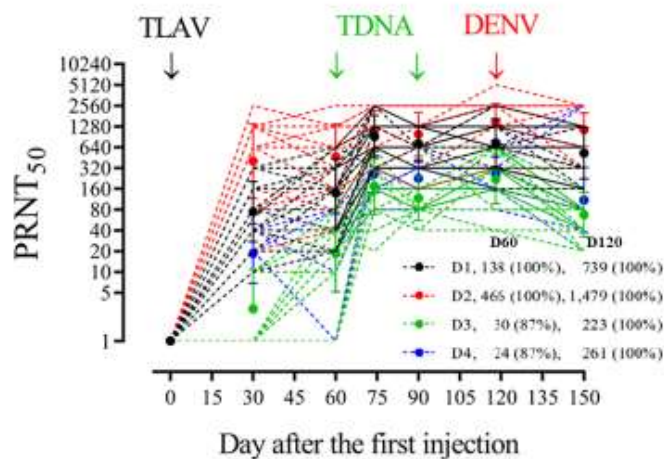


## Dengue Heterologous Prime-Boost Study in NHPs

### Exp 2 : Challenge virus against all serotypes



## NtAb Response against all 4 serotypes in the Heterologous TLAV/TDNA NHPs (N=24)



TLAV prime can induce the NtAb against D1, D2 in all animals but not only 87% in D3 and D4. The level of NtAb against D3 and D4 are also very low.

Boosted with TDNA, the increased NtAb against 4 serotypes can be observed in all animals with the highest titer against D2.



## DENV-2 NtAb Response in the Heterologus TLAV/TDNA (N=6) vs Control (N=3)

TLAV → TDNA → DENV-2 03-0420

**DENV-2 challenge**

### Common viremia evidences after each dengue serotype challenge

#### Plaque (Infectious) assay

- All vaccinated NHPs were protected from detectable viremia
- Naïve NHPs had detectable viremia for 2-8 days post-challenge

#### RQ-PCR

- In vaccinated NHPs, viremia onset was delayed and/or the duration was shortened relative to naïve control

### Common NtAb evidences after each dengue serotype challenge

#### Control NHPs:

- The challenge virus induced the highest NtAb titer against the homologous serotype.
- Cross-reactive, heterotypic Abs were elicited in DENV-1 and DENV-2 challenge groups.

#### Vaccinated NHPs:

- No anamnestic Ab response (GMT) was detected against all 4 serotypes (in both homotypic and heterotypic virus).

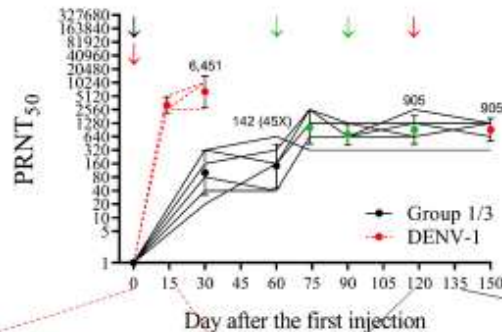
Plaque assay  
RQ-PCR



## DENV-1 NtAb Response in the Heterologus TLAV/TDNA (N=6) vs Control (N=3)

TLAV → TDNA → DENV-1 03-0398

**DENV-1 challenge**



viremia : 2/6  
4-fold anamnestic Ab : 0/6

| Gr | Monkey No. | Monkey code | Challenge virus  | Viral load in flu/ml or RNA copies/ml * |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|------------|-------------|------------------|-----------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|    |            |             |                  | 0-00                                    | 0-02 | 0-04 | 0-06 | 0-08 | 0-10 | 0-12 | 0-14 | 0-16 | 0-18 |
| B  | 8/1        | 030101      | DENV-1 (29-0398) | U                                       | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    |
|    | 8/2        | 030102      |                  | U                                       | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    |
|    | 8/3        | 030103      |                  | U                                       | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    |
|    | 8/4        | 030104      |                  | U                                       | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    |
| B  | 8/1        | 030101      | DENV-1 (29-0398) | U                                       | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    |
|    | 8/2        | 030102      |                  | U                                       | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    |
|    | 8/3        | 030103      |                  | U                                       | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    |
|    | 8/4        | 030104      |                  | U                                       | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    | U    |

