



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการออกแบบและสร้างแบบคิรีอ์โคไลน์สังเคราะห์เป็น
เครื่องจักรทางชีวภาพเพื่อใช้ในการหาโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์

โดย ผศ.ดร.ตุจเดือน วราโห

พฤษภาคม 2561

สัญญาเลขที่ TRG5780079

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการออกแบบและสร้างแบบที่เรียอีโคไลน์สังเคราะห์เป็น
เครื่องจักรทางชีวภาพเพื่อใช้ในการหาโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์

ผศ.ดร.ดุจเดือน วราโห

สังกัดหลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5780079

ชื่อโครงการ : การออกแบบและสร้างแบคทีเรียอีโคไลน์สังเคราะห์เป็นเครื่องจักรทางชีวภาพเพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ดุจเดือน วราโห

หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address : dujduan.war@mail.kmutt.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์สามารถรักษาโรคได้หลากหลาย เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคติดเชื้อเอชไอวี ในปัจจุบัน โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ส่วนใหญ่มักทำการยับยั้งการทำงานของโปรตีนโดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ซึ่งส่งผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากการจับกับโปรตีนอื่นของผู้ป่วยได้ โดยถูกเรียกว่า off-target effect อีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสสามารถทำได้โดยอาศัยความจำเพาะที่จุดตัดจำเพาะบนซับสเตรตแทนความจำเพาะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้เสนอที่จะใช้กระบวนการทางชีววิทยาสังเคราะห์เพื่อสร้างแบคทีเรียอีโคไลน์สำหรับใช้เป็นเครื่องมือคัดเลือกลำดับทางชีวภาพสำหรับการติดเชื้อเอชไอวี-1 โดยอาศัยความสามารถของระบบขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย Twin arginine translocation pathway ในการขนส่งโปรตีนที่พับม้วนแล้วผ่านเยื่อหุ้มชั้นในของแบคทีเรียอีโคไลน์และใช้ TEM-1 β -lactamase (Bla) เป็นตัวบ่งชี้ความสำเร็จของการขนส่งโปรตีน กระบวนการที่สร้างขึ้นใหม่นี้ใช้ชื่อว่า Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering (PROTECT) โดยมีองค์ประกอบสำคัญ 3 ประการ คือ ตัววัดผลการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส (ซึ่งประกอบขึ้นด้วย ตัวส่งสัญญาณที่จำเพาะเจาะจงกับระบบขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย Twin arginine translocation pathway; ssTorA, ซับสเตรตของไวรัส (p17dp24 และโปรตีนรายงานผล (Bla)), ตัวผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของไวรัสเอชไอวี-1 และตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส (ซึ่งคือ โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์; อินทราเซลล์ลูลาร์แอนติบอดีหรือ single-chain antibody fragment (scFv)) การทดลองทาง *in vivo* ได้ยืนยันว่ากระบวนการ PROTECT สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมเชิงบวกและลบซึ่งคือความสามารถในการจับจำเพาะและไม่จับจำเพาะของ scFvs กับซับสเตรตของเอชไอวี-1 ตามลำดับ โดยในการทดลองพบว่าโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ scFvp17 สามารถจับและปกป้องจุดตัดของซับสเตรตและทำให้ซับสเตรตถูกขนส่งโดยกระบวนการ Tat-pathway ไปยังเพอร์พลาสซึมได้ ทำให้แบคทีเรียดังกล่าว

สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะประเภท β -lactam นอกจากนี้ ยังได้นำเทคนิคดังกล่าวไปทำการคัดเลือก scFvp17 กลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปกป้องของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ ดังนั้น คณะผู้ทดลองจึงสร้างไลบรารีการกลายพันธุ์ของ scFvp17 (ตัวดั้งเดิม) และคัดแยกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่ถูกกลายพันธุ์ที่สามารถทนต่อแรงกดดันที่สูงขึ้นได้ซึ่งคือทนต่อความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลินที่สูงขึ้น เป็นที่น่าเสียดายว่าคณะผู้ทดลองไม่พบว่ามีตัวใดที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องจุดตัดได้ดีกว่าตัวดั้งเดิม ดังนั้น เพื่อปรับปรุงและศึกษาคุณลักษณะของเทคนิค PROTECT นี้ให้ดีขึ้น ในอนาคตควรมีการสร้างไลบรารีที่มีคุณภาพที่ดีมากกว่าที่สร้างได้ในปัจจุบันนี้แล้วนำมาทดสอบกับระบบ PROTECT นี้อีกครั้ง รวมถึงสามารถนำระบบนี้ไปใช้ทดสอบกับแอนติเจนต่างๆ นอกเหนือไปจาก p17 นี้ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ทำให้ได้กระบวนการใหม่สำหรับการใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์เพื่อลดการติดเชื้อเอชไอวี-1 และยังสามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้งานได้อย่างหลากหลาย เช่น การเพิ่มประสิทธิภาพของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ในเชิงพาณิชย์และ/หรือใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ตัวใหม่

คำหลัก : ชีววิทยาสังเคราะห์; โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์; ระบบขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย ทวิน-อาร์จินีนทรานสโลเคชัน พาธเวย์; อินทราเซลล์ลาร์แอนติบอดี/ เอชไอวี-1

Abstract

Project Code : TRG5780079

Project Title : Teach an old dog a new trick: Design and construction of a synthetic *E. coli* protease inhibitor detecting biomachine

Investigator : Assistant Professor Doctor Dujduan Waraho
Biological Engineering Program,
King Mongkut's University of Technology Thonburi

E-mail Address : dujduan.war@mail.kmutt.ac.th

Project Period : 3 years

Protease inhibitors (PIs) are used to treat various types of symptoms or diseases, for example, cardiovascular disorder and HIV disease. Currently, most PIs block the protease's function by targeting the protease active site, which can cause side effects to patients due to cross-reactivity with host's protease homologues called off-target effect. Alternatively, proteolytic cleavage can be blocked by targeting the cleavage site on the substrate instead of the active site on the enzyme. We proposed to apply the synthetic biology approach to create a synthetic *E. coli*-based protease inhibitor detecting biomachine for HIV-1 infection therapy by utilizing the Twin-arginine translocation (Tat) pathway's ability to transport folded protein across the inner membrane of *E. coli* and antibiotic resistance of TEM-1 β -lactamase (Bla) as a reporter protein. This newly developed technique was termed Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering (PROTECT) and is comprised of 3 biological devices, which are protease activity detector (fusion of protein of the Tat signal sequence (ssTorA), viral substrate (p17dp24; and reporter protein (Bla)), protease generator (HIV protease) and protease blocking devices (PIs, intracellular antibody or single-chain antibody fragment (scFv)). The *in vivo* testing confirmed that PROTECT technique could distinguish between positive and negative controls which were the corresponding and non-corresponding scFvs against the HIV-1 substrate, respectively. It was found that scFvp17 could bind and protect the cleavage site of the viral substrate, and the fusion protein was transported to the periplasm, thus, allowing the bacterial cells to grow on an LB agar plate containing selective β -lactam ring antibiotic. The

technique was further tested by attempting to isolate randomly mutated scFvp17 variants for enhanced protection efficiency. Therefore, we constructed an error-proned library of scFvp17 and isolated scFv variants which were able to withstand higher selection pressure by using higher Carb concentrations. Unfortunately, we have not found any mutated scFv variants with higher ability to protect proteolytic cleavage than that of wild type scFvp17 yet. To further improve and characterize this PROTECT technique, in the future, a high quality library should be constructed and tested as well as applying this technique to various antigens besides p17. However, this work reports a new method for isolation of protease inhibitor to decrease HIV-1 infection and to apply in various applications such as optimization of the commercial protease inhibitors and/or selection of new ones.

Keywords : Twin-arginine translocation pathway; protease inhibitor; intracellular antibody; HIV-1; synthetic biology

Executive Summary

Proteases are a large enzyme family that catalyzes proteolysis of a peptide bond in specific substrates. They are considered one of the largest classes of potential drug targets for the pharmaceutical industry. At least 679 human proteases have been identified. Besides host proteases, proteases found in pathogens, for instance, viruses and parasites, are also potential drug targets. Proteases are involved in almost all biological pathways and networks and have been implicated in wide range of diseases. It was reported that about 150 protease inhibitors (PIs) are in clinical or preclinical development. One-third of them are for cardiovascular indications. Other major indications for which PIs are being developed include hypertension, diabetes, Alzheimer's disease, and hepatitis C infection. The blockbuster PI drugs available on the market are for treatment of cardiovascular disorder and HIV infection. The general therapeutic strategy is to identify a specific inhibitor that blocks the active site. Unfortunately, many current PIs that are available on the market have been shown to have off-target effect, which can be severe, because they may interact with other proteases due to cross-reactivity of the PI to the homologues of the target protease which are essential to human body.

Here, we propose an alternative strategy to block proteolytic activity. Rather than blocking the active site on the protease, we propose to use synthetic biology approach to isolate intracellular antibodies (intrabodies; antibody fragments that can function inside the cell) that bind to the cleavage site on the substrate with high specificity and affinity. Upon binding, cleavage site is protected as the intrabodies interfere with substrate-protease interaction and, consequently, inhibit the protease function. Our approach aims to target the cleavage site on the substrate instead of the catalytic active site on the protease. This strategy also avoids inhibition of a protease which possesses several functions involving interaction with many other proteins, some of which their functions may have yet been identified. Finally, the use of antibodies as a tool to inhibit protease function should allow for very specific targeting of the designed epitope on the substrate hence reduces the risk of off-target effect.

To achieve our goal of developing an *E. coli* biemachine used for protease inhibitor selection, we aim to employ the bacterial twin-arginine translocation pathway (Tat pathway) as a tool. In order to develop high-performance intrabodies, it is important for intrabodies to achieve folding in a reducing environment, which presents inside the cell. In general, most antibody fragments failed to express or lost their ability to bind to the target antigen when expressed intracellularly as they are naturally produced to function outside the cell that has an

oxidizing environment. The Tat pathway has been previously applied as protein engineering tools to isolate high soluble protein as well as interacting proteins such as antigen-antibody fragment. Therefore, it has high potentials for developing into a tool useful for isolation of protease-inhibiting intrabodies as well.

Hence, as a model system, we proposed to design an appropriate epitope on the HIV-1 protease substrate as a target for the intrabody such that the intrabody inhibits the proteolytic cleavage. As a proof of concept, we will utilize our *in vivo* platform based on the proposed synthetic *E. coli* to isolate intrabodies against HIV-1 protease cleavage site that function to block proteolytic cleavage of the substrate. Protease inhibitors have played an important role in transforming the HIV infection treatment since their introduction in the mid-1990s[1]. The human HIV-1 protease (PR) has been intensively investigated as a drug target to prevent viral replication in AIDS patients. Our research proposes a more simple way of interfering HIV replication using intrabody strategy that has the potentials to become novel protein therapeutics with highly specificity and affinity to HIV infection. The intrabody approach may be adapted to gene-therapy-based treatment, which would reduce high pill burden that results in high cost and high risk of viral resistance to the therapy.

We used synthetic biology approach to devise and construct an *in vivo* selection system for isolation of scFvs that are capable of inhibiting protease cleavage of the gag polypeptide at p17-p24 cleavage site. These scFvs represent potentials intrabody-based therapeutics. To approach our objectives, we proposed our working hypothesis that the quality control and the hitchhiker mechanisms of the *E. coli* Tat pathway can be utilized to identify high soluble with high-affinity scFvs toward its target. By linking protease degradation to antibiotic resistance, we can simply isolate the suitable intrabodies simply by plating cells containing appropriate devices on solid agar containing β -lactam ring antibiotics. This system is comprised of three devices, i.e., 1) Protease activity detector device, which is to report protection of the cleavage site of the polypeptide by specific binding of scFv to the substrate at the protease cleavage site, 2) Protease generator device, which is simply comprised of a gene coding HIV-1 PR, and 3) Protease blocking device, which is simply a gene coding intrabody.

Using synthetic biology approach, we successfully created a synthetic *E. coli* protease inhibitor detecting biomachine based on the Tat pathway. The system is comprised of 3 devices; first, the protease activity detector device (ssTorA::substrate p17dp24::Bla), which contains the protease cleavage site or the substrate for the protease, second, the protease generator device (HIV protease) which is an enzyme that cleaves the HIV-1 substrate and, third, the protease blocking device (scFvp17) which acts as a protease inhibitor to protect the

proteolytic cleavage on the substrate. Moreover, the natural transport mechanism of the Twin-arginine translocation (Tat) pathway was utilized as a biological tool to select the appropriate scFvs for inhibition of HIV-1 protease's activity. We modified FLI-TRAP and ISELATE [7,10] principles to utilize the unique protein transportation ability of the Tat pathway. The spot plating results showed that the scFvp17 can bind and protect the proteolytic cleavage site of HIV-1 substrate as the synthetic *E. coli* could grow on beta-lactam antibiotic plate. Furthermore, *in-vitro* experiment (western blot technique) confirmed that the cells resistance was due to translocation of the substrate as the cleavage of the substrate was prevented by scFv and the fusion protein was transported to the periplasm of the synthetic *E. coli*. From these experiment, it can be concluded that (i) the designed system functioned as expected as shown by the difference of cell resistance between our tested system and negative control and (ii) scFvp17 itself can block proteolytic cleavage on p17/p24 cleavage site even though it binds to the C-terminus of p17 not the p17/p24 cleavage site directly. After that, we constructed an error prone scFvp17 library using a commercial mutation kit. The library was used for isolation of enhanced scFvp17 by spread plate and spot plate techniques. Unfortunately, none of the improved scFvp17 variants which could protect the cleavage site of substrate better than WT scFvp17 were found as no growth on the antibiotic plate was observed at the conditions where WT scFvp17 did not grow. We speculated from the results that the library size was too small which means the repertoire of the mutant scFv was not big enough to provide many advantageous mutations, and as a consequence, there was less opportunity to find any mutant scFvs which had the protection efficiency higher than that of WT scFvp17. Nonetheless, our work demonstrated that scFvp17 has the ability to fold in the reducing environment of the cytoplasm of *E. coli* and can protect the proteolytic cleavage of p17dp24 substrate. Therefore, through our model system, we proofed that our designed system can be used to isolate protease inhibitor because we can detect growth when substrate-specific scFv that could protect proteolytic cleavage was co-expressed with protease and substrate and there was no growth observed when a non-related scFv was used instead (negative control). This current work clearly shows the ability of our assay as a selection platform of protease inhibiting intrabodies.

For future work, we propose that experimental approach can be improved by combining with the computation approach to identify the best three models which can protect the proteolytic cleavage site of HIV-1 protease's substrate and then validated experimentally. Moreover, this PROTECT technique should be tested with other antigen-scFv system to proof its versatility against other targets.

1. Introduction to the research problem and its significance

Proteases are a large enzyme family that catalyzes proteolysis of a peptide bond in specific substrates. They are considered one of the largest classes of potential drug targets for the pharmaceutical industry. At least 679 human proteases have been identified [1]. Besides host proteases, proteases found in pathogens, for instance, viruses and parasites, are also potential drug targets. Proteases are involved in almost all biological pathways and networks and have been implicated in wide range of diseases. It was reported that about 150 protease inhibitors (PIs) are in clinical or preclinical development. One-third of them are for cardiovascular indications. Other major indications for which PIs are being developed include hypertension, diabetes, Alzheimer's disease, and hepatitis C infection [2]. The blockbuster PI drugs available on the market are for treatment of cardiovascular disorder and HIV infection. The general therapeutic strategy is to identify a specific inhibitor that blocks the active site. Commonly, PIs are small molecules with structure resembling of known protease substrates. Identification of some specific substrate-like compounds with the pharmacokinetic characteristics suitable faces a drastic challenge from close homologues encompassing an identical catalytic mechanism and similar substrate specificity profiles. The danger of off-target effect of an PI can be severe and was exemplified by termination of clinical trials of metalloproteinase (MMP) inhibitors for cancer treatment [1]. Moreover, increasing evidences have emerged suggesting that the use of current protease inhibitors poses many side effects. All PIs are associated with metabolic abnormalities such as dyslipidemia, hyperglycemia, insulin resistance, and lipodystrophy. Some PIs may have significant interactions with other drugs or increase the risk of bleeding in hemophiliacs [3].

Here, we propose an alternative strategy to block proteolytic activity. Rather than blocking the active site on the protease, we propose to use synthetic biology approach to isolate intracellular antibodies (intrabodies; antibody fragments that can function inside the cell) that bind to the cleavage site on the substrate with high specificity and affinity. Upon binding, cleavage site is protected as the intrabodies interfere with substrate-protease interaction and, consequently, inhibit the protease function. Synthetic biology is a new interdisciplinary research field sparked from engineers' interest and contribution to molecular biology [4]. Synthetic biology focuses on engineering biomolecular systems and cellular capabilities for a variety of applications [5]. The surge in the US and European government funding for synthetic biology occurred in 2008 [6]. These spikes followed a period when a number of projects attracted public attention. For instance, the J Craig Venter Institute successfully transplanted a genome from one related species of bacterial cell to another; an UC Berkeley team made an agreement

with Sanofi-Aventis to deliver their artemisinin-synthesis project in exchange for an agreement for the antimalarial to be manufactured and sold at near cost; and a group of biofuel specialists revealed synthetic bacteria and algae that can make alternatives to diesel and petroleum[6]. Although this research area is still in early stage, there are already tremendous promising approaches emerging from labs around the world. The use of synthetic biology may create new generation of medicine by re-engineering biological processes in such a way as to produce specific, targeted treatment. Moreover, as we have learned from the current PI regime, targeting the protease itself may risk facing the severe adverse effect due to cross-reactivity of the PI to the homologues of the target protease which are essential to human body.

Our approach aims to target the cleavage site on the substrate instead of the catalytic active site on the protease. This strategy also avoids inhibition of a protease which possesses several functions involving interaction with many other proteins, some of which their functions may have yet been identified. Finally, the use of antibodies as a tool to inhibit protease function should allow for very specific targeting of the designed epitope on the substrate hence reduces the risk of off-target effect. Therapeutic antibodies mimic the natural process of human immune system. Antibodies are produced in vertebrates to recognize and neutralize any foreign antigens. The hallmark of an antibody comes from the specificity and affinity towards its own target. Specific antibodies can virtually be created against any unique chemical structure, either natural or synthetic, as long as the compound is presented to the immune system in an immunogenic form.