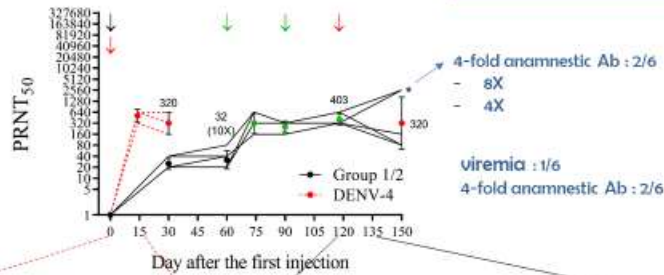
| Gr | Monkey No. | Monkey code | Challenge virus  | Viral load in flu/ml or RNA copies/ml * |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----|------------|-------------|------------------|-----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    |            |             |                  | 0-120                                   | 0-122 | 0-124 | 0-126 | 0-128 | 0-130 | 0-132 | 0-134 | 0-136 | 0-138 |
| B  | 8/1        | 030101      | DENV-1 (29-0398) | U                                       | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8/2        | 030102      |                  | U                                       | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8/3        | 030103      |                  | U                                       | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8/4        | 030104      |                  | U                                       | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
| B  | 8/1        | 030101      | DENV-1 (29-0398) | U                                       | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8/2        | 030102      |                  | U                                       | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8/3        | 030103      |                  | U                                       | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8/4        | 030104      |                  | U                                       | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |



## DENV-4 NtAb Response in the Heterologus TLAV/TDNA (N=6) vs Control (N=3)

TLAV → TDNA → DENV-4 2-0201-5

**DENV-4 challenge**



| Gr | Monkey No. | Challenge date | Virus             | Viral load in flu/ml or RNA copies/ml (flu equivalent/ml) |        |         |       |       |      |      |  |
|----|------------|----------------|-------------------|-----------------------------------------------------------|--------|---------|-------|-------|------|------|--|
|    |            |                |                   | D 30                                                      | D 32   | D 34    | D 36  | D 40  | D 42 | D 44 |  |
| I  | 8104       | 080818         | DENV-4 (2-0201-5) | U                                                         | U      | U       | U     | U     | U    | U    |  |
|    | 8105       | 100918         |                   | U                                                         | U      | U       | U     | U     | U    | U    |  |
|    | 8106       | 101018         |                   | U                                                         | U      | U       | U     | U     | U    | U    |  |
|    | 8107       | 101118         |                   | U                                                         | U      | U       | U     | U     | U    | U    |  |
| II | 8108       | 080818         | DENV-4 (2-0201-5) | U                                                         | 11,803 | 171,000 | 1,010 | U     | U    | U    |  |
|    | 8109       | 100918         |                   | U                                                         | 11,803 | 6,980   | 5,340 | 1,180 | U    | U    |  |
|    | 8110       | 101018         |                   | U                                                         | 11,803 | 6,980   | 5,340 | 1,180 | U    | U    |  |
|    | 8111       | 101118         |                   | U                                                         | 11,803 | 6,980   | 5,340 | 1,180 | U    | U    |  |

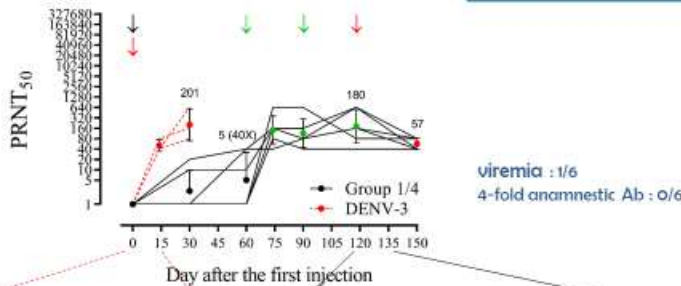
| Gr | Monkey No. | Challenge date | Virus             | Viral load in flu/ml or RNA copies/ml (flu equivalent/ml) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----|------------|----------------|-------------------|-----------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    |            |                |                   | D 120                                                     | D 122 | D 124 | D 126 | D 128 | D 130 | D 132 | D 134 | D 136 | D 138 | D 140 |
| I  | 8112       | 080818         | DENV-4 (2-0201-5) | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8113       | 100918         |                   | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8114       | 101018         |                   | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8115       | 101118         |                   | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
| II | 8116       | 080818         | DENV-4 (2-0201-5) | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8117       | 100918         |                   | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8118       | 101018         |                   | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8119       | 101118         |                   | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |



## DENV-3 NtAb Response in the Heterologus TLAV/TDNA (N=6) vs Control (N=3)

TLAV → TDNA → DENV-3 C06/129

**DENV-3 challenge**

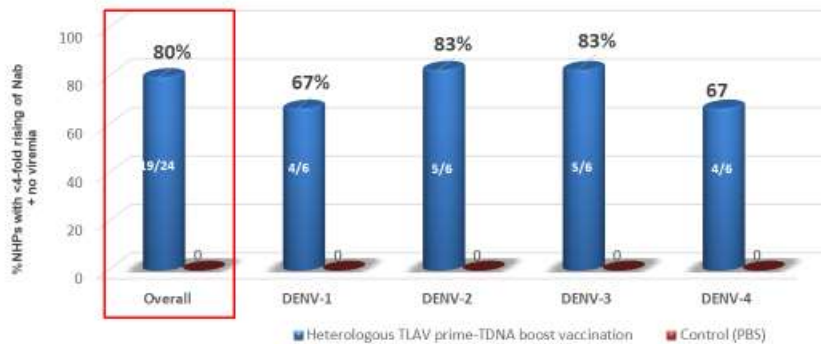


| Gr | Monkey No. | Challenge date | Virus            | Viral load in flu/ml or RNA copies/ml (flu equivalent/ml) |      |      |      |      |      |      |  |
|----|------------|----------------|------------------|-----------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|--|
|    |            |                |                  | D 30                                                      | D 32 | D 34 | D 36 | D 40 | D 42 | D 44 |  |
| I  | 8120       | 080818         | DENV-3 (C06/129) | U                                                         | U    | U    | U    | U    | U    | U    |  |
|    | 8121       | 100918         |                  | U                                                         | U    | U    | U    | U    | U    | U    |  |
|    | 8122       | 101018         |                  | U                                                         | U    | U    | U    | U    | U    | U    |  |
|    | 8123       | 101118         |                  | U                                                         | U    | U    | U    | U    | U    | U    |  |
| II | 8124       | 080818         | DENV-3 (C06/129) | U                                                         | U    | U    | U    | U    | U    | U    |  |
|    | 8125       | 100918         |                  | U                                                         | U    | U    | U    | U    | U    | U    |  |
|    | 8126       | 101018         |                  | U                                                         | U    | U    | U    | U    | U    | U    |  |
|    | 8127       | 101118         |                  | U                                                         | U    | U    | U    | U    | U    | U    |  |

| Gr | Monkey No. | Challenge date | Virus            | Viral load in flu/ml or RNA copies/ml (flu equivalent/ml) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----|------------|----------------|------------------|-----------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    |            |                |                  | D 120                                                     | D 122 | D 124 | D 126 | D 128 | D 130 | D 132 | D 134 | D 136 | D 138 | D 140 |
| I  | 8128       | 080818         | DENV-3 (C06/129) | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8129       | 100918         |                  | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8130       | 101018         |                  | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8131       | 101118         |                  | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
| II | 8132       | 080818         | DENV-3 (C06/129) | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8133       | 100918         |                  | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8134       | 101018         |                  | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |
|    | 8135       | 101118         |                  | U                                                         | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     | U     |

## Percentage of Vaccinated VS Non-vaccinated NHPs that were protected against all 4 serotypes

(indicated by solid protection criteria)



Heterologous TLAV-prime/TDNA-boost vaccination provided

- 80% sterilizing immunity (19/24)
- 20% partially protection (5/24: no anamnestic Ab, viral RNA detected by q-PCR)

## Summary

- **In mice:** Prime/boost strategy either by TLAV/TDNA or TDNA/TLAV showed superior to TLAV or TDNA alone in inducing NtAbs.
- **In a DENV-2 challenged NHP study,** a complete protection was observed in heterologous TLAV-prime/TDNA-boost; whereas homologous TDNA-prime/TDNA-boost showed only partial protection.
- **In all 4 serotype challenged NHP study,** the heterologous TLAV-prime/TDNA-boost showed 80% overall efficacy.
- Our heterologous prime-boost strategy is an interesting approach to induce solid immunity or at least to reduce viral load after natural infection, avoiding severe dengue.
- Identification of the critical correlate of protection for our TLAV-prime/TDNA-boost lays the groundwork for further development of a tetravalent dengue vaccine.

## COVID-19



# Covid19 mRNA Vaccines

Developing at Pandemic Speed

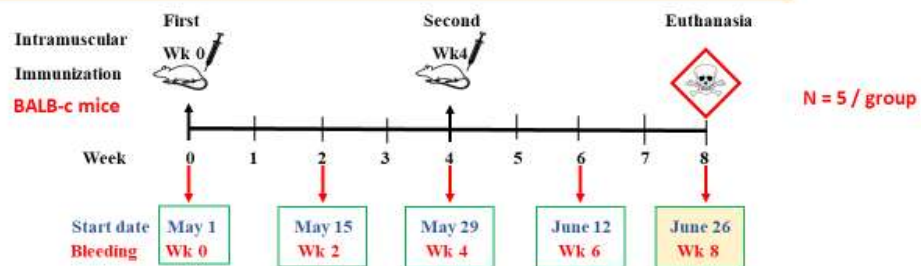


**Kiat Ruxrungtham**  
Professor of Medicine,  
Chula Vaccine Research Center,  
Faculty of Medicine  
Chulalongkorn University;

In collaboration with **Professor Drew Weissman, U. of Pennsylvania, USA.**



### SARS-CoV-2 mRNA : Mice Immunization Plan



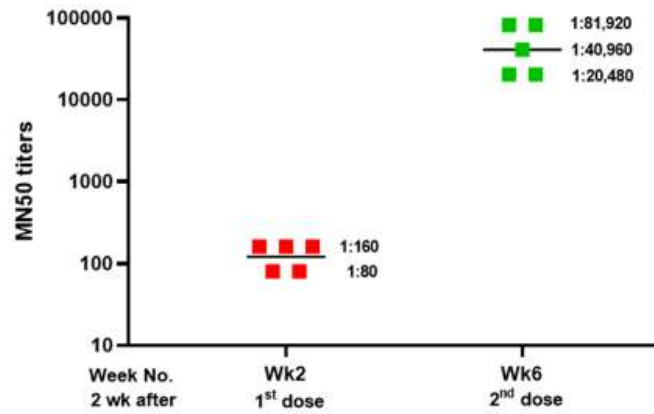
| Group | Details            |
|-------|--------------------|
| 1     | PBS                |
| 2     | 30 ug mRNA-S1/LNP1 |
| 3     | 30 ug mRNA-S2/LNP1 |
| 4     | 30 ug mRNA-S/LNP1  |

Prelim data  
sVNT : > 1: 20,000

Pending  
- T cell study (ELISPOT)  
- Binding Ab (ELISA)  
- Micro NT

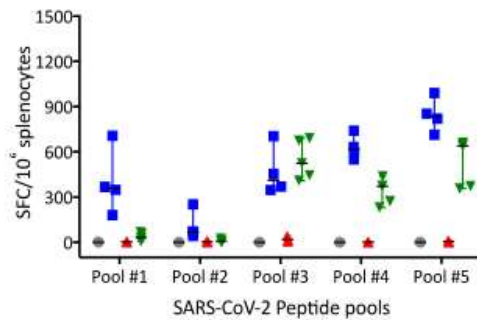
## mRNA-S vaccine results in mice 1 dose VS 2 doses