To achieve our goal of developing an *E. coli* biomachine used for protease inhibitor selection, we aim to employ the bacterial twin-arginine translocation pathway (Tat pathway) as a tool. In order to develop high-performance intrabodies, it is important for intrabodies to achieve folding in a reducing environment, which presents inside the cell. In general, most antibody fragments failed to express or lost their ability to bind to the target antigen when expressed intracellularly as they are naturally produced to function outside the cell that has an oxidizing environment. During my PhD research, I developed an intrabody isolation technique based on the hitchhiker mechanism of the *E. coli* Tat pathway, termed FLI-TRAP (Functional Ligand-binding Identification by Tat-based Recognition of Associating Proteins) [7]. The Tat pathway was originally recognized for the translocation of complex redox proteins [8]. These proteins play important roles in the respiratory flexibility of the organism thus several important features inherited to the transport pathway exist to ensure that cofactor insertion and complex formation are complete before export of the protein complex is complete [9]. Our laboratory

has exploited the quality control and the hitchhiker mechanisms, the unique features inherited to the Tat pathway, to develop platforms for engineering soluble intracellular proteins both in terms of antigen-independent (ISELATE) [10] and antigen-dependent (FLI-TRAP) [7] selections. The quality control mechanism refers to the ability of the Tat pathway to transport folded protein from the cytoplasm to the periplasm while rejecting misfolded proteins. DeLisa *et al.* provided the first evidence of the Tat quality control feature by showing the dependence of transport on the cytoplasmic folding of alkaline phosphatase (PhoA) [11]. We converted this natural mechanism into a genetic selection method termed ISELATE (Intrabody Selection after Tat Export) by using a tripartite sandwich fusion of a protein-of-interest (scFv) with an N-terminal Tat-specific signal peptide from Tat's native substrate, called Trimethylamine N-oxide reductase, (ssTorA), and a C-terminal TEM-1 β -lactamase (Bla), thereby coupling antibiotic resistance with the Tat pathway transport (Figure 1A and 1B). *The presence of Bla in the periplasm renders the E coli cell resistant to β -lactam antibiotics such as Ampicillin (Amp) and Carbenicillin (Carb).* This high-throughput technique allows a simple plate selection on growth medium containing Amp to identify cells carrying soluble intrabody-Bla fusion. ISELATE can isolate solubility-enhanced scFvs from an insoluble parent from only three rounds of laboratory evolution [10]. The hitchhiker mechanism refers to the transport of a protein complex in which a large subunit lacking any known targeting signal for export forms a complex with its partner, a small subunit carrying a Tat signal sequence, in the cytoplasm and the complex is transported to the periplasm by virtue of the signal sequence on the small subunit. The *E. coli* hydrogenase-2 (HYD2) subunits, HybO (large subunit) and HybC (small subunit), were the first example of a naturally occurring protein pair that utilizes the hitchhiker co-translocation mechanism to transit the cytoplasmic membrane [12]. We simply utilize this outstanding mechanism for intrabody isolation by co-expressing ssTorA-intrabody (X)-FLAG chimera and antigen (Y)-Bla fusion proteins in the same cell, *interaction of X and Y would produce a physical linkage between ssTorA and Bla* to form a heterodimeric complex, ssTorA-X::Y-Bla resulting in Tat-dependent co-translocation of Bla to the periplasm resulting in cell resistance to Amp (Figure 1C). In the absence of an interaction, only the intrabody is being transported while Bla remains localized in the cytoplasm and cells are sensitive to Amp. The utility of this technique was demonstrated by isolation of intrabodies against the leucine zipper motif of the yeast transcription factor GCN4 from two different saturation libraries [7]. FLI-TRAP has proven its potentials as a protein drug discovery tool as i) it gives less false positives (as compared to the classical yeast two hybrid system), ii) allows for a single-selection *in vivo* (selection is performed in its natural conditions and bypasses complications associated with protein purification or immobilization), and iii)

selects for stable (weak association maybe dissociated during transport) and soluble (authentic quality control of the Tat pathway to discard the unfolded insoluble proteins) complexes. Since this technique is performed in *E. coli* it suffers from the same limitations as other bacterial-associated techniques such as protein complementation assay (PCA) [13], bacterial display [14, 15] and phage display [16, 17]. On the other hand, we can take direct advantage of the selection scheme in *E. coli* as those isolated therapeutic intrabodies would be readily apt to mass production in *E. coli*, which offers several advantages such as well studied physiology, genetics and availability of advanced genetic tools [18-20], rapid growth, high-level protein production rates achieving up to 10–30% of total cellular protein [21], ease of handling in a standard molecular biology laboratory, low cost and the ability to multiplex both expression screening [22] and protein production [23].

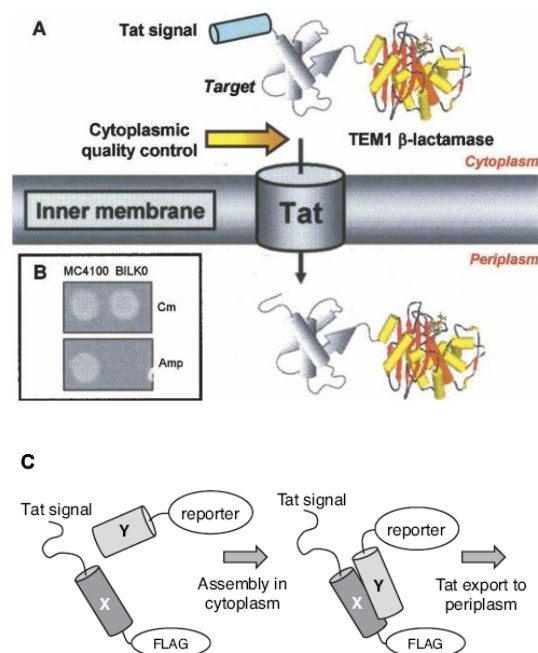


Figure 1. Exploiting the Tat pathway's folding quality control and hitchhiker mechanisms for isolation of intrabodies. (A) A tripartite fusion protein is created between a Tat signal peptide (e.g., ssTorA), a target protein, and the TEM1 β-lactamase protein (Bla). Discrimination between folded and misfolded target sequences is accomplished by the Tat machinery such that only correctly folded, soluble proteins are localized to the periplasm. Concomitant delivery of Bla to the *E. coli* periplasm confers an Amp resistant phenotype to cells. (B) The growth of MC4100/pTMB and B1LK0/pTMB cells on LB agar plates supplemented with either 25 mg/mL Cm (control) or 100 mg/mL Amp, indicating unambiguously that Bla can be used as a Tat-specific reporter. (C) Schematic representation of FLI-TRAP assay for cotranslocation of interacting pairs via the Tat pathway. The Tat signal peptide chosen was ssTorA, the reporter was either the c-myc epitope tag or Bla, and X and Y were interacting domains or entire proteins.

Hence, as a model system, we proposed to design an appropriate epitope on the HIV-1 protease substrate as a target for the intrabody such that the intrabody inhibits the proteolytic cleavage. As intrabody is a class of protein, it is apt to gene therapy approach. Even though this type of treatment is still under development, owing to rapid advances in medical research, it may be feasible in the near future. As a proof of concept, we will utilize our *in vivo* platform

based on the proposed synthetic *E. coli* to isolate intrabodies against HIV-1 protease cleavage site that function to block proteolytic cleavage of the substrate. Protease inhibitors have played an important role in transforming the HIV infection treatment since their introduction in the mid-1990s [1]. The human HIV-1 protease (PR) has been intensively investigated as a drug target to prevent viral replication in AIDS patients. The rapid mutation rate of the enzyme is the main bottleneck of HIV treatment. Currently, *in vitro* and *in silico* studies have become an advanced field in biological research [24]. In 2011, the estimated number of people living with HIV in Thailand was 450,000 – 550,000 [25]. AIDS has become not only one of the greatest national public health problems but also global ones. Thirty-three million people all over the world are estimated to be living with HIV/AIDS [26]. Tendency of HIV to mutate is one of its characteristics that make it difficult to combat. The typical first-line drug regimens target viral enzymes such as PR and reverse transcriptase (RT) [27]. The fusion, entry, and integrase inhibitors are now available as new alternatives [28-31]. Unfortunately, *in vivo* and *in vitro* resistance to all three new drug classes has already been reported [29, 31-34]. In addition, despite the positive impact on patient survival from combination therapy for HIV infection, chronic suppressive therapy is still required to contain latent viral reservoirs and is limited by its cost (especially in the global scale), the requirement of lifelong adherence, and the unknown effects of long-term treatment [35]. HIV infection thus represents a good potential candidate for gene therapy. Recently, over 250 human proteins exploited by HIV virus during infection termed HIV-dependency factors (HDFs) were identified by genome-wide small interfering RNA screening (siRNA) [36, 37]. These HDFs may offer novel therapeutic targets that overcome drug resistant problems, however, extreme careful considerations should be taken into choosing the target and studying the side effects from disrupting or inactivating the HDFs as there could be adverse effects to the protein functions in the human body in a similar fashion to similar to the aforementioned MMP clinical trial case study. Furthermore, in October 2009, the result of the largest phase III trial of HIV vaccination was published in the New England Journal of Medicine and announced at an international AIDS vaccine meeting in Paris. The study consisted of a combination of vaccines containing ALVAC-HIV (vDP1521) (Sanofi Pasteur) and AIDSVAX B/E (Global Solutions for Infectious Diseases). More than 16,000 young Thai adults at community risk for HIV infection were included in this clinical trial. The vaccine efficacy was reported as 31.2% [38]. Despite failures during more than two decades of effort, this trial has enlightened some hopes for effective HIV vaccine development; still the result is not conclusive and is in its infancy stage. These obstacles involved with vaccination development and finding novel targets for HIV treatment may have prompted us to revisit the basic research to identify

effective approaches toward HIV cure. Our research proposes a more simple way of interfering HIV replication using intrabody strategy that has the potentials to become novel protein therapeutics with highly specificity and affinity to HIV infection. The intrabody approach may be adapted to gene-therapy-based treatment, which would reduce high pill burden that results in high cost and high risk of viral resistance to the therapy.

2. Objectives

1. To use synthetic biology approach to devise and construct a simple, high throughput screening *in vivo* platform for selection of intrabodies that can inhibit proteolytic cleavage of a target substrate.
2. To characterize the solubility and affinity of the isolated intrabodies *in vitro*.
3. To evaluate protease cleavage inhibition effect of the isolated intrabodies *in vitro*.

3. Materials and Methods

Plasmid Constructions. *E. coli* strain DH5 α was used for plasmid construction. The plasmid used for tricistronic and bicistronic expressions were based on pDD18 which is modified from pBAD18 plasmid. The necessary compartments used for confirmation and selection of the appropriate intracellular antibody are 1) the protease blocking device comprised of scFvp17 with c-terminus FLAG-tag 2) the protease activity detector device comprised of ssTorA::p17dp24::Bla fusion protein and 3) the protease generator device comprised of HIV-protease (HIV-PR) with c-terminus His tag. In the first generation, all of these devices were expressed from a pDD18 vector containing tricistronic expression (Figure 5). Nonetheless, pDD322 TatABC plasmid was co-expressed with our pDD18 containing the device because overexpression of Tat ABC proteins from pDD322 has been shown to improve transport efficiency as they are key proteins of the Tat pathway. Antibody fragment against a yeast transcription factor, GCN4, anti-GCN4 scFv wild-type, GLF, was used to replace scFvp17 via NdeI – Sall cut sites to create negative control because GLF cannot bind to HIV-PR substrate, p17dp24. To construct a positive control, mutation of one amino acid on the cleavage site from YP to KP was performed using “Round the Horn” technique. To construct the bicistronic system, pDD322 TatABC was digested with KpnI-XmaI and HIV-PR gene was PCR and cloned into these cut sites to create pDD322 TatABC HIV-PR as shown in Figure 7.

Bacterial Strains and Growth Conditions. *E. coli* strain DH5 α was used for plasmid construction, however, *E. coli* strain MC4100 is used for all other experiments including spot

plating and Western Blotting. In these experiments, synthetic *E. coli* containing one of these plasmid pairs were used to establish 5 conditions which are referred to as 1) negative control of tricistronic system (pDD18 GLF::FLAG, ssTorA::p17dp24::Bla, HIV-PR and pDD322Kan TatABC), 2) positive control of tricistronic system (pDD18 scFvp17::FLAG, ssTorA::p17dp24(YPKP)::Bla, HIV-PR and pDD322Kan TatABC), 3) wild-type for tricistronic system ((pDD18 scFvp17::FLAG, ssTorA::p17dp24::Bla, HIV-PR and pDD322Kan TatABC)), 4) wild-type for bicistronic system (pDD18 scFvp17::FLAG, ssTorA::p17dp24::Bla and pDD322Kan TatABC HIV-PR), and 5) negative control for bicistronic system (pDD18 GLF::FLAG, ssTorA::p17dp24::Bla and pDD322Kan TatABC HIV-PR). Typically, *E. coli* cells were grown in LB medium overnight, subcultured into fresh LB, and then incubated at 30 or 37 °C. Protein synthesis was induced when the cells reached an OD600 ~0.4–0.5 by adding arabinose to final concentration of 0.2% wt/vol. Antibiotics were provided at the following concentrations: Carb or Amp, 0 – 400 µg/mL (used for selective plating experiments); chloramphenicol (Cm), 25 µg/mL, and Kanamycin (Kan), 50 µg/mL. Selective plating (spot plating) of bacteria was performed as described (Fisher et al., 2006, 2011). Briefly, MC4100 cells were co-transformed with plasmids pDD322-TatABC for increasing the copy number of TatABC translocases[7] and pDD18-ssTorA-scFvp17-FLAG::Bla-antigen that co-expresses the ssTorA-scFv fusion along with antigen-Bla. Transformed bacteria were grown overnight at 37 °C in Luria Bertani (LB) medium supplemented with 25 µg/ml chloramphenicol (Cm) and 50 µg/ml Kanamycin (Kan). The next day, drug resistance of bacteria was evaluated by spot plating 5 µl of serially 10-fold diluted overnight cells that had been normalized in fresh LB to OD600 = 2.5 onto LB agar plates supplemented with 0.1-1.0 % arabinose and no antibiotics as a control or varying amounts of Carbenicillin (Carb; 12–100 µg/ml). Plated bacteria were incubated at 30 for 48 h.

Subcellular fractionation and Western blot analysis. Cells expressing recombinant proteins were harvested 4 h after induction, 20 – 25 mL of induced culture as normalized by OD600 was pelleted. Subcellular fractionation was performed by using the ice-cold osmotic shock procedure[39, 40]. Cells were resuspended in 1 mL subcellular fractionation buffer (30 mM Tris-HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.6 M sucrose) and then incubated for 10 min at room temperature. After adding 250 µL of 5 mM MgSO₄ (resulting in a normalized final OD600 = 50), cells were incubated for 10 min on ice. Cells were spun down, and the supernatant was taken as the periplasmic fraction. The pellet was resuspended in 250 µL phosphate buffered saline (PBS) and sonicated on ice. Following centrifugation at 16,000 rcf for 10 min at 4 °C, the second supernatant was taken as the cytoplasmic soluble fraction, and

the pellet was the insoluble fraction. Cytoplasmic and periplasmic proteins were separated by SDS/PAGE and Western blotting was performed according to standard protocols. Briefly, proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, and membranes were probed with the following primary antibodies (dilutions in parentheses): mouse anti-FLAG M2-HRP (1:3,000; Sigma-Aldrich) to detect intrabodies and mouse anti-Bla (1:150; Abccam) to detect the antigen-Bla fusion.

4. Results and Discussion

There are several steps involved with design and construction of the *E. coli* protease inhibitor detecting machine. Summary of the methodology is illustrated in the flow chart below.

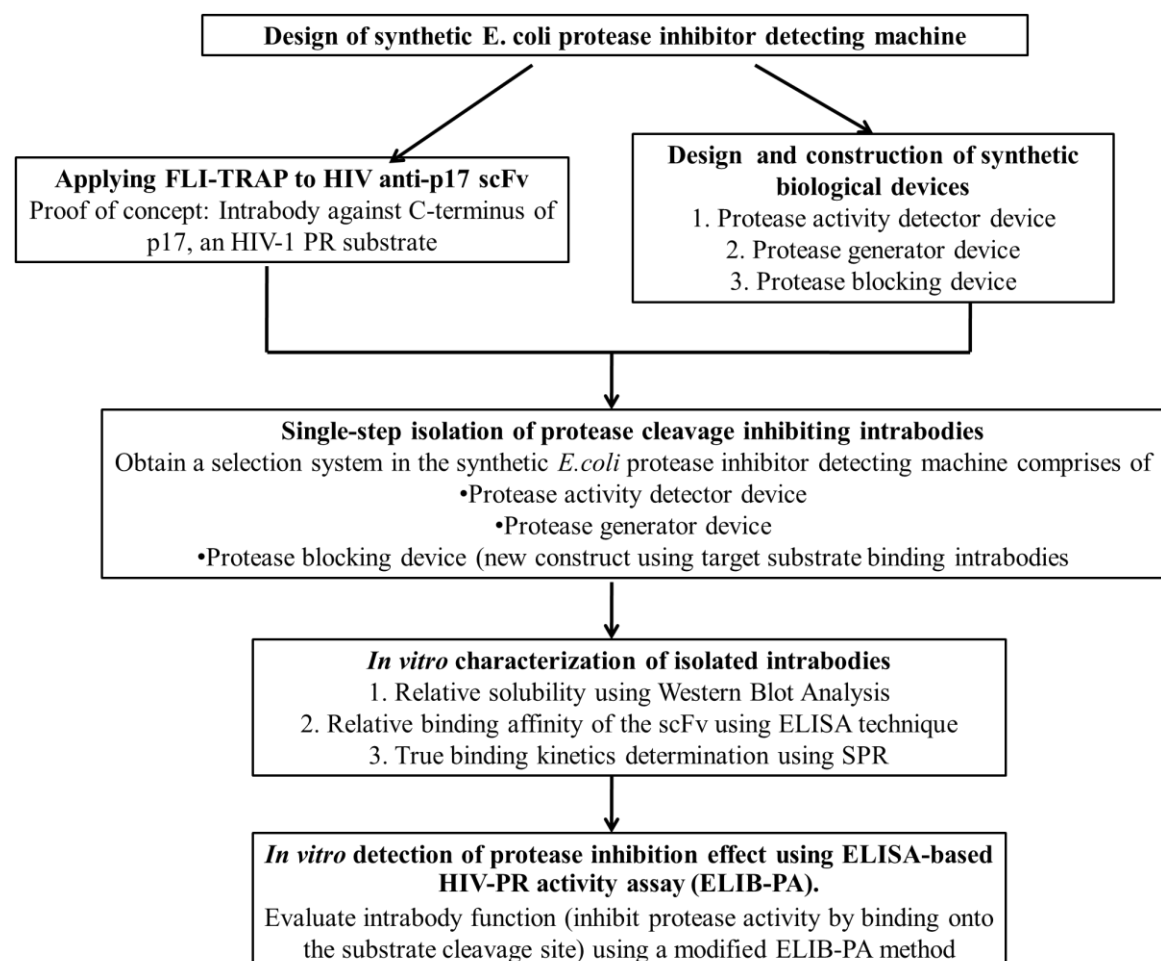


Figure 2. Flow chart highlighting critical steps involved with construction and characterization of a synthetic *E. coli* protease inhibitor detecting machine.

4.1 Applying FLI-TRAP to HIV anti-p17 scFv

The first step for the experiment is to confirm the compatibility of FLI-TRAP technique with the current anti-p17 scFv available from our collaborator, Professor Dr. Chatchai Tayapiwatana from Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. This step is important as it proves that our target and the scFv are compatible with the Tat pathway thus we can employ this technique for isolation of the intrabody against the HIV substrate. We selected the HIV anti-p17 scFv that binds specifically to a 12-amino acid C-terminal epitope on the HIV matrix protein (DTGHSSQVSQNY), p17, domain [41]. This scFv was constructed by cDNA synthesis from mRNA isolated from the anti-gag p17 murine hybridoma cell line [42]. This scFv demonstrated its potential as intrabody as it can inhibit HIV replication when expressed the cytoplasm and the nucleus of Jurkat CD4⁺ and COS7 cell lines [41]. In addition, it has been demonstrated that scFv expressed in the cytoplasm showed stronger inhibitory effect than scFv expressed in the nucleus. Each of these scFvs-His-HA amplified by PCR using plasmids provided from our collaborator into the “X” position of the FLI-TRAP system using XbaI and KpnI cut sites thus removing the FLAG tag from pDD18 in this new construction. The antigen wt p17, termed p17.1, and its variants were cloned into the C-terminus of Bla with (Gly4Ser)₃ flexible linker and a FLAG tag at its N-terminus. The wt p17 was used as a positive control. These variants were subjected to the FLI-TRAP format in order to evaluate if the *in vivo* and *in vitro* results are in good agreement, i.e. if the resistance to antibiotics from cells expressing various p17 variants would correspond with their relative binding affinity and solubility characterized by spot plating and Western Blot techniques. In this case, p17-p24 junction (6 amino acids from p17 C-terminus and 6 amino acids from p24 N-terminus) and 12 amino acids from p24 N-terminus can be used as negative controls as the p17 scFv should not be able to interact with these peptides.

4.1.1 *In vivo* detection of antigen-antibody binding via the hitchhiker mechanism

Because our technique is based on the Tat pathway, we want to first make sure that our system, comprised of HIV antigen and antibody fragments, can be expressed and is compatible with the *E. coli* Tat pathway. We first evaluated the system using FLI-TRAP technique. Each of these scFvs was co-expressed with the corresponding Bla-antigen fusion and spot plated onto LB agar plates containing various concentrations of the β -lactam ring antibiotic, Carbenicillin to evaluate the *in vivo* binding activity of each scFv to various p17 mutants. As expected, we found that the cells containing our positive control, p17.1, were resistant to the antibiotic as a result of Bla transport when bound by the ssTorA-scFv fusion via the Tat-specific hitchhiker mechanism while both negative controls, p17-p24 and p24, were

sensitive to Bla as scFvp17 could not recognize these peptides. Moreover, p17.7 and p17.8 variants also showed resistant to Carb which was presumed to be due to binding of the scFv to these variants.

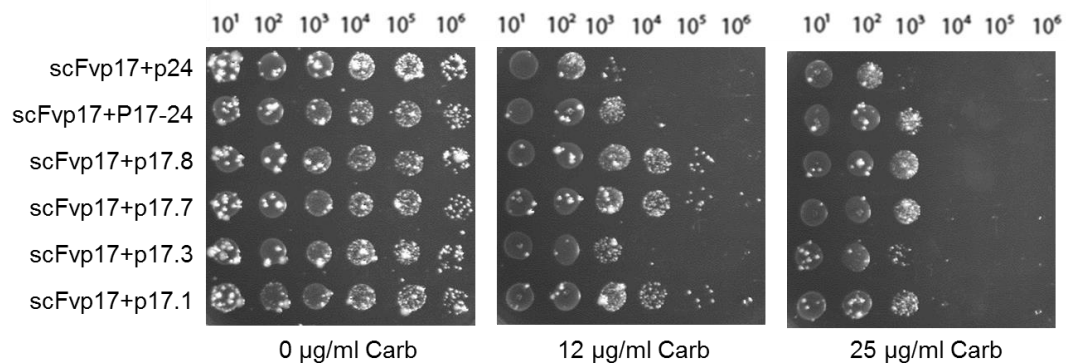


Figure 3. Selection of scFvp17 that binds HIV antigens. Selective plating of serially diluted cells expressing different antigen-antibody pairs on Carb as indicated. Each spot corresponds to 5 µL of serially diluted cells.

4.1.2 scFvp17 intrabody specifically co-localizes wt p17 antigen to the periplasm

The selective plating experiment showed growth on the selective LB agar plate from the cells co-expressing scFvp17 and its cognate antigen, wt p17 (p17.1), as well as p17.7 and p17.8 variants. We expected this growth was a result of the hitchhiker transport of the binding scFv and the antigens *in vivo*. However, we wanted to confirm this assumption *in vitro* using western blot analysis. We performed subcellular fractionation of the cells containing scFvp17 and p17.1 as positive control and cells containing scFvp17 and p24 as negative control. As expected, western blot analysis revealed that the significant growth advantage conferred was the result of scFvp17's ability to co-localize the Bla-FLAG-p17.1 antigen to the periplasm as we could detect the Bla-FLAG-p17.1 in both the cytoplasmic and the periplasmic fractions. On the other hand, the Bla-FLAG-p24 could only be detected in the cytoplasmic fraction because the scFv cannot bound to the p24 peptide thus cannot be transported via the hitchhiker mechanism (figure 4).

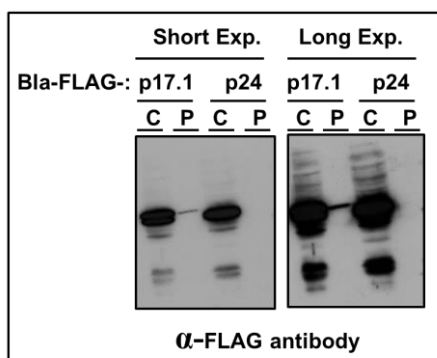


Figure 4. Co-translocation of Bla chimeras to the periplasm. Western blot analysis of periplasmic and cytoplasmic fractions generated from wt MC4100 cells carrying pBR-TatABC and co-expressing ssTorA-scFvp17-His-HA and Bla-FLAG-p17.1 or p24 as indicated. Detection of Bla-antigen constructs was with anti-FLAG antibody.

4.2 Design and construction of the synthetic biological devices

The objective of this section is to devise and construct an *in vivo* selection system for isolation of scFvs that are capable of inhibiting protease cleavage of the gag polyprotein at p17-p24 cleavage site. These scFvs represent potential intrabody-based therapeutics. To approach our objectives, we propose our working hypothesis that the quality control and the hitchhiker mechanisms of the *E. coli* Tat pathway can be utilized to identify high soluble with high-affinity scFvs toward its target. By linking protease degradation to antibiotic resistance, we can simply isolate the suitable intrabodies simply by plating cells containing appropriate devices on solid agar containing β -lactam ring antibiotics. This system is comprised of three devices as follows.

4.2.1 Protease activity detector device

The purpose of the protease activity detector device is to report protection of the cleavage site of the polypeptide by specific binding of scFv to the substrate at the protease cleavage site. We constructed a tripartite fusion consisting of ssTorA-substrate-Bla (see figure 5) under the AraBAD promoter in pDD18 plasmid originally developed for FLI-TRAP technique. The strategy of the selection is as follows. If the substrate is protected against proteolytic cleavage, Bla will be transported to the periplasm resulting in cell resistance to Amp. The transport of Bla occurs as the tripartite fusion protein is still intact. If the substrate is cleaved, Bla will remain in the cytoplasm while ssTorA translocate only the cleaved substrate to periplasm thus the cell die under selective pressure. In this device, Bla is used as a reporter protein while ssTorA is used as translocating signal to initiate transport of the protein complex in a Tat-dependent manner.

4.2.2 Protease generator device

Protease generator device is simply comprised of a gene coding HIV-1 PR. For the translocation of the tripartite fusion protein to occur, binding of the intrabody must prevail the rate of protease cleavage. This binding phenomenon is a type of kinetic event thus depends upon the affinity and solubility of the intrabody inside the cell. We foresee that too high of a protease expression level may give rise to too rapid protease cleavage and intrabody may not have enough time to interact with the substrate before protease does. On the other hand, too low of a protease expression level makes the system not selective enough, i.e. even intrabody with low affinity and/or solubility can compete with low level of protease present inside the cell. However, to simplify the system, we currently constructed this device on the same plasmid and under the same promoter as the protease activity detector device (see figure 5). To prevent problems associated with high level of protease expression, we chose a weak ribosome binding site (RBS) for this construction. In the future, it might be necessary to employ an inducible

promoter such that the expression of the protease can be toggled to an appropriate level. Moreover, there is also a possibility that transport occurs at a faster rate than cleavage resulting in false positives due to transport of ssTorA-substrate-Bla regardless of cleavage protection from the intrabody. Following decoupling principle, we will design a system such that the expression of protease and scFvs (the protease generator device and protease blocking device) are controlled under a different promoter than the protease activity detector device (ssTorA-substrate-Bla) thus we can induce translation of protease and scFvs prior to the expression of ssTorA-substrate-Bla. We expect that plentiful presences of protease and scFvs will give rise to competitive binding between the protease and the scFvs and allow for authentic selection of scFvs that outcompete with the protease.

4.2.3 Protease blocking device

Similar to the protease generator device, the protease blocking device contains a gene coding intrabody. The intrabody is tagged with FLAG epitope tag for easy detection of the presence of scFv.

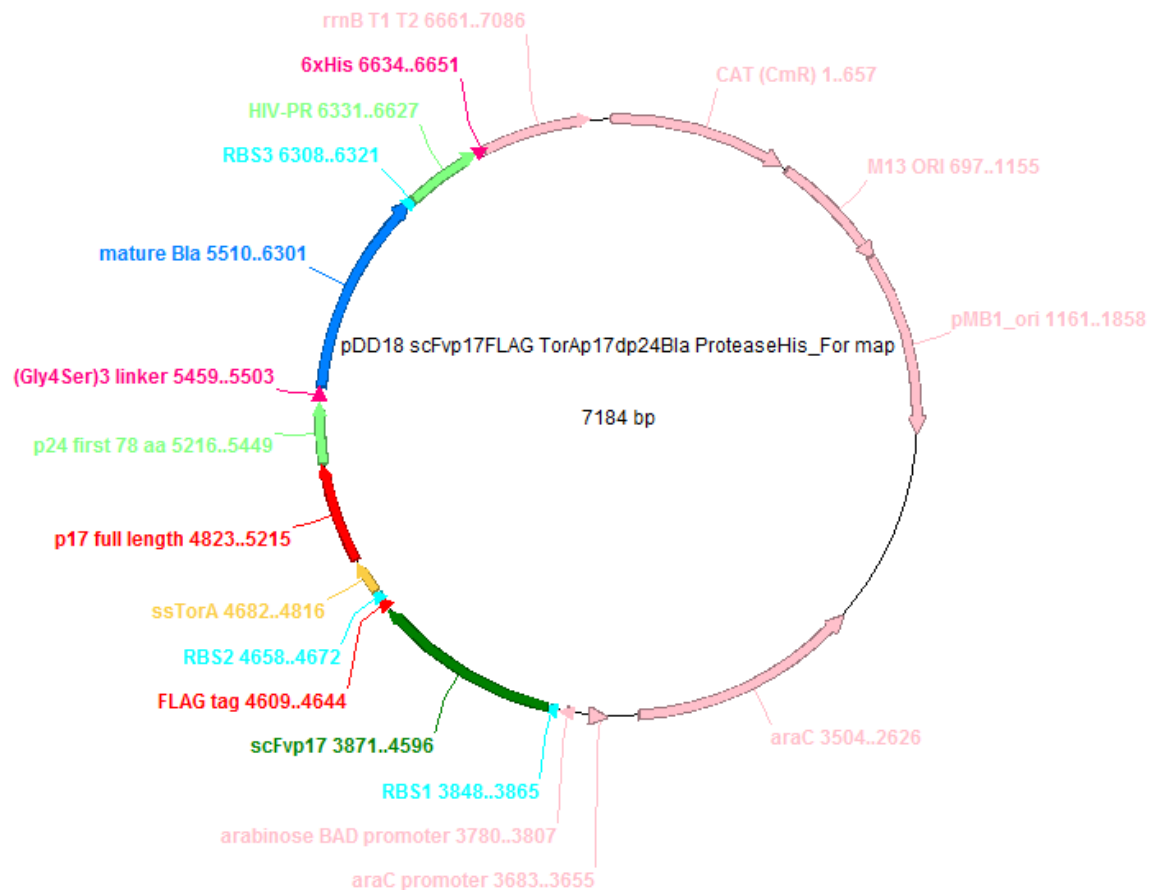


Figure 5: Plasmid map of the system used for construction of the synthetic *E. coli* biemachine. The devices are placed as an operon and controllable by the same promoter, AraBAD promoter.

Since all three devices were cloned into one plasmid, it required three-step cloning. We first cloned scFvp17 between the first RBS and the FLAG tag in pDD18 that was used for FLI-TRAP selection [7] using *SacI* and *SalI* cut sites, therefore, removing the original Tat specific signal sequence, ssTorA. Secondly, we cloned ssTorA-p17 Δ p24 into the “Y” position, i.e. the N-terminus of the Bla reporter protein, with a second RBS at its N-terminus using *AvrII* and *NotI* cut sites to create ssTorA-p17 Δ p24-Bla tripartite fusion that served as the protease activity detector. It is noteworthy that the truncated p17-p24 was used since there might be a size limit as to the transport of a protein complex by the Tat pathway. It has been previously shown that the cleavage of the p17-p24 junction in the full-length polyprotein was similar to the rate of cleavage at this site from a truncated gag precursor corresponding to all of p17 and the first 78 amino acids of p24 (termed, p17 Δ p24) [43]. Lastly, we cloned HIV-1 PR with a weak RBS mentioned above on its N-terminus and a 6xHis tag appended to its C-terminus (for detection) downstream of the ssTorA-p17 Δ p24-Bla fusion protein using *HindIII* cut site. Moreover, literature review has enlightened some information regarding mutations of the substrate that allow us to use these known mutations to serve as controls. Therefore, site directed mutagenesis was performed to change the scissile bond residues Y-P junction of p17-p24 cleavage site to KP (mutation of tyrosine to a charged residue, lysine and is designated YPKP). This YPKP mutation has previously been shown to result in substrates that are cleaved very slowly. In excess presence of a decapeptide that contains YPKP cannot inhibit processing of gag precursor. It was suggested that YPKP may not bind to the protease at all or only very weakly. The YPKP represents a positive control as cells expressing this substrate should be resistance to Carb as protease cannot cleave the substrate. As for negative control, we simply co-expressed a non-HIV-related scFv with the ssTorA-p17 Δ p24-Bla tripartite fusion and protease. In this case, wild-type anti-GCN4 scFv (GLF) was chosen as it was used in the original FLI-TRAP paper [7]. Moreover, it was found that experiments with any plasmids containing Tetracycline resistance gene (TetR) should be performed in a BSL-2 level laboratory because Tetracycline antibiotic is still used to treat bacterial infection in human. Upon acquired such knowledge, we prompted to replace the TetR originally in pDD322 [7] with Kanamycine resistance gene (KanR).

Most problems encountered in this step were related to difficulties in cloning. For example, pDD322 has no restriction enzyme cut sites flanking the resistance gene because it was naturally occurred in the plasmid. Literature review found a new technique, called “Overlap extension PCR cloning” that can be used to perform cloning where there are no cut sites [44]. However, this new technique requires some fine tuning for it to be successful such as

redesigning the primers and change the annealing temperature of the PCR cycle. Moreover, site-directed mutagenesis was performed to construct YPKP following a manufacturer's protocol. NEB offers an online tool, called NEBaseChanger, which helps designing primers to be used with their Q5 high fidelity DNA polymerase used for site-directed mutagenesis. YPKP construct was successful in the first trial.

4.3. *In Vivo* Testing of the Design Systems

The first format of the designed system was transformed into MC4100 strain for *in vivo* experiments. The system was consisted of pDD18 scFvp17FLAG ssTorAp17dp24Bla HIV-PR which was co-transformed with pDD322 TatABC. The latter plasmid was used to overexpress the TatABC proteins which are the main components in the Tat pathway thus resulting in increased transport efficiency as reported previously [7]. Spot plating technique was used to evaluate the feasibility of the developing system Figure 7 shows that our new system can distinguish the differences in growth between our interested system (scFvp17 and p17dp24(wt)), positive (scFvp17 and uncut p17dp24(YPKP)), negative controls (unrelated scFv, GLF, and p17dp24(wt)). We found that the system functioned better when expressed at 30 °C (Figure 6) as low incubation temperature allowed for slower expression of the scFv resulted in higher soluble proteins in the cytoplasm. Furthermore, since the cells were grown at low temperature, longer incubation period was required. It was found that 48 hours incubation allows for the best distinction between each samples. In conclusion, selective plating results confirmed that the differences between growths resulting from the hitchhiker transport of the cells containing binding antibody-antigen pairs and non-binding antibody-antigen pairs can easily be detected. Even though, the antibiotic resistance was still quite low as seen by growth differentiation was achieved at only 12 µg/mL Carb concentration. Nonetheless, these results were encouraging for the development of the synthetic *E. coli* for protease inhibitor detecting biomachine.

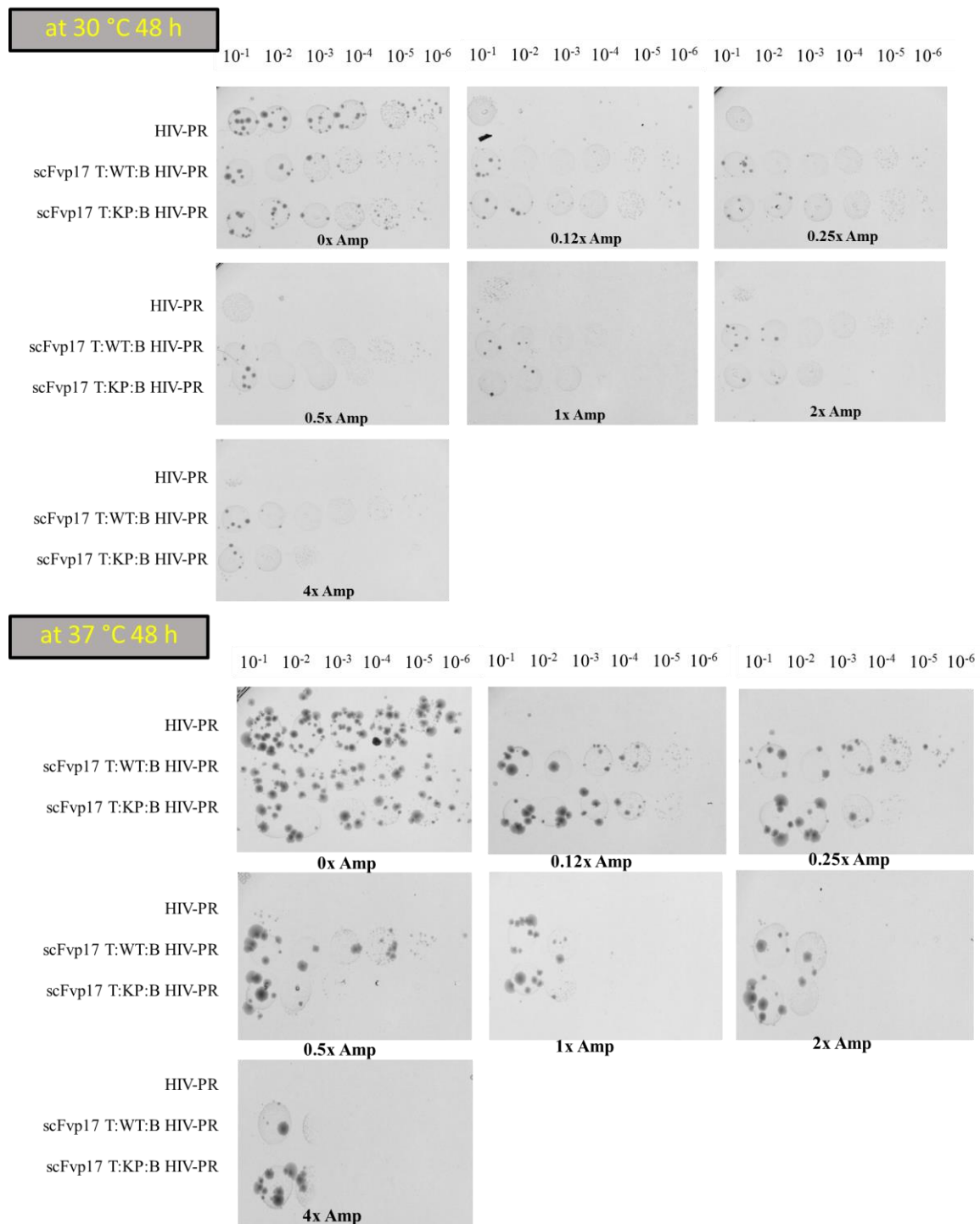


Figure 6. Selection of scFvp17 that binds HIV antigens. Selective plating of serially diluted cells expressing different antigen-antibody pairs on Carb as indicated. Each spot corresponds to 5 μ L of serially diluted cells.

It is noteworthy that there are many possibility of designing our devices. It is important to consider some hindrances due to kinetics of the system, i.e. transport vs. protease cleavage, which may be encountered during the system development. Therefore, in order to optimize the

designed system, we would like to investigate a system where HIV-PR was expressed from a low-copy-numbered plasmid, pDD322 as well. The following construct was made. Plasmid map of pDD322KanR TatABC HIV-PR is shown in Figure 7.

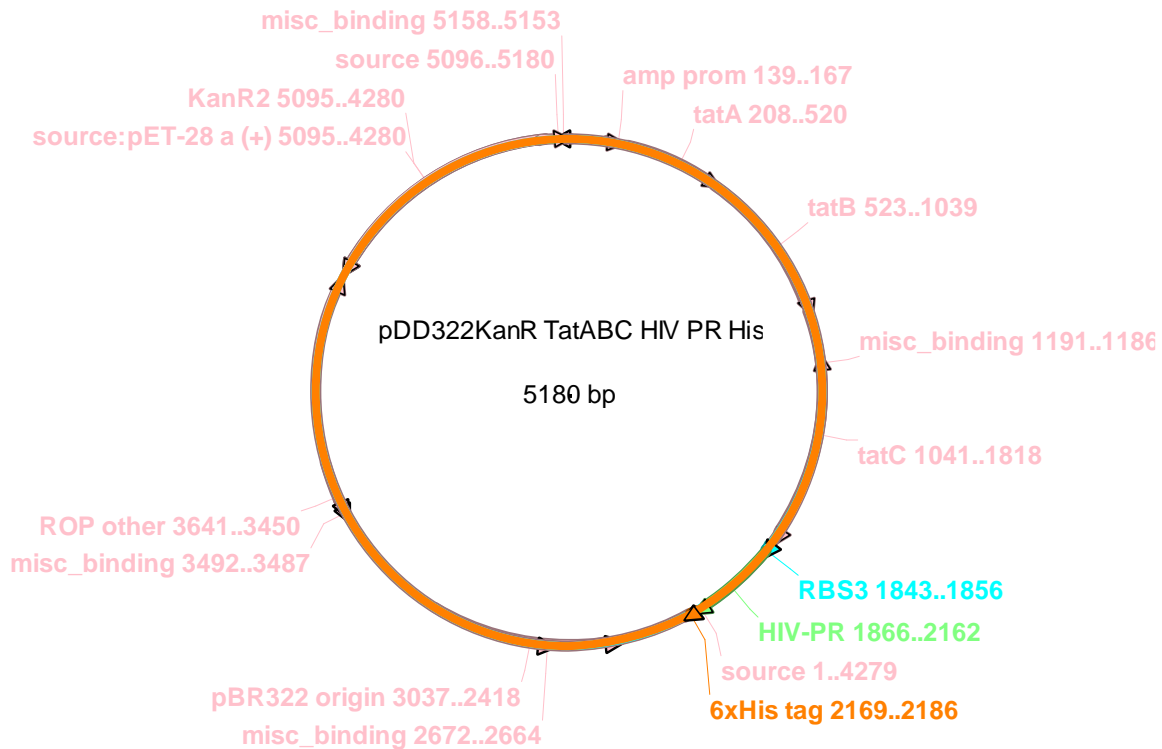


Figure 7: Plasmid map of the system used for construction of the synthetic *E. coli* biomachine. HIV-PR was placed in a low-copy-number plasmid, pDD322, where it is under the TatABC constitutive promoter.

We then compared our new bicistronic system with our old tricistronic system using spot plating technique. The experiment was performed at 30 °C as previously identified. However, since 48 hour incubation period was required, Carbenicillin, which is a more stable β -lactam ring antibiotics, was used instead of Ampicillin. Concentrations of Arabinose (inducer) were varied as 0.1%, 0.2% and 0.5%, respectively. In figure 8, 5 antibody-antigen pairs were tested. Row 1 – 3 were for the tricistronic system, i.e. row 1: pDD18 scFvGLF ssTorAp17p24Bla HIV-PR + pDD322 TatABC as the negative control, row 2: pDD18 scFvp17 ssTorAp17p24(YPKP)Bla HIV-PR + pDD322 TatABC as the positive control, and row 3: pDD18 scFvp17 ssTorAp17p24Bla(WT) HIV-PR + pDD322 TatABC as the investigated system. Row 4 – 5 were for the bicistronic system, i.e. row 4: pDD18 scFvp17 ssTorAp17p24Bla (WT) + pDD322 TatABC HIV-PR as the investigated system and pDD18 scFvGLF ssTorAp17p24Bla (WT) + pDD322 TatABC HIV-PR as negative control. The carbenicillin concentrations were varied between 0x to 4x as a tool for observe efficiency and select appropriate scFv. When the bicistronic system was used (Figure 8), we found that the difference of cell growth between our

scFvp17-WT p17 substrate system and the non-related scFv, GLF,-WT p17 substrate were still in good range. For example, at 1x carb and 0.5% arabinose induction, GLF can only grow at 10^{-3} cell dilution while scFvp17 grew at 10^{-6} cell dilution, which represented single cell level, resulting in 10^3 fold difference. The results in figure 8 also illustrated that the cell resistance to Carb of cells containing WT p17dp24 substrate was higher than that of the positive condition, which was the substrate containing YP to KP mutation. We proposed that since the created mutation was at the last amino acid of the p17 therefore the scFvp17, which was expected to bind to the C-terminus of p17, could not bind to the YPKP substrate as efficiently. It was speculated from the literature that HIV-PR could not bind at all with p17p24 YPKP or very weakly [45]. However, since our results showed that substrate with YP to KP mutation had lower cell resistance (i.e. less amount of transported ssTorAp17dp24Bla) than that of WT substrate, we hypothesized that it was because the effect of scFv protection by binding to the C-terminus of the substrate was stronger than the reduction of cleavage efficiency as the binding may still weakly occur. Nonetheless, when considering the results of cells expressing non-related intrabody, anti-GCN4 scFv (GLF), and WT p17dp24 both in tricistronic and bicistronic systems, it was clearly observed that GLF cannot protect the cleavage of p17dp24 substrate as the cell resistance to Carb was much lower than that of cells expressing scFvp17 and WT p17dp24. It should be mentioned that even in the case of GLF-WT p17dp24, background growth was clearly observed. Ability to grow on Carb can occur when large amount of cells are densely plated on the solid media as active beta-lactamase (Bla) from the cytoplasm of death cells was released onto the solid medium which can still degrade the β -lactam antibiotics around the debris. This was the reason for the background growth that was more pronounced where there were large amount of cells such as when GLF grew when plated at 10^{-2} dilution (about 1.25×10^7 cells) on an circular area of about 5 mm in diameter in the bicistronic system at 1x Carb. It was also observed that the higher the inducer, the larger the difference between dilutions of cells that grew under the antibiotic selection pressure.

Moreover, when comparing the tricistronic and bicistronic systems using the difference in the efficiency of cell growth from cells expressing GLF and scFvp17, we found that bicistronic may be more suitable for our selection of enhanced scFvp17 variants from an error-prone scFvp17 library. This was because the cells do not grow as well at high carbenicillin concentration thus allow us to perform library selection at reasonable antibiotic concentrations. For example, in the bicistronic system, at 2x carb and 0.5% arabinose induction, GLF grew at 10^{-2} cell dilution while scFvp17 grew at 10^{-3} cell dilution which means we could perform our library selection using 2x carbenicillin concentration or slightly higher concentration.

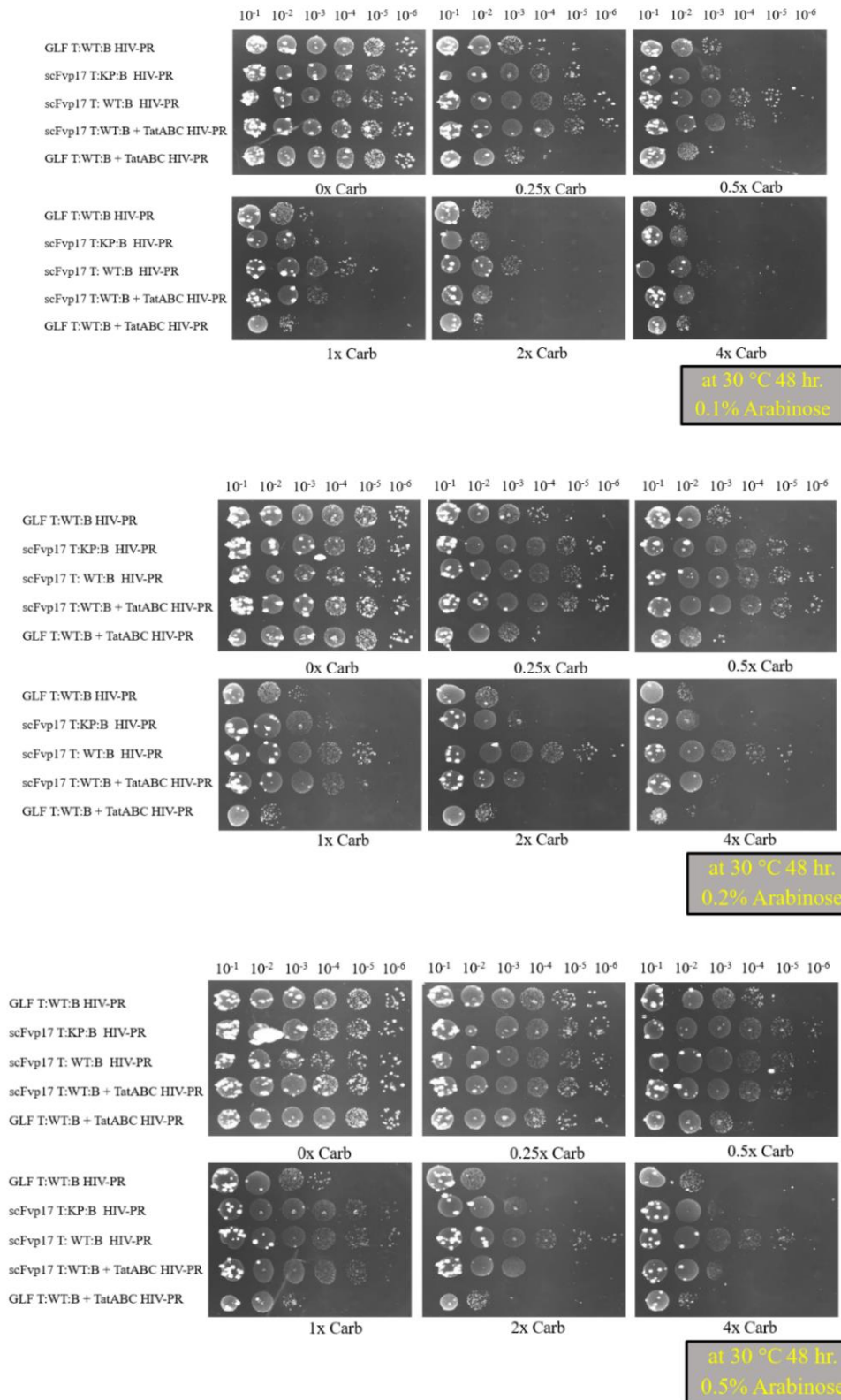


Figure 8. Comparison of tricistronic and bicistronic system for selection of scFvp17 that binds HIV antigens. Selective plating of serially diluted cells expressing different antigen-antibody pairs on Carb as indicated. Each spot corresponds to 5 μ L of serially diluted cells.

On the other hand, scFvp17 could still grow to 10^{-6} cell dilution even at 4x in the tricistronic system which means if we were to use this system for library selection, we will require much higher carbenicillin concentration which could be too toxic to the cells to overcome. We speculated that cleavage of HIV-PR was more effective because pDD322 TatABC HIV-PR was under a constitutive promoter thus when synthetic *E. coli* was grown in the overnight culture these plasmids could produce TatABC and HIV-PR immediately allowing the presence of HIV-PR in *E. coli* from the beginning and, after adding arabinose for induction of the promoter of bicistronic vector (pDD18scFvp17 ssTorAp17dp24Bla) to produce scFv and substrate, HIV-PR could immediately cleave the substrate resulting in less background growth. This condition was more appropriate than the tricistronic vector because the tricistronic system produced scFv, substrate and HIV-PR at the same time thus HIV-PR was not saturating the system immediately resulting in transportation of uncleaved ssTorAp17dp24Bla, which simply escape HIV-PR, into the periplasm.

4.4 *In Vitro* testing of the Design Systems

Western blot technique was used to confirm the presence of ssTorAp17dp24Bla fusion protein in the cytoplasmic or the periplasmic fraction. If the presence of WT p17dp24 can be detected in the periplasmic fraction, the result will confirm that cell resistance observed in the previous *in vivo* experiment is due to transport of uncleaved ssTorAp17dp24Bla from the cytoplasm to the periplasm of *E. coli*. Subcellular fractionation was the method used for preparing periplasmic and cytoplasmic fractions, which allowed detection of the protein in different compartments. Figure 9 shows detection of ssTorAp17p24Bla using anti-Bla antibody. It was expected that if the HIV-PR substrate was not cleaved we would be able to detect the fusion protein via Bla that was on the C-terminus in both the cytoplasmic and periplasmic fractions and the size of the substrate was expected to be 58.5 kDa.

Figure 9 confirms that the system was functioning because the size of the band around 60 kDa was present in the periplasmic fractions when scFvp17 was co-expressed with the HIV-PR substrate, the amount of WT p17dp24 in the periplasmic fraction was higher than that of YPKP while there was no WT p17dp24 detected in the periplasmic fraction when co-expressed with GLF. The results were in agreement with the *in vivo* results which was hypothesized that the system, comprised of protease activity detecting device, protease generator device, and protease blocker device, was expressed solubly and transport occurred when the correct scFv, i.e. scFvp17, was paired with the substrate while, in the incorrect pair's case (GLF-p17), the substrate could not be transported to the periplasm due to scFvGLF's inability to protect

proteolytic cleavage site of HIV-PR substrate. Unfortunately, there were some higher molecular weight bands that we were unsure of but speculating to be complex of substrate with scFv and/or HIV-PR that were not separated when the samples were prepared.

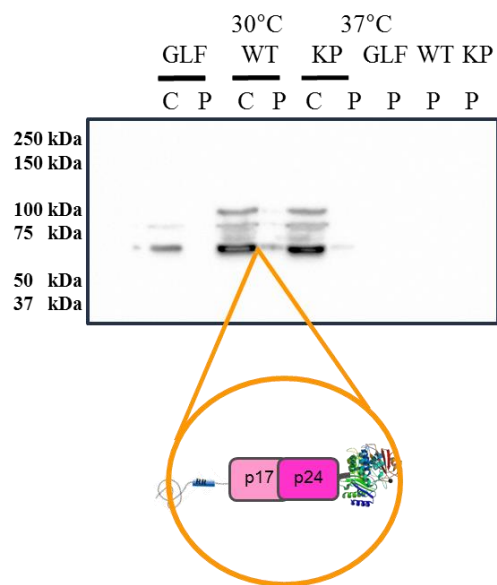


Figure 9 Western blot analysis of transport.

Detection of ssTorAp17p24Bla was performed using anti-Bla antibody. The expected size is 58.5 kDa Lane 2-7 are cytoplasmic (C) and periplasmic (P) fractions expressed at 30°C of GLF+scFvssTorAp17p24Bla (negative control), scFvp17+ssTorAp17p24Bla and scFvp17+ssTorAp17p24(YPKP)Bla (positive control), respectively. Lane 8-10 are periplasmic fractions of the same order but expressed at 37 °C.

Figure 10 is depicting a western blot result showing detection of scFv using anti-FLAG antibody to detect the FLAG epitope tag fused to the C-terminus of each scFv. It was found that scFvp17 was produced at a much higher level than GLF, which was previously reported that GLF had quite low solubility [40]. In this case, we found that both scFvs presented in the cytoplasmic fraction only. This could be due to separation of the scFv during the harsh transport of the substrate or its low amount rendering it undetectable.

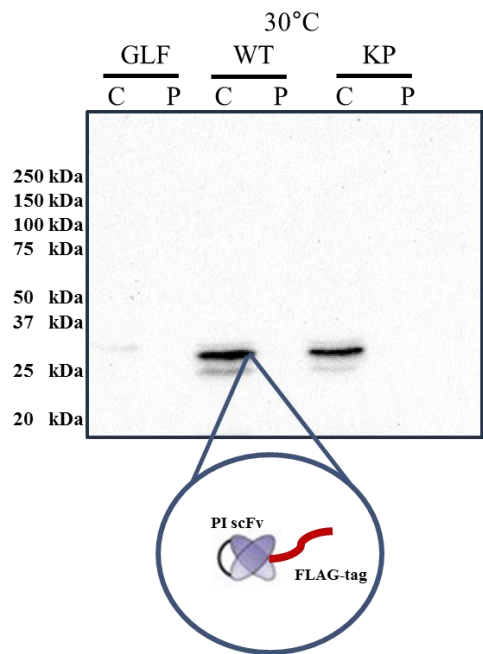


Figure 10 Western blot analysis of scFv expression.

Detection of level of expression of various scFvs was performed using anti-FLAG antibody. The expected size is 28 kDa. Lane 2-7 are cytoplasmic (C) and periplasmic (P) fractions expressed at 30°C of GLF+scFvssTorAp17p24Bla (negative control), scFvp17+ssTorAp17p24Bla and scFvp17+ssTorAp17p24(YPKP)Bla (positive control), respectively.

Finally, this technique confirmed that 30°C was the appropriated temperature of protein expression, which was also in good agreement with the results from spot plating technique as, in lane 9-10, there were no bands of both substrate (Fig. 9) and scFv (Fig. 10) which could be due to aggregation of proteins resulting in inclusion bodies when expressed at high temperature

4.5 Determination of library selection conditions

Because the system showed potentials for isolation of protease-inhibiting intrabodies, we wanted to test the system further by isolating intrabodies that can protect proteolytic cleavage better than the wild-type scFvp17. We first have to identify the conditions that are appropriate for isolation of scFvp17 error-prone library. This step involves extrapolation of spot plating results such that the appropriate number of cells can be spread onto the library selection plate and the PI isolation can be performed at appropriate conditions. The mutant library could be selected using the conditions identified in section 4.3, which were 200 µg/mL Carb and 0.5% arabinose induction using bicistronic system where wild type scFvp17 grew at 10⁻³ fold dilution, and scaling up the plating volume since larger surface area will be applied when the cells are spread onto a whole petri dish. The volume of mutant culture that should be placed on a selection plate could be estimated by scaling up the number of cells in the last spot (most diluted) that was grown at each condition. It is generally estimated that there are ~10⁹ cells/OD600 unit in 1 ml of the culture. This approximation was used with dilution factor to estimate the number of cells that should be placed on the library selection plate. The scaling up could be calculated by assuming that a spot has approximately 6-mm diameter, and a 100-mm petri dish (used as a selection plate) has approximately 85-mm inner diameter. Therefore, 200 times of 5 µl sample was required for a selection plate. As our WT scFvp17 grew at 10⁻³ fold dilution as shown in figure 11, this means the cell dilution used for library selection should be 10⁻⁴ fold dilution and the number of cells to be plated for library screening can be calculated using the equation demonstrated below

$$2.5 \times \frac{10^9 \text{ cells}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ ml}}{1000 \mu\text{l}} \times 100 \mu\text{l} \times 10^{-3} = 2.5 \times 10^5 \text{ cells}$$

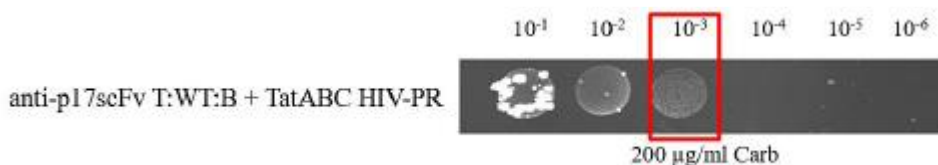


Figure 11 Identification of culture cell dilution for library selection condition. The rectangle box highlights the last dilution that the wild type anti-p17 scFv can grow which was used to identify selection condition of the enhanced mutant scFvs from a library.

Nonetheless, the condition which was selected to isolated the mutant library was 0.5% arabinose, Carb concentrations between 200 - 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 10^{-3} fold dilution of normalized overnight cell culture, respectively. It is noteworthy that when the library selection was performed, the WT scFv should also be plated at the exact same conditions and positive hits (mutant scFvs) should only be selected from the plates at conditions which WT scFv did not grow.

4.6 Single-step isolation of protease cleavage inhibiting intrabodies

We tried to use PROTECT method to isolate mutant scFvp17 which may have higher solubility and/or affinity thus can inhibit proteolytic cleavage more efficiently. In order to do so, we created mutant scFvp17 library using error prone PCR method. pDD18 plasmid containing bicistronic system was used because the cells containing bicistronic version did not grow as well at high Carb concentration allowing us to perform library selection at reasonable antibiotic concentrations from 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and up. Firstly, we created the mutant scFvp17 library using GeneMorph® II EZClone Domain Mutagenesis Kit. The size of the library was estimated to be 10^8 clones. 15 colonies were randomly selected prior to screening and submitted to sequencing to estimate the mutation rate, which was found to be 1 – 5 bp per gene (729 bp) (figure 12). After that, the library was co-transformed pDD322 Tat ABC HIV-PR into MC4100 cells for isolation procedure. The mutant scFvp17 was isolated at 200 – 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10^{-3} dilution and incubated at 30 °C. The cell resistance of colonies that grew at 48 h were confirmed by comparing their cell resistance to the WT scFv using spot plating technique.

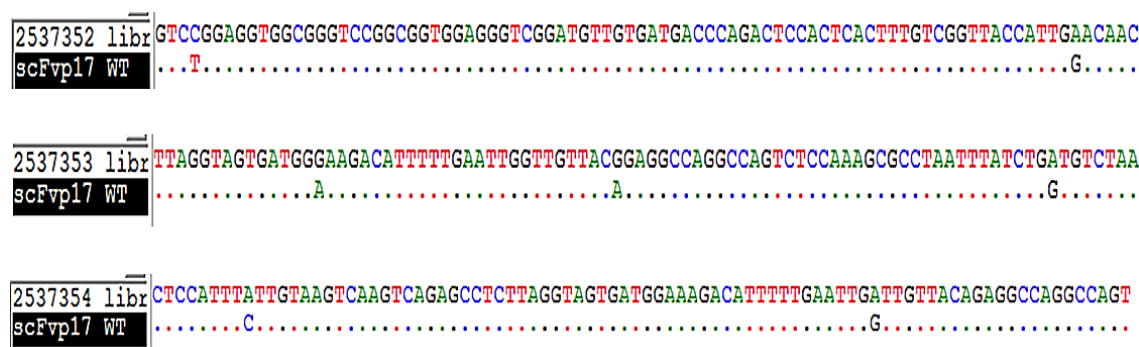


Figure 12 **Estimation of mutation rate of the error prone scFvp17 library.** Examples of sequencing results of some randomly selected colonies, which were picked prior to library screening.

Figure 13 illustrated the cell resistance of the isolated mutant scFvp17s compared with WT scFvp17. The colonies number 2, 3, 6, 7 and 9 were isolated from 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Carb, 10^{-3} dilution and 0.5% arabinose. The colonies number 10, 12, 15, 18, 25, 27 and 28 were isolated from 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ carb, 10^{-3} dilution and 0.5% arabinose. No colonies grew on the plate

containing 400 $\mu\text{g/ml}$ carb, 10^{-3} dilution and 0.5% arabinose. From the spot plating results, every colony except number 3 and 9 grew on antibiotic plate better than wild type scFvp17.

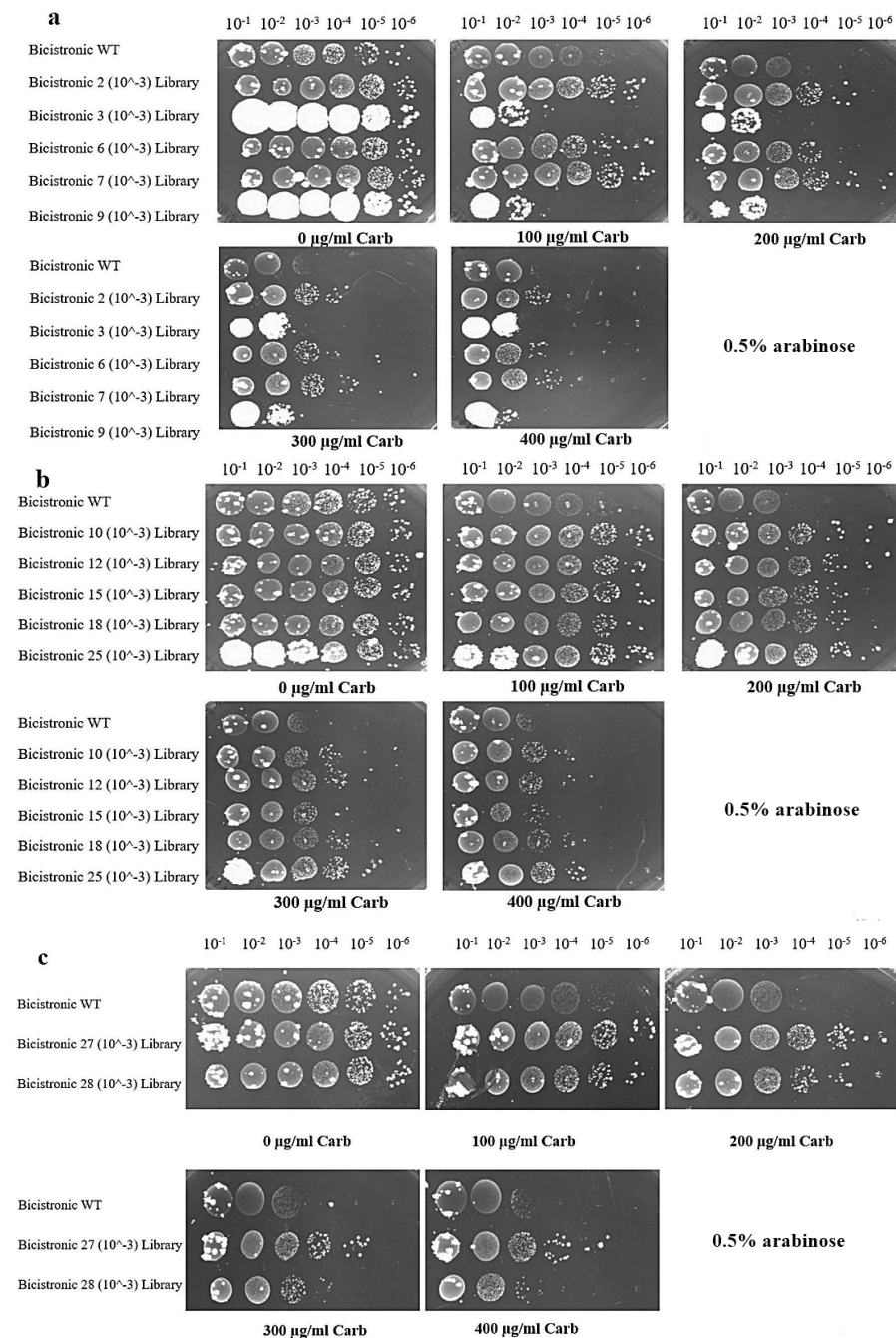


Figure 13 Selective plating of serially diluted cells expressing isolated scFv mutants on LB agar plates containing 0.5% Arabinose and various Carb concentrations and incubated at 30 °C. Each spot corresponds to 5 μL of serially diluted cells. The mutants were isolated from error prone scFv library by spreading 100 μL of 10^{-3} fold dilution of overnight culture normalized to OD600 = 2.5 onto LB agar plates containing 0.5% arabinose and 200 $\mu\text{g/ml}$ or 300 $\mu\text{g/ml}$ Carb.

These isolated mutants were also subjected to sequencing analysis. However, the sequencing results revealed that the results were not what we expected. Basically, our expected DNA sequence was one copy of mutant scFvp17, followed by RBS (for the fusion protein) and fusion protein, respectively as illustrated in figure 14. To our surprise, it was found that the colonies number 6, 7, 15 and 28 contained 2 copies of WT scFvp17 (figure 15A). The colony number 2 contained 1 copy of scFvp17 and 1 copy of mutant scFvp17 (figure 15B). The colony number 3 contained a truncated version of WT scFvp17 (figure 15C). The number 10 and 12 contained 1 copy of deleted version of mutant scFvp17 and 1 copy of WT scFvp17 (figure 15D). The colonies number 18, 25 and 27 contained 2 copies of mutant scFvp17 (figure 15E). Figure 15F shows the sequence of colony number 9 which contained only 1 copy of mutant scFvp17 as expected but the its cell resistance was not more than WT scFvp17 as shown in figure 15 (spot plating method). Note that the highlights show in figure 15 represent the end of the first scFvp17 (WT or mutant), ribosome binding site and the beginning of the second scFvp17 (also WT or mutant). From all the results, it can be concluded that most colonies isolated from the library contained 2 copies of scFv (protease blocking device) which could be due to the plasmid creation step (step2) of the GeneMorph® II EZClone Domain Mutagenesis Kit which uses PCR method to synthesize the whole plasmid. Hence, in this step, 2 copies of megaprimer (mutant scFvp17 fragment) could be inserted and formed a new plasmid (figure 16). Therefore, we changed the error-prone kit to GeneMorph II Random Mutagenesis Kit, which was used to create megaprimer only and the standard cloning protocol (digestion and ligation) was used to insert the mutant scFv gene into the plasmid and solved the problem of insertion of 2 copies of scFv. Nonetheless, despite unexpected results, it can be implied that the system probably was functioning as designed, which was to isolate mutant scFvs that can inhibit proteolytic cleavage better than WT can. However, since the library quality was not good, the colonies that passed the screen only turned out to be cells carrying plasmids with multiple copies of scFvs which probably can inhibit proteolytic cleavage better just because there are more amount of the scFv inside the cells.

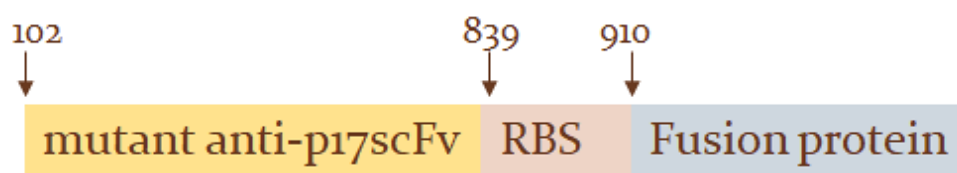


Figure 14 The expected sequences of the plasmid from error prone PCR by GeneMorph® II EZClone Domain Mutagenesis Kit.

a

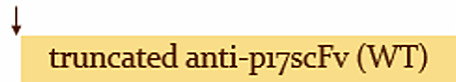
2695184 Lib	AAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCT
scFvp17 (doubt)	-----
2695184 Lib	ACAAGGACGATGACGACAAAGGATAAGGTACCTAACTAATTAAAGAGGAGAAAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGA
scFvp17 (doubt)	-----
2695184 Lib	AGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCTGGATATACCTTCACAGACTATGGAATGAACCTGGATGAAACAGGCT
scFvp17 (doubt)	-----

**b**

2695182 Lib	AAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCT
scFvp17 (doubt)	-----
2695182 Lib	TACAAGGACGATGACGACAAAGGATAAGGTACCTAACTAATTAAAGAGGAGAAAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGG
scFvp17 (doubt)	-----
2695182 Lib	AGGAAAGAGTTTAAAGTGGATGGGTGGATAAACACCTACACCGGAAAGCCAAACATATGCTGATGAATTCAGGGACGGTTTGCT
scFvp17 (doubt)	-----

**c**

2695183 Lib	AAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCT
scFvp17 std	-----
2695183 Lib	CGGCGGTGGAGGTACCAAGCTGGAATTCAAAGTCGACCTGCAGGGAGCAGACTACAAGGACGATGACGACAAAGGTAAGGTACCT
scFvp17 std	-----

**d**

2695186 Lib	AAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCT
scFvp17 (doubt)	-----
2695186 Lib	ACCTTCACAGACTATGGAATGAACCTGGATGAAACAGGCTCCTGGAAAGAGTTTAAAGTGGATGGGTGGATAAACACCTACACTGG
scFvp17 (doubt)	-----
2695186 Lib	GGTCACTGTCTCTGCAGGTGGCGAGGGTCTGGAGGTGG-GGGTCCGGCGGTGGAGGGTCCGGATGTTGTGATGACCCAGACTCCAC
scFvp17 (doubt)	-----
2695186 Lib	GGACGATGACGACAAAGGATAAGGTACCTAACTAATTAAAGAGGAGAAAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTG
scFvp17 (doubt)	-----
2695186 Lib	AAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCTGGATATACCTTCACAGACTATGGAATGAACCTGGATGAAACAGGC
scFvp17 (doubt)	-----

**e**

2695189 Lib	AAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCT
scFvp17 (doubt)	-----
2695189 Lib	GAAATCAAGGGACGGTTTGCTTTTCTTTGGAAACCTATGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAGTGAGGCAT
scFvp17 (doubt)	-----
2695189 Lib	TTCTGTTCAAGATCTATGAAAGGTTCTTATTGGAGCCCAAGGACTCTGGTCACCTGCTCTGCAGGTGGCGAGGGTCTGGAGGTGG
scFvp17 (doubt)	-----
2695189 Lib	CAAGGACGATGACGACAAAGGATAAGGTACCTAACTAATTAAAGAGGAGAAAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGA
scFvp17 (doubt)	-----
2695189 Lib	CCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCAGCAAGGCCTCTGGATATACCTTCACAGACTATGGAATGAACCTGGAT
scFvp17 (doubt)	-----



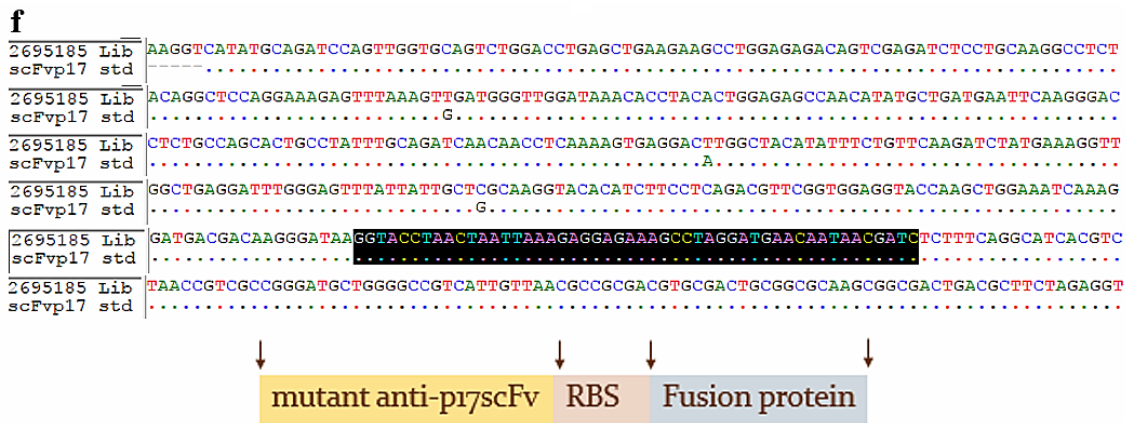


Figure 15 Sequencing analysis of the isolated anti-p17 scFv mutants. The sequencing results were analyzed by BioEdit program. (A) colonies number 6, 7, 15 and 28 showing 2 copies of wild type scFvp17, (B) colonies number 2 showing 1 copy of WT scFvp17 and 1 copy of mutant scFvp17, (C) colonies number 3 showing truncated scFvp17, (D) colonies number 10 and 12 showing 1 copy of mutant scFvp17 with some deletions and 1 copy of mutant scFvp17, (E) colonies number 18, 25 and 27 showing 2 copies of mutant scFvp17 and (F) colony number 9 showing an expected sequence which is 1 copy of mutant scFv::ribosome binding site::fusion protein (p17dp24).

In the abovementioned, we had to change the commercial kit for creating the error prone library from GeneMorph[®] II EZClone Domain Mutagenesis Kit to GeneMorph II Random Mutagenesis Kit to resolve the issue with insertion of multiple copies of scFv. The mutation rate for the new kit was chosen to be the same as the previous library construction experiment. Unfortunately, after a few attempts, the new library size was only 8×10^4 . We decided to move forward and tried to isolate enhanced scFv from this library by spread plate method. For the first isolation attempt, we isolated the mutant anti-p17scFv with 200-400 $\mu\text{g/ml}$, 10^{-3} - 10^{-4} dilution, 0.5% arabinose and incubated at 30°C for 48h. But we observed no growth on the selection plates of both mutant anti-p17 scFv library and WT anti-p17 scFv. Therefore, we attempted to perform library selection again by changing the cell fold dilution from 10^{-3} - 10^{-4} to 10^{-2} - 10^{-3} keeping the other conditions the same. Although, we changed the cell fold dilution, which also means more number of cells to be tested, but we still observed no growth as before. Next, we changed the condition again by increasing the percentage of arabinose used as the inducer from 0.5% to 1% as well as decreasing the concentration of Carb antibiotic with 10^{-2} - 10^{-3} dilution and incubated at 30°C for 48h. Our expected result for this experiment was that we would observe no growth for WT scFv and the positive hits of mutant-p17 scFv would grow on selection plate after 48 h.

GeneMorph II EZClone Method

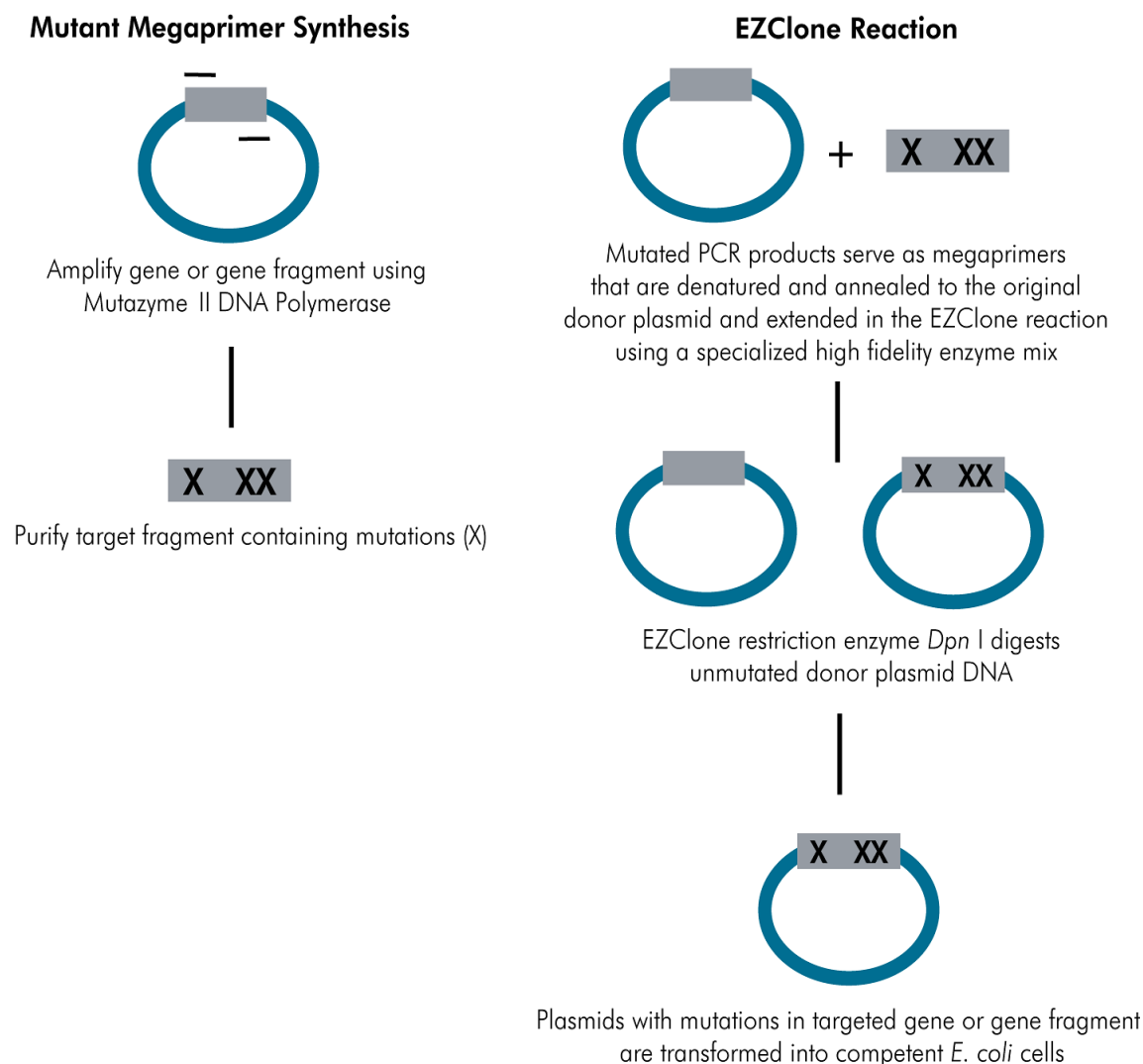


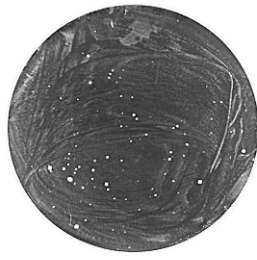
Figure 16 Principles of GeneMorph® II EZClone Domain Mutagenesis Kit method.
(<https://www.biocompare.com/20737-Mutagenesis-Kits/87730-GeneMorphreg-II-EZClone-Domain-Mutagenesis-Kit/>)

Moreover, we plated the library on 4 times more number of plates as previous experiments because we wanted to enhance the opportunity to isolate positive hits. Unfortunately, the results were not what we expected. It was found that the WT scFv plates at 10^{-2} dilution had colonies and, in fact, there were more number of colonies than the mutant scFv plates at the same dilution. While WT scFv plates had around 10 colonies, the mutant scFv plates had only one or two colonies. On the other hand, at 10^{-3} dilution we observed no growth from both WT and mutant scFv plates (figure 17A-D). It can be implied from these

results that the mutations on the scFvp17s in the library probably had protection efficiency less than that of WT and/or their solubilities were low. In conclusion, we could not isolate any mutant scFvp17s which have protection efficiency more than that of WT scFv. We speculated that the reason is due to the low quality of the library. As a random mutation kit was used for construction of the library, we could not manage or design the mutated positions on scFv which were relevant to enhancement of the affinity and/or the solubility. Typically, when random mutagenesis approach is used, most mutations are deleterious, therefore, the library size should be big enough such that some enhanced mutants would be present in the library pool. For example, Waraho *et al.* reported that they could isolate enhanced anti-GCN4 scFv from a library comprising 10^6 clones [40]. However, our library size was only estimated to be 8×10^4 . An alternative approach would be to use computational method to identify some mutated locations and/or amino acid mutations on the scFvp17 which would improve its affinity or solubility allowing us to create a library with higher quality mutants. A computational method had been used to construct the model of scFvp17 binding to the C-terminus of p17 [46]. Similar method can be used to mutate the WT scFvp17 model and dock with the sequence of the cleavage site to find some suggested mutations that would improve the inhibiting efficiency. In fact, we propose to investigate mutations on the CDR region to enhance the efficiency of scFvp17. Because CDR region is the specific binding site of scFv, therefore, mutations of some amino acids which change the charge of the CDR may increase binding with the substrate. In addition, the computational method may be used to mutate in other site besides the CDR such that solubility may be enhanced.

a

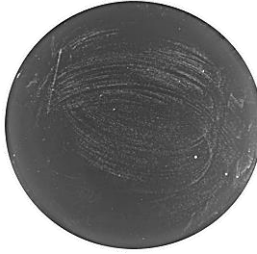
WT 10^{-2} dilution at 1% Ara



100 µg/ml Carb

150 µg/ml Carb

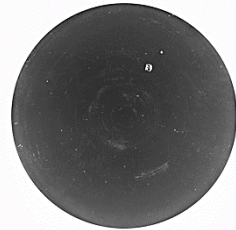
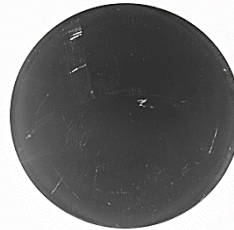
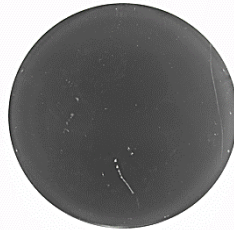
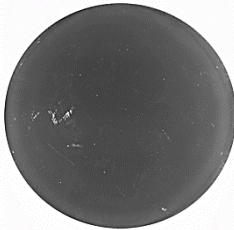
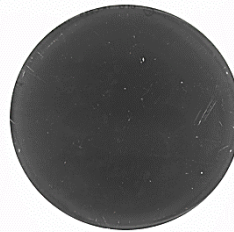
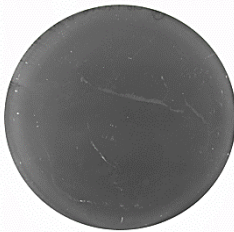
200 µg/ml Carb



WT 10^{-3} dilution at 1% Ara

b

Library 10^{-2} dilution, 100 µg/ml Carb and 1% Ara (1-4)



Library 10^{-3} dilution, 100 µg/ml Carb and 1% Ara (1-4)

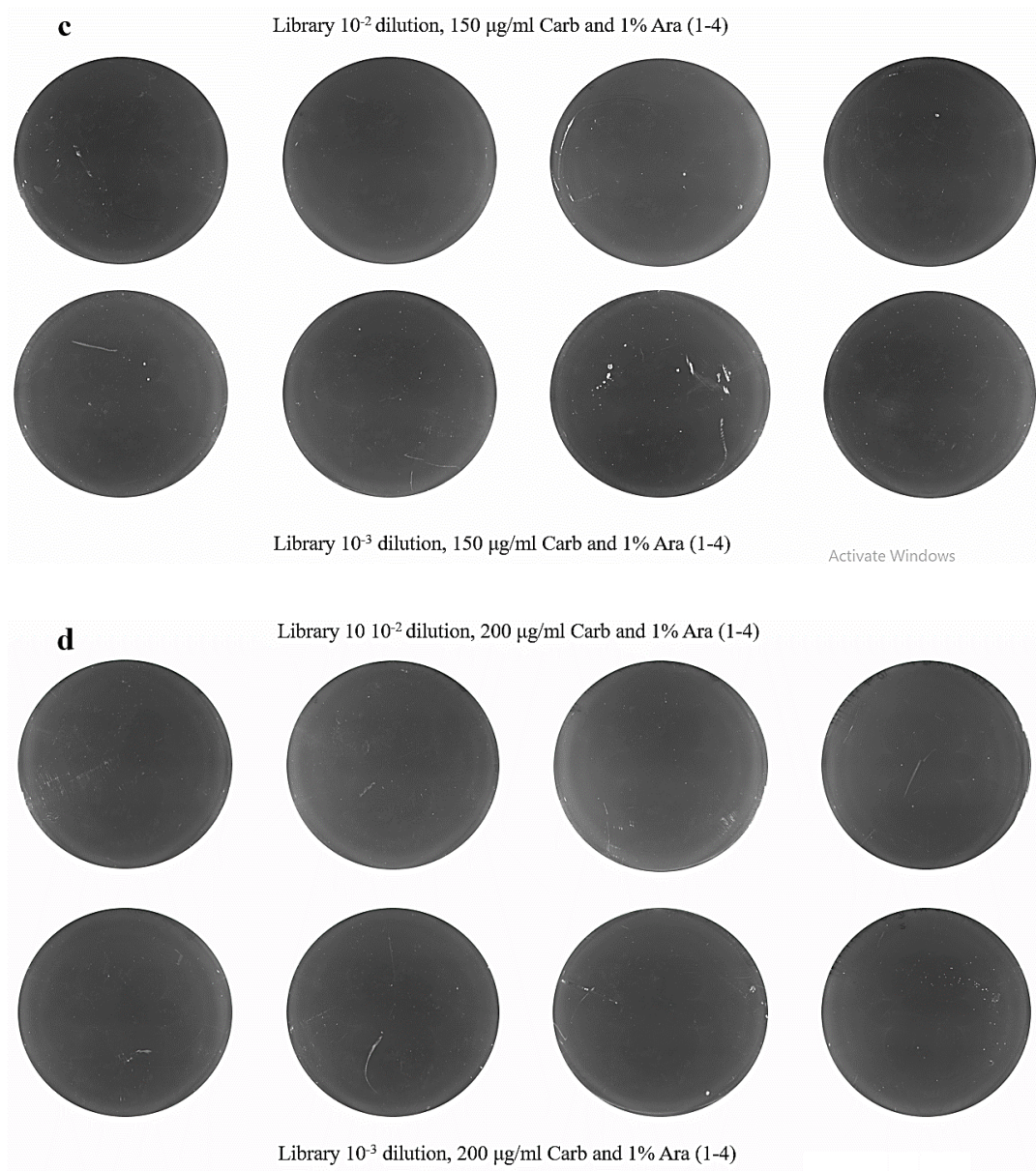


Figure 17 The selection plates for library selection. Cells carrying plasmid library were spread onto 100-mm petri dish. The conditions used for library selection were 10^{-2} and 10^{-3} dilutions, 100, 150 and 200 $\mu\text{g/ml}$ Carb and 1% arabinose (A) the results of WT scFvp17 in each condition (used as control) and (B-D) the results of mutant scFvp17 library at 100, 150 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of antibiotic, respectively.

5. Conclusions and Future works

Using synthetic biology approach, we successfully created a synthetic *E. coli* protease inhibitor detecting biomachine based on the Tat pathway. The system is comprised of 3 devices; first, the protease activity detector device (ssTorA::substrate p17dp24::Bla), which contains the protease cleavage site or the substrate for the protease, second, the protease generator device (HIV protease) which is an enzyme that cleaves the HIV-1 substrate and, third, the protease blocking device (scFvp17) which acts as a protease inhibitor to protect the proteolytic cleavage on the substrate. Moreover, the natural transport mechanism of the Twin-arginine translocation (Tat) pathway was utilized as a biological tool to select the appropriate scFvs for inhibition of HIV-1 protease's activity. We modified FLI-TRAP and ISELATE [7,10] principles to utilize the unique protein transportation ability of the Tat pathway. The spot plating results showed that the scFvp17 can bind and protect the proteolytic cleavage site of HIV-1 substrate as the synthetic *E. coli* could grow on beta-lactam antibiotic plate. Furthermore, *in-vitro* experiment (western blot technique) confirmed that the cells resistance was due to translocation of the substrate as the cleavage of the substrate was prevented by scFv and the fusion protein was transported to the periplasm of the synthetic *E. coli*. From these experiment, it can be concluded that (i) the designed system functioned as expected as shown by the difference of cell resistance between our tested system and negative control and (ii) scFvp17 itself can block proteolytic cleavage on p17/p24 cleavage site even though it binds to the C-terminus of p17 not the p17/p24 cleavage site directly. After that, we constructed an error prone scFvp17 library using a commercial mutation kit. The library was used for isolation of enhanced scFvp17 by spread plate and spot plate techniques. Unfortunately, none of the improved scFvp17 variants which could protect the cleavage site of substrate better than WT scFvp17 were found as no growth on the antibiotic plate was observed at the conditions where WT scFvp17 did not grow. We speculated from the results that the library size was too small which means the repertoire of the mutant scFv was not big enough to provide many advantageous mutations, and as a consequence, there was less opportunity to find any mutant scFvs which had the protection efficiency higher than that of WT scFvp17. Nonetheless, our work demonstrated that scFvp17 has the ability to fold in the reducing environment of the cytoplasm of *E. coli* and can protect the proteolytic cleavage of p17dp24 substrate. Therefore, through our model system, we proofed that our designed system can be used to isolate protease inhibitor because we can detect growth when substrate-specific scFv that could protect proteolytic cleavage was co-expressed with protease and substrate and there was no growth observed when a non-related scFv was used instead (negative control).

This current work clearly shows the ability of our assay as a selection platform of protease inhibiting intrabodies.

For future work, we propose that experimental approach can be improved by combining with the computation approach. Computational method had been used to create the model of scFvp17. Therefore, this model can be mutated to find the best three models which can protect the proteolytic cleavage site of HIV-1 protease's substrate. After that, the models can be applied to our system and tested experimentally again to verify that the mutant models actually have better protection efficiency than WT scFv as suggested by the result from computational method. Moreover, this PROTECT technique should be tested with other antigen-scFv system to proof its versatility against other targets.

6. References

1. Drag, M. and G.S. Salvesen, *Emerging principles in protease-based drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(9): p. 690-701.
2. Insight Pharma Reports Protease inhibitors: Innovations drive drug pipeline.
3. Comprehensive, up-to-date information on HIV/AIDS treatment, prevention, and policy from the University of California San Francisco. <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=ar-05-01>, 2012.
4. Breithaupt, H., *The engineer's approach to biology*. EMBO Rep, 2006. **7**(1): p. 21-3.
5. Ruder, W.C., T. Lu, and J.J. Collins, *Synthetic biology moving into the clinic*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1248-52.
6. Edwards, C., *2008 saw surge in synthetic biology funding*. <http://blog.thebiomachine.com/>, 2010.
7. Waraho, D. and M.P. DeLisa, Versatile selection technology for intracellular protein-protein interactions mediated by a unique bacterial hitchhiker transport mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3692-7.
8. Berks, B.C., A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? Molecular Microbiology, 1996. **22**(3): p. 393-404.
9. Palmer, T., F. Sargent, and B.C. Berks, *Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway*. Trends In Microbiology, 2005. **13**(4): p. 175-180.
10. Fisher, A.C. and M.P. DeLisa, Efficient isolation of soluble intracellular single-chain antibodies using the twin-arginine translocation machinery. J Mol Biol, 2009. **385**(1): p. 299-311.

11. DeLisa, M.P., D. Tullman, and G. Georgiou, *Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 2003. **100**(10): p. 6115-6120.
12. Rodrigue, A., et al., Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13223-8.
13. Koch, H., et al., Direct selection of antibodies from complex libraries with the protein fragment complementation assay. J Mol Biol, 2006. **357**(2): p. 427-41.
14. Georgiou, G., et al., Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. Nat Biotechnol, 1997. **15**(1): p. 29-34.
15. Chen, G., et al., Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS). Nat Biotechnol, 2001. **19**(6): p. 537-42.
16. Visintin, M., et al., The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies. J Mol Biol, 2002. **317**(1): p. 73-83.
17. Visintin, M., et al., In vivo selection of intrabodies specifically targeting protein-protein interactions: a general platform for an "undruggable" class of disease targets. J Biotechnol, 2008. **135**(1): p. 1-15.
18. Baneyx, F., *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 411-21.
19. Swartz, J.R., *Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(2): p. 195-201.
20. Jana, S. and J.K. Deb, Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol, 2005. **67**(3): p. 289-98.
21. Dyson, M.R., et al., Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: identification of protein features that correlate with successful expression. BMC Biotechnol, 2004. **4**: p. 32.
22. Knaust, R.K. and P. Nordlund, Screening for soluble expression of recombinant proteins in a 96-well format. Anal Biochem, 2001. **297**(1): p. 79-85.
23. Lesley, S.A., High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world. Protein Expr Purif, 2001. **22**(2): p. 159-64.
24. Dayer, M.R. and M.S. Dayer, *Whiskers-less HIV-protease: a possible Way for HIV-1 deactivation*. J Biomed Sci, 2013. **20**(1): p. 67.
25. UNAIDS Thailand. <http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/thailand/>, Accessed on 29 September 2013.

26. UNAIDS 2008 Report on the global AIDS epidemic. 2008.
27. Adamson, C.S., K. Salzwedel, and E.O. Freed, *Virus maturation as a new HIV-1 therapeutic target*. Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(8): p. 895-908.
28. Nair, V. and G. Chi, *HIV integrase inhibitors as therapeutic agents in AIDS*. Rev Med Virol, 2007. **17**(4): p. 277-95.
29. Hughes, A., T. Barber, and M. Nelson, New treatment options for HIV salvage patients: an overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists. J Infect, 2008. **57**(1): p. 1-10.
30. Este, J.A. and A. Telenti, *HIV entry inhibitors*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 81-8.
31. Adamson, C.S. and E.O. Freed, *Recent progress in antiretrovirals--lessons from resistance*. Drug Discov Today, 2008. **13**(9-10): p. 424-32.
32. Soriano, V., et al., *Optimal use of maraviroc in clinical practice*. Aids, 2008. **22**(17): p. 2231-40.
33. Evering, T.H. and M. Markowitz, *Raltegravir: an integrase inhibitor for HIV-1*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(3): p. 413-22.
34. Daar, E.S., Emerging resistance profiles of newly approved antiretroviral drugs. Top HIV Med, 2008. **16**(4): p. 110-6.
35. Richman, D.D., et al., *The challenge of finding a cure for HIV infection*. Science, 2009. **323**(5919): p. 1304-7.
36. Brass, A.L., et al., Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. Science, 2008. **319**(5865): p. 921-6.
37. Konig, R., et al., Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. Cell, 2008. **135**(1): p. 49-60.
38. Rerks-Ngarm, S., et al., Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. N Engl J Med, 2009.
39. DeLisa, M.P., D. Tullman, and G. Georgiou, Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6115-20.
40. Waraho-Zhmayev, D., et al., Optimizing recombinant antibodies for intracellular function using hitchhiker-mediated survival selection. Protein Eng Des Sel, 2014. **27**(10): p. 351-8.
41. Robert-Hebmann, V., et al., Clonal analysis of murine B cell response to the human immunodeficiency virus type 1 (HIV1)-gag p17 and p25 antigens. Mol Immunol, 1992. **29**(6): p. 729-38.

42. Tewari, D., et al., cDNA encoding a single-chain antibody to HIV p17 with cytoplasmic or nuclear retention signals inhibits HIV-1 replication. *J Immunol*, 1998. **161**(5): p. 2642-7.
43. Erickson-Viitanen, S., et al., Cleavage of HIV-1 gag polyprotein synthesized in vitro: sequential cleavage by the viral protease. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1989. **5**(6): p. 577-91.
44. Bryksin, A.V. and I. Matsumura, Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 2010. **48**(6): p. 463-5.
45. Tritch, R.J., et al., Mutagenesis of protease cleavage sites in the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein. *J Virol*, 1991. **65**(2): p. 922-30.
46. Lee, V.S., et al., Pairwise Decomposition of Residue Interaction Energies of Single Chain Fv with HIV-1 p17 Epitope Variants. *Molecular Immunology*, **47**(5):p. 982-990.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การเสนอผลงานและผลงานตีพิมพ์ในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
Boonyalekha, P., Meechai, A., Tayapiwatana, C., Kitidee K. and Waraho-Zhmayev, D. 2017. Design and construction of a synthetic *E. coli* protease inhibitor detecting biomachine. *The 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'17)*, Jeju Island, Korea, July 11-15, 2017. 3580-3583.
2. การจดสิทธิบัตรการประดิษฐ์
เลขที่บันทึกข้อตกลง A256003252 (วันที่ 7 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2560)
ชื่อ องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการ
ขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์

ภาคผนวก ก.

การเสนอผลงานและผลงานตีพิมพ์
ในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Design and construction of a synthetic *E. coli* protease inhibitor detecting biomachine

P. Boonyalekha, A. Meechai, C. Tayapiwatana, K. Kitidee and D. Waraho-Zhmayev

Abstract— Protease inhibitors (PIs) have been used to treat various types of symptoms or diseases. However, current PIs block the protease activity by targeting the protease active site which has been shown to be sensitive to the off-target effect due to crossreactivity with protease homologues. An alternative approach to inhibiting protease activity is to target the substrate, specifically by blocking the substrate cleavage site. We propose to employ synthetic biology approach to create a synthetic *E. coli* to be used as a protease inhibitor detecting biomachine that can effectively isolate intrabodies, a new generation of protease inhibitor drug. The *in vivo* selection system, comprised of three biological devices, i.e., protease activity detector, protease generator and protease blocking devices, is based on the ability to transport folded protein of the *E. coli* twin-arginine translocation (Tat) pathway and antibiotic resistance of TEM-1 β -lactamase (Bla) using as reporter protein. By linking protease degradation to antibiotic resistance, we can isolate the suitable intrabodies simply by plating cells containing appropriate devices on solid agar containing β -lactam ring antibiotics. As a proof of concept, we applied a previously isolated HIV-1 p17 intrabody (scFvp17) that binds to the C-terminus of HIV-1 matrix protein (p17) to our synthetic *E. coli*. This work demonstrated that binding of scFvp17 to its epitope on p17 can physically interfere with HIV-1 protease activity and inhibit proteolytic cleavage at the p17 Δ p24 cleavage site when expressed in the designed format. The device was optimized by varying plating conditions such as incubation temperatures, induction levels, and Carbenicillin concentrations which was used as selection pressure. The feasibility of this assay has opened the door to protease inhibitor selection which can be used for various applications such as optimization of the current protease inhibitors and selection of new ones.

Keywords—Twin-arginine translocation pathway; proteolytic cleavage site; intracellular antibody; protease inhibitor; HIV-1; HIV protease; FLI-TRAP; ISELATE; synthetic biology, *E. coli*

I. INTRODUCTION

Proteases (PR) are a large enzyme family that catalyzes proteolysis of a peptide bond in specific substrates. They are considered one of the largest classes of potential drug targets for the pharmaceutical industry. However, as we have learned from the current PI regime, targeting the protease itself may risk facing the severe adverse effect due to cross-reactivity of the PI to the homologues of the target protease which are essential to human body. Therefore, alternative approach for

proteolytic cleavage inhibition is now focused on targeting the cleavage site of the substrate instead of the protease active site.

Synthetic biology is a new interdisciplinary research field which focuses on engineering biomolecular systems and cellular capabilities for a variety of applications. To avoid off-target effects, we propose to use synthetic biology approach to engineer *Escherichia coli* (*E. coli*) as a general platform for isolating intracellular antibodies (intrabodies) that, upon binding to the protease substrate, can interfere with substrate-protease interaction and, consequently, inhibit the protease function. Intrabodies are antibody fragments that are soluble and can function inside the reducing environment of the cell's cytoplasm. One of the most common format is termed single chain variable fragment (scFv) which is comprised of variable regions of heavy and light chains connected by a flexible linker thus represent the recombinant minimal antigen-binding fragments of antibodies [1]. Many researchers have reported the potentials of intrabodies in treatment of various diseases, for example, scFvs targeting erbB2, p53, or Caspase 3 for cancer and HIV-1 gp120, CCR5 and p17 for HIV, etc [1].

Our assay utilizes the Tat pathway of *E. coli* which was originally recognized for the translocation of complex redox proteins which are important for cell to survive therefore many unique features exists [2]. DeLisa research group has exploited the quality control and the hitchhiker mechanisms to develop platforms for engineering soluble intracellular proteins both in terms of antigen-independent (ISELATE) [3] and antigen-dependent (FLI-TRAP) [4] selections. ISELATE is based on the quality control mechanism, the ability of the Tat pathway to transport folded protein from the cytoplasm to the periplasm while rejecting misfolded proteins. While FLI-TRAP is based on the hitchhiker mechanism, the ability to transport non-covalent protein complex in which only one subunit contains targeting signal for export.

The utility of our assay is illustrated using HIV-1 protease system. HIV is human immunodeficiency virus that attacks human's immune system. For viral replication, viral proteins are initially translated by the host machinery in the form of large precursor fusions, gag, pol, and env that are proteolytically processed by HIV PR to release the viral structural proteins and the virally encoded enzymes. Since HIV PR is essential for the generation of mature infectious

*Research supported by TRF and KMUTT.

P. Boonyalekha is with the Biological Engineering Program, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand (e-mail: phenbunya.boon@gmail.com).

A. Meechai is with the Department of Chemical Engineering and Biological Engineering Program, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand (email: asawin.mee@kmutt.ac.th).

C. Tayapiwatana is with the Division of Clinical Immunology, Department of medical Technology, Faculty of Associated Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

K. Kitidee is with Center for Research and Innovation, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok, Thailand

D. Waraho-Zhmayev is with the Biological Engineering Program, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand (corresponding author to provide phone: +6624709394 ; fax: +6624709391; dujduan.war@mail.kmutt.ac.th).

viral particles it currently represents a prime drug targeting. The potentials of intrabodies in HIV treatment have been demonstrated in several studies. Therefore, it is a good candidate for our assay development.

A. Abbreviations and Acronyms

<i>HIV</i>	Human Immunodeficiency Virus
<i>scFv</i>	single chain variable fragment
<i>PI</i>	protease inhibitor
<i>FLI-TRAP</i>	Functional Ligand-binding Identification by Tat- based Recognition of Associating Proteins
<i>ISELATE</i>	Intrabody Selection after Tat Export

II. MATERIALS AND METHODS

A. Plasmid constructions and bacterial strains

E. coli strain DH5 α was used for plasmid construction. The plasmid used for tricistronic and bicistronic expressions were based on pDD18 [4]. The necessary components are 1) the protease blocking device comprised of scFvp17 [5] with c-terminus FLAG-tag 2) the protease activity detector device comprised of ssTorA::p17 Δ p24::Bla fusion protein and 3) the protease generator device comprised of HIV-protease (HIV-PR) with c-terminus His tag. In the first generation, all of these devices were expressed from a pDD18 vector containing tricistronic expression. Nonetheless, pDD322 TatABC plasmid was co-expressed with our pDD18 containing the devices because overexpression of Tat ABC proteins from pDD322 has been shown to improve transport efficiency as they are key proteins of the Tat pathway. scFvp17 was replaced by scFv against a yeast transcription factor, GCN4, anti-GCN4 scFv wild-type (WT), GLF, to create negative control as GLF cannot bind to HIV-PR substrate, p17 Δ p24, a truncated *gag* precursor corresponding to all of p17 and the first 78 amino acids of p24 which was previously shown that the rate of cleavage at this site is similar to the rate of cleavage of the p17-p24 junction in the full-length polyprotein [6]. To construct a positive control, mutation of one amino acid on the p17/p24 cleavage site from YP to KP was performed using "Round the Horn" technique. To construct the bicistronic system, pDD322 TatABC was digested with *KpnI*-*XmaI* and HIV-PR gene was PCR and cloned into these cut sites to create pDD322 TatABC HIV-PR.

B. Selective growth assays

E. coli strain MC4100 was used for spot plating and Western Blotting. Selective plating (spot plating) of bacteria was performed as described [4]. Briefly, MC4100 cells were co-transformed with pDD18 and pDD322 plasmids listed previously and grown overnight at 37°C in Luria Bertani (LB) medium supplemented with 25 μ g/ml chloramphenicol (Cm) and 50 μ g/ml Kanamycin (Kan). The next day, drug resistance of bacteria was evaluated by spot plating 5 μ l of serially 10-fold diluted overnight cells that had been normalized in fresh LB to OD₆₀₀ = 2.5 onto LB agar plates supplemented with 0.1-0.5 % arabinose and varying amounts of Carbenicillin (Carb; 0-400 μ g/ml). Plated bacteria were incubated at 30°C for 48h.

C. Subcellular fractionation

Typically, *E. coli* cells were grown in LB medium overnight, subcultured into fresh LB, and then incubated at 30 or 37 °C. Protein synthesis was induced when the cells

reached an OD₆₀₀ ~0.4-0.5 by adding arabinose to final concentration of 0.2% wt/vol. Cells expressing recombinant proteins were harvested 4 h after induction, induced culture normalized by OD₆₀₀ was pelleted. Subcellular fractionation was performed by using the ice-cold osmotic shock procedure [7]. Cytoplasmic and periplasmic proteins were separated by SDS/PAGE and Western blotting was performed according to standard protocols. Membranes were probed with the following primary antibodies (dilutions in parentheses): mouse anti-FLAG M2-HRP (1:3,000; Sigma-Aldrich) to detect intrabodies and mouse anti-Bla (1:150; Abccam) to detect the antigen-Bla fusion.

III. RESULTS AND DISCUSSIONS

A. Design of the selection system

We propose that the quality control and the hitchhiker mechanisms of the Tat pathway can be utilized to identify high soluble with high-affinity scFvs toward its target. By linking protease degradation to antibiotic resistance, we can isolate the suitable intrabodies simply by plating cells containing appropriate devices on solid agar containing β -lactam ring antibiotics. We first devise our selection system into 3 devices as follows.

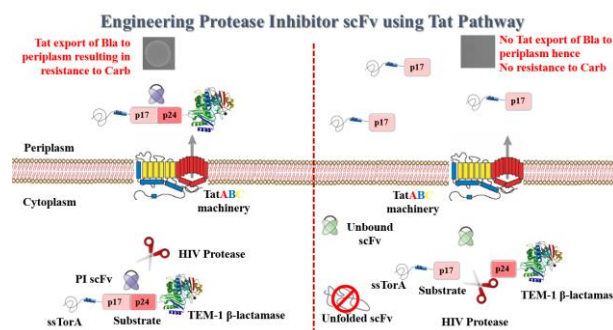


Figure 1 Exploiting the Tat pathway for selecting protease inhibiting intrabody

1) Protease activity detector device

The purpose of the protease activity detector device is to report protection of the cleavage site of the polypeptide by specific binding of scFv to the substrate at the protease cleavage site. We constructed a tripartite fusion consisting of ssTorA::substrate::Bla under the AraBAD promoter in pDD18 plasmid originally developed for FLI-TRAP technique. Bla is used as a reporter protein while ssTorA is used as translocating signal to initiate transport of the protein complex in a Tat-dependent manner. The strategy of the selection is shown in Figure 1. Basically, if the substrate is protected against proteolytic cleavage due to binding of the scFv, ssTorA::substrate::Bla will be transported to the periplasm resulting in cell resistance to β -lactam antibiotic such as Carb. On the other hand, if scFv only binds to the p17 Δ p24 domain but does not inhibit the protease cleavage the substrate will be cleaved resulting in release of two domains; i) ssTorA::p17 domain that will be transported to the periplasm via the Tat-specific signal peptide and ii) Δ p24::Bla domain that will remain in the cytoplasm resulting in cells that are sensitive to Bla.

2) Protease generator device

Protease generator device is simply comprised of a gene coding HIV-1 PR. For the translocation of the tripartite fusion protein to occur, binding of the intrabody must prevail the rate of protease cleavage. This binding phenomenon is a type of kinetic event thus depends upon the affinity and solubility of the intrabody inside the cell. To prevent problems associated with high level of protease expression, we chose a weak ribosome binding site (RBS) from the iGEM RBS community collection (part number BBa_B0031) for this construction.

3) Protease blocking device

Similar to the protease generator device, the protease blocking device contains a gene coding intrabody. The intrabody is tagged with FLAG epitope tag for easy detection of the presence of scFv.

B. In vivo testing of the designed system

Spot plating technique was used to evaluate the feasibility of the developing system. The first construct is the tricistronic system where all 3 devices were expressed from pDD18. We found that our system (scFvp17 with WT p17 Δ p24 substrate) can distinguish the differences in cell resistance between cells expressing HIV-PR alone (no Bla), our test system and positive control and that the system can function better when expressed at 30°C compared to 37 °C (data not shown) as low incubation temperature allows for slower expression of the scFv which can result in higher soluble proteins in the cytoplasm. Furthermore, since the cells have to be grown at low temperature, longer incubation period is required. It was found that 48 hours incubation allows for the best distinction between each sample.

It is noteworthy that there are many possibility of designing our devices. It is important to consider some hindrances due to kinetics of the system, i.e. transport vs. protease cleavage, we also investigated a system where HIV-PR is expressed from pDD322. The main differences are the copy number and inducibility of the vector that HIV-PR is cloned into. pDD322 has low copy number and HIV-PR is produced constitutively. We compared the two systems using spot plating technique (Figure 2). The difference of cell resistance between scFvp17-WT p17 Δ p24 and the non-related scFv, GLF,-WT p17 Δ p24 are similar in both tri- and bicistronic systems. Moreover, when higher Arabinose concentrations are used the difference in cell resistance is seen more clearly. The results in figure 2c illustrate that the cell resistance to Carb of WT p17 Δ p24 substrate is higher than that of the positive control which is the YP to KP mutant. We propose that since the mutation is at the last amino acid of p17 the scFvp17, which is expected to bind to the C-terminus of p17, may not bind to the YPKP substrate as efficiently. It is speculated from the literature that HIV-PR cannot bind at all with YPKP p17 Δ p24 or very weakly [8]. However, since our results show that substrate with YP to KP mutation has lower cell resistance than that of the WT substrate, we hypothesize that it is because the effect of scFv protection by binding to the C-terminus of p17 is stronger than the reduction of cleavage efficiency as the binding may still weakly occur. Nonetheless, when considering the results of cells expressing GLF and WT p17 Δ p24 both in tricistronic and bicistronic systems, it is clearly observed that the cell resistance is due to scFv binding that interferes with PR activity because GLF cannot protect the

cleavage of p17 Δ p24 substrate as the cell resistance to Carb is much lower than that of cells expressing scFvp17 and WT p17 Δ p24. It should be mentioned that even in the case of GLF-WT p17 Δ p24, background growth is clearly observed. Ability to grow on Carb can occur when large amount of cells are densely plated on the solid media as active Bla from the cytoplasm of death cells is released onto the solid medium which can still degrade the β -lactam antibiotics around the debris. Therefore, when comparing the tricistronic and bicistronic systems using the difference in the efficiency of cell growth from cells expressing scFvp17- WT p17 Δ p24, bicistronic may be more suitable for future selection of enhanced scFvp17 variants from an error-prone scFvp17 library because cells do not grow as well at high carbenicillin concentration thus allow us to perform library selection at reasonable antibiotic concentrations such as at 200 μ g/mL.

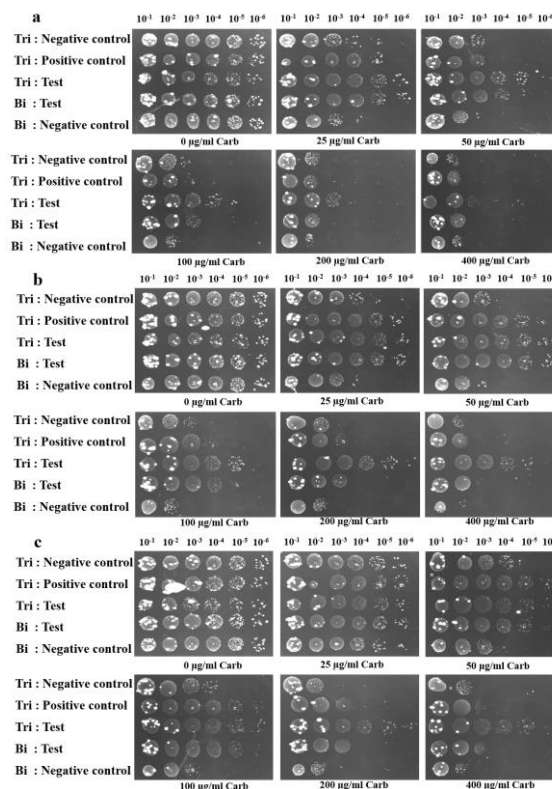


Figure 2 spot plate result use 10^{-1} - 10^{-6} dilution samples vary concentration of antibiotic (carbenicillin) and arabinose with 0 – 400 μ g/mL and (a) 0.1%, (b) 0.2% and (c) 0.5% , respectively. The result have 5 conditions as negative control; pDD18 scFvGLF ssTorAp17 Δ p24Bla HIV-PR+pDD322 TatABC, positive control; pDD18 scFvp17 ssTorAp17 Δ p24(YPKP)Bla HIV-PR+pDD322 TatABC, tricistronic vector(test); pDD18 scFvp17 ssTorAp17 Δ p24Bla(WT) HIV-PR+pDD322 TatABC, bicistronic vector(test); pDD18 scFvp17 ssTorAp17 Δ p24Bla (WT)+pDD322 TatABC HIV-PR of scFvp17 and bicistronic negative control; pDD18 scFvGLF ssTorAp17 Δ p24Bla (WT)+pDD322 TatABC HIV-PR

C. In vitro detection of tripartite fusion protein translocation

Western blot technique was used to confirm the localization of ssTorAp17 Δ p24Bla fusion protein. If the presence of WT can be detected in the periplasmic fraction, the result will confirm that cell resistance observed in the previous *in vivo* experiment is due to transport of uncleaved ssTorA p17 Δ p24Bla from the cytoplasm to the periplasm of *E. coli*. Figure 3a shows detection of ssTorAp17 Δ p24Bla

using anti-Bla antibody. It is expected that if the HIV-PR substrate is not cleaved we will be able to detect the fusion protein via Bla that is on the C-terminus in both the cytoplasmic and periplasmic fractions and the size of the substrate is expected to be 58.5 kDa. Figure 3a confirms that the system is functioning because the size of the band around 60 kDa is present in the periplasmic fractions when scFvp17 was co-expressed with the HIV-PR substrates while there was no WT p17 Δ p24 detected in the periplasmic fraction when co-expressed with GLF. The amount of WT p17 Δ p24 in the periplasmic fraction is higher than that of YPKP which is in agreement with *in vivo* results from spot plating technique. We hypothesize that the system, comprised of protease activity detecting device, protease generator device, and protease blocker device, was expressed solubly and transport occurred when the correct scFv, i.e. scFvp17, is paired with the substrate while, in the incorrect pair's case (GLF-p17 Δ p24), the substrate cannot be transported to the periplasm due to GLF's inability to protect proteolytic cleavage site of HIV-PR substrate. Unfortunately, there are some higher molecular weight bands that we are unsure of but speculating to be complex of substrate with scFv and/or HIV-PR that are not separated when the samples were prepared.

Figure 3b shows detection of scFv using anti-FLAG antibody to detect the FLAG epitope tag fused to the C-terminus of each scFv. It was found that scFvp17 can be produced at a much higher level than GLF, which was found earlier that it has quite low solubility [7]. In this case, we found that both scFvs present in the cytoplasmic fraction only. This could be due to separation of the scFv during the harsh transport of the substrate or its low amount rendering it undetectable. Finally, this technique confirms that 30°C is the appropriated temperature for protein expression, which is also in good agreement with the results from spot plating technique as, in lane 9-10, there were no bands of both substrate (Fig. 5a) and scFv (Fig. 5b) which could be due to aggregation of proteins resulting in inclusion bodies when expressed at high temperature.

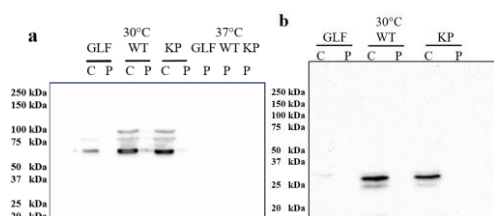


Figure 3 Western blot result, use primary antibody a) an anti-Bla for detect ssTorA:: p17 Δ p24WT::Bla that size of this part is 58.5 kDa. Lane 2-7 are cytoplasm and periplasm at 30°C of negative control, scFvp17::ssTorA:: p17 Δ p24::Bla and positive control, respectively. Lane 8-10 are periplasm of negative control, WT and positive control, respectively b) α -FLAG antibody for detect scFvp17::FLAG that size of this part is 27.6 kDa. Lane 2-7 are negative control, scFvp17::ssTorA:: p17 Δ p24::Bla and positive control at 30°C, respectively.

IV. CONCLUSIONS

We have designed and constructed the synthetic *E. coli* selection system containing HIV protease inhibitor system comprised of protease activity detector device (ssTorA p17 Δ p24Bla), protease generator device (HIV protease-His6)

and protease blocking device (scFv-FLAG) as a tool for selection of scFv that can bind to the cleavage site and block protease cleavage which can be detected when transportation of the β -lactamase enzyme from the cytoplasm to the periplasm via the twin-arginine translocation (Tat) pathway of *E. coli*. To this end, we have tested the system in two formats, tricistronic and bicistronic systems. The efficiency of the device was evaluated through spot plating technique and translocation of the uncleaved substrate was observed by western blot technique. We concluded that both techniques showed that scFvp17 has ability to fold in the reducing environment of *E. coli* and can protect the proteolytic cleavage site of p17 Δ p24 substrate thus potential for developing into a model system for our protease inhibitor selection device. Moreover, scFvp17 has been proven to bind to many mutants that exist in patients thus can be good candidate for HIV therapy [9], [10].

This current work clearly shows the ability of our assay as a selection platform of protease inhibiting intrabodies. The conditions from spot plating can be used to extrapolate into conditions for selection plating of a library with random mutations to find high performance mutants which possess higher solubility or affinity thus can better protect proteolytic cleavage than the existing scFv or even use this assay to find scFvs from a naïve library for a new substrate target.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRG5780079) and King Mongkut's University of Technology Thonburi.

REFERENCES

- [1] R.E. Kontermann, "Intrabodies as Therapeutic Agents," *Methods*, 2004, Vol. 34, No. 2, pp. 163-170.
- [2] B. C Berks, "A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors," *Molecular Microbiology*, 1996, Vol.22, pp. 393-404.
- [3] A. C Fisher, and M. P. DeLis, "Efficient isolation of soluble intracellular single-chain antibodies using the twin-arginine translocation machinery," *J Mol Biol*, 2009, 385, pp. 299-311.
- [4] D. Waraho, and M. P. DeLis, "Versatile selection technology for intracellular protein-protein interactions mediated by a unique bacterial hitchhiker transport mechanism," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, pp. 3692-3697.
- [5] D. Tewari, S.L Goldstein, A.L Notkins, and P. Zhou, "Cdn Encoding a Single-Chain Antibody to Hiv P17 with Cytoplasmic or Nuclear Retention Signals Inhibits Hiv-1 Replication," *The Journal of Immunology*, 1998, Vol. 161, No. 5, pp. 2642-2647.
- [6] S. Erickson-Viitanen *et al*, "Cleavage of HIV-1 gag polyprotein synthesized in vitro: sequential cleavage by the viral protease," *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1989, Vol. 5, pp. 577-591.
- [7] D Waraho-Zhmeyev, B. Meksiriporn, A.D. Portnoff, and M.P. DeLis, "Optimizing Recombinant Antibodies for Intracellular Function Using Hitchhiker-Mediated Survival Selection," *Protein Engineering Design and Selection*, 2014, Vol., No., pp. gzu038.
- [8] R.J. Tritch, *et al.*, "Mutagenesis of protease cleavage sites in the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein," *J Virol*, 1991. 65(2): pp. 922-30.
- [9] P. Tue-ngeun, *et al*. "Improved scFv Anti-HIV-1 p17 Binding Affinity Guided from the Theoretical Calculation of Pairwise Decomposition Energies and Computational Alanine Scanning." *BioMed Research International* 2013
- [10] V.S. Lee, *et al*. "Pairwise decomposition of residue interaction energies of single chain Fv with HIV-1 p17 epitope variants" *Mol Immunol*. 2010; 47(5),pp. 982-90

ภาคผนวก ข.
การจดสิทธิบัตรการประดิษฐ์



สำหรับเจ้าหน้าที่

คำขอที่

รับวันที่

- 3 ก.ค. 2561

๖

คำขอแก้ไขเพิ่มเติมคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร เลขที่ 1701003852

วันที่ยื่นคำขอ 7 กรกฎาคม 2560

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนอินฮิบิเตอร์

ชื่อผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ข้อ 1. ข้าพเจ้า นางสาวผ่องศรี เวสราธิ

☒ บุคคลธรรมดา ☐ นิติบุคคล ☐ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ

ที่อยู่ สำนักงานวิจัย นวัตกรรมและพันธุกรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ตำบล/แขวง นางมด อำเภอ/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพฯ

รหัสไปรษณีย์ 10140 โทรศัพท์ 0-2470-9663, 9688

☒ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☐ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร

3	1	0	2	4	0	0	4	5	2	8	3	4
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

ซึ่งเป็นผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรหรือตัวแทนของผู้รับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรที่ระบุข้างต้น ขอแก้ไขเพิ่มเติมคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรดังกล่าว ดังมีรายละเอียดตามที่แนบมาพร้อมนี้

ข้อ 2. ข้าพเจ้าขอยืนยันว่าการแก้ไขเพิ่มเติมนี้เป็นไปตามมาตรา 20 แห่งพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522 กล่าวคือ

ไม่เป็นการเพิ่มเติมสาระสำคัญของการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์

วันที่ 26 มิถุนายน 2561

ลายมือชื่อ

(นางสาวผ่องศรี เวสราธิ)



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☒ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535
และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันที่รับคำขอ

เลขที่คำขอ

วันที่ยื่นคำขอ

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์

ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา

เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์

องค์ประกอบและกระบวนการที่คัดเลือกโปรตีนอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ บุคคลธรรมดา ☐ นิติบุคคล ☒ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ

ชื่อ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ที่อยู่ เลขที่ 126 ถนนพระอาทิตย์

ตำบล/แขวง บางมด อำเภอ/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10140 ประเทศ ไทย

อีเมล ip@kmutt.ac.th

☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☒ เลขประจำตัวเสียภาษีอากร 0 9 9 4 0 0 0 1 6 0 0 9 7 ☒ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

ในกรณีที่มา สือสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☒ อีเมลผู้ขอ ☐ อีเมลตัวแทน

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

ชื่อ นางสาวผ่องศรี เวสวัช

ที่อยู่ สำนักงานวิจัย นวัตกรรมและพันธมิตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ตำบล/แขวง บางมด อำเภอ/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10140 ประเทศ ไทย

อีเมล ip@kmutt.ac.th

เลขประจำตัวประชาชน 3 1 0 2 4 0 0 4 5 2 8 3 4 ☒ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกับผู้ขอ

ชื่อ นางสาวศุจดเดือน วราโ

ที่อยู่ หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เลขที่ 126 ถนนพระอาทิตย์

ตำบล/แขวง บางมด อำเภอ/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10140 ประเทศ ไทย

อีเมล

เลขประจำตัวประชาชน 3 6 7 9 8 0 0 1 2 1 1 8 7 ☒ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร

เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่มีอาจะระบุรายละเอียดครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ กลุ่มวิศวกรรม

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัช)

☐ กลุ่มเคมี

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (นาโนเทคโนโลยี)

สิทธิบัตรการออกแบบ

☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)

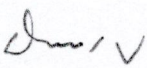
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)

☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)

อนุสิทธิบัตร

☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)

☐ อนุสิทธิบัตร (เคมี)

8. การยื่นคำขออนุญาตนำเข้า <input type="checkbox"/> PCT				<input type="checkbox"/> เพิ่มเติม (ตังแนบ)
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย <input type="checkbox"/> ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ <input type="checkbox"/> ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้				
9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด				
10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ				
10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ		10.2 วันที่ฝากเก็บ		10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วันนับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอเป็นภาษา <input type="checkbox"/> อังกฤษ <input type="checkbox"/> ฝรั่งเศส <input type="checkbox"/> เยอรมัน <input type="checkbox"/> ญี่ปุ่น <input type="checkbox"/> อื่นๆ				
12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา				
13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย				
ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 34 หน้า ค. ข้อถ้อยสิทธิ 2 หน้า ง. รูปเขียน 7 รูป 7 หน้า จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์ <input type="checkbox"/> รูปเขียน รูป หน้า <input type="checkbox"/> ภาพถ่าย รูป หน้า ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า		14. เอกสารประกอบคำขอ <input checked="" type="checkbox"/> เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input type="checkbox"/> หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ <input checked="" type="checkbox"/> หนังสือมอบอำนาจ <input type="checkbox"/> เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ <input type="checkbox"/> เอกสารการขอรับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย <input type="checkbox"/> เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ <input checked="" type="checkbox"/> เอกสารอื่นๆ		
15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า <input checked="" type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน <input type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก				
16. ลายมือชื่อ <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input checked="" type="checkbox"/> ตัวแทน <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  (นางสาวมอญศรี เวสราธิ์) และ/หรือ (นายพิเชษฐ์ อนุพงศ์จรรยา) </div>				

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ใบแนบต่อท้าย แบบ สป/สผ/อสป/001-ก

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input type="checkbox"/> บุคคลธรรมดา <input type="checkbox"/> นิติบุคคล <input checked="" type="checkbox"/> หน่วยงานรัฐ <input type="checkbox"/> มูลนิธิ <input type="checkbox"/> อื่นๆ	3.1 สัญชาติ ไทย
3.2 ชื่อ	3.2 โทรศัพท์ 0-2278-8200
ที่อยู่	3.3 โทรสาร 0-2298-0476
ที่อยู่ที่ 14 อาคารเอสเอ็มทาวเวอร์คอนโดมิเนียม เลขที่ 979 ถนนพหลโยธิน	
ตำบล/แขวง	
สามเสนใน	
อำเภอ/เขต	
พญาไท	
จังหวัด	
กรุงเทพฯ	
รหัสไปรษณีย์	
10400	
ประเทศ	
ไทย	
อีเมล	
<input type="checkbox"/> เลขประจำตัวประชาชน <input type="checkbox"/> เลขทะเบียนนิติบุคคล <input checked="" type="checkbox"/> เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร	
0 9 9 4 0 0 0 1 6 5 6 9 2	
ในกรณีที่มีการมา สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง <input type="checkbox"/> อีเมลผู้ขอ <input checked="" type="checkbox"/> อีเมลตัวแทน	
5. ตัวแทน	5.1 ตัวแทนเลขที่ 2272
5.2 ชื่อ	5.2 โทรศัพท์ 0-2470-9663
นายพิษณุ รัตนกิจรุ่งเรือง	5.3 โทรสาร 0-2872-9083
ที่อยู่	
สำนักงานวิจัย นวัตกรรมและพันธกิจ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	
ตำบล/แขวง	
บางมด	
อำเภอ/เขต	
ทุ่งครุ	
จังหวัด	
กรุงเทพฯ	
รหัสไปรษณีย์	
10140	
ประเทศ	
ไทย	
อีเมล	
ip@kmutt.ac.th	
เลขประจำตัวประชาชน	
3 7 3 0 2 0 0 0 0 9 5 4 9	
6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ <input type="checkbox"/> ชื่อและที่อยู่เดียวกับผู้ขอ	
6.2 ชื่อ	
นางสาวเพ็ญบุญญา บุญยเลขา