### Micro NT

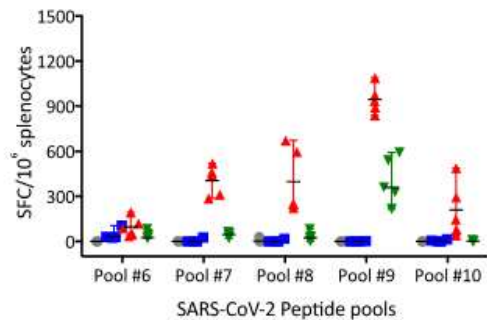


## mRNA vaccine Mouse IFN- $\gamma$ ELISPOT results

### S1

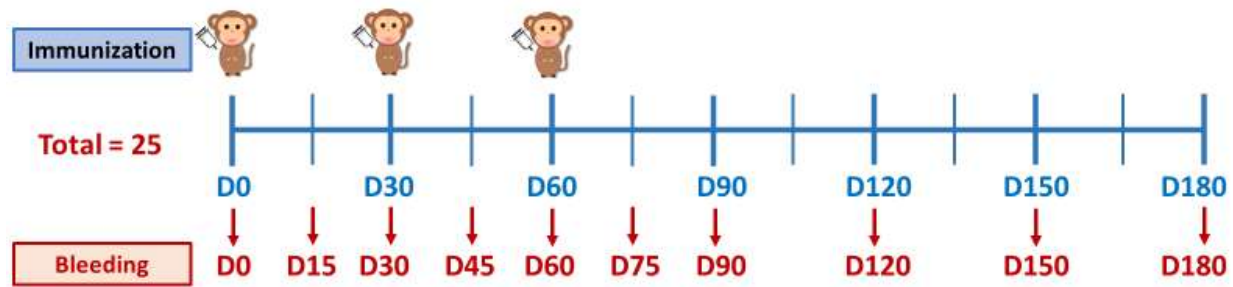


### S2



- PBS
- mRNA-S1
- ▲ mRNA-S2
- ▼ mRNA-S

## mRNA vaccine in monkeys



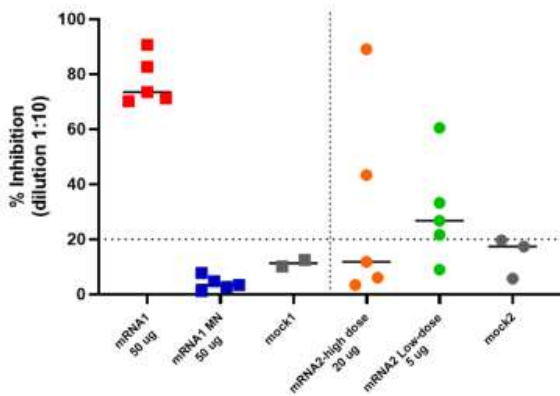
| Group | Vaccine                 | Route | Number of NHPs |
|-------|-------------------------|-------|----------------|
| 1     | 50 ug mRNA1             | IM    | 5              |
| 2     | 50 ug mRNA1-microneedle | MN    | 5              |
| 3     | 20 ug mRNA2             | IM    | 5              |
| 4     | 5 ug mRNA2              | IM    | 5              |
| 5     | mock1                   | IM    | 2              |
| 6     | mock2                   | IM    | 3              |

5

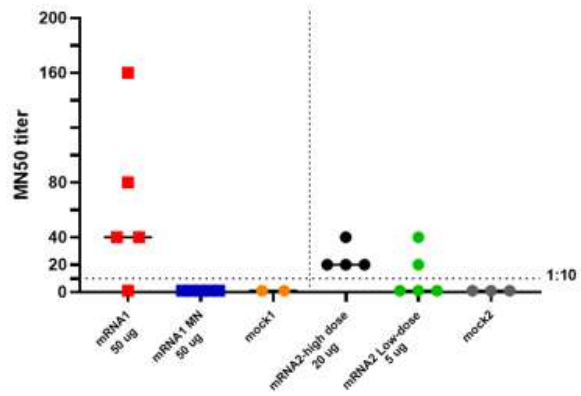


## mRNA vaccine results in monkeys : Day 15

### sVNT results

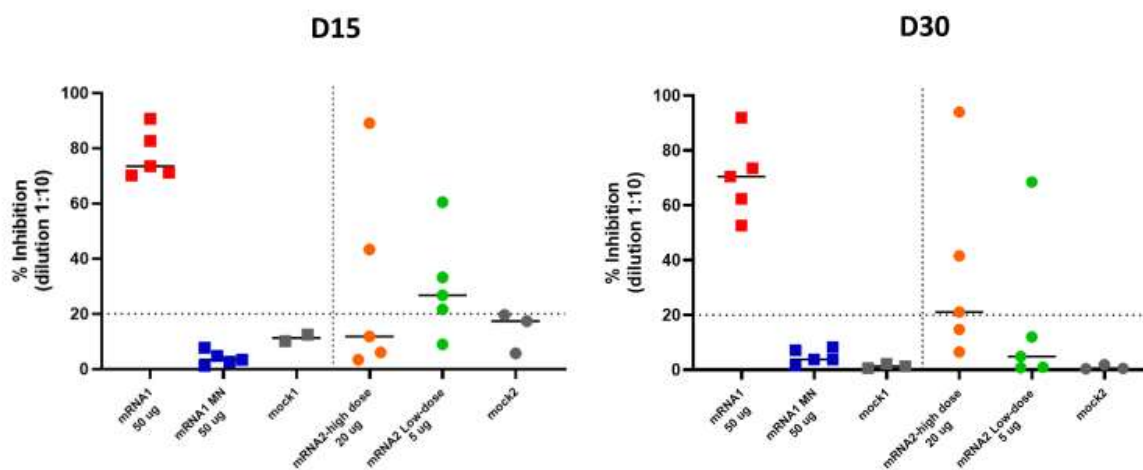


### Micro NT results



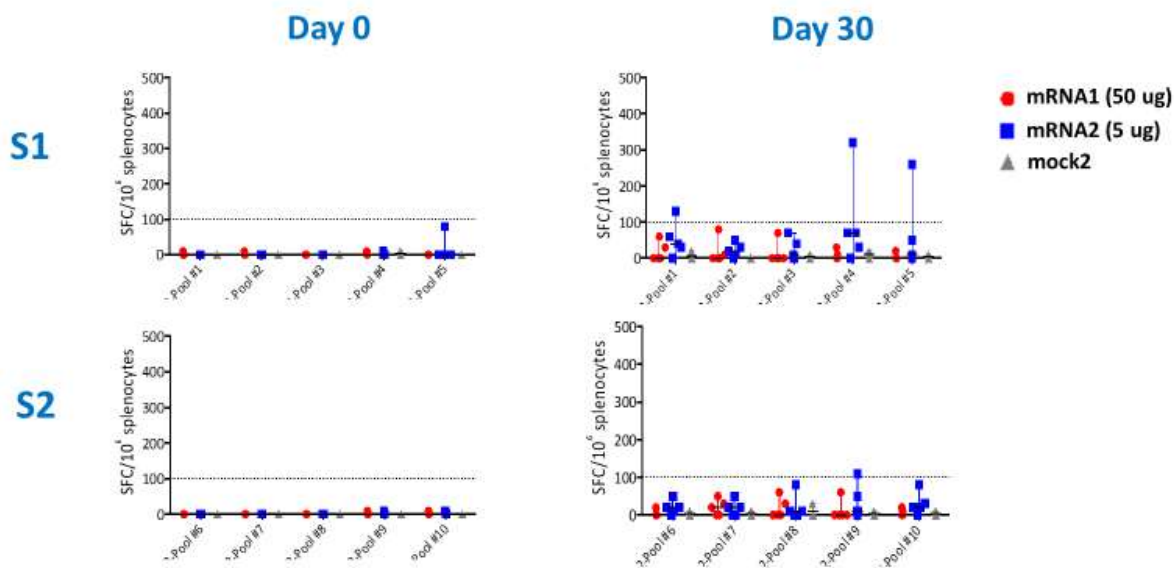
## mRNA vaccine results in monkeys

### sVNT results



## mRNA vaccine results in monkeys : T cell study

### IFN- $\gamma$ ELISPOT Results



## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้า ศ.นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม และคณะผู้วิจัยทั้งหมด ขอกราบขอบพระคุณ สำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ทำให้การสร้างทีมงานและงานวิจัยเป็นไปได้อย่างดีและมีประสิทธิภาพ ตลอดจนขอกราบขอบพระคุณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แหล่งทุนวิจัยอื่นๆ ที่มีส่วนสนับสนุนในโครงการบางโครงการ และโครงสร้างการวิจัยของเครือข่ายการวิจัยให้สามารถทำการวิจัยที่มีคุณค่าแท้จริงต่อประเทศชาติและนานาชาติได้

และขอขอบคุณ ทีมวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งทางตรงหรือทางอ้อมทั้งในและนอกคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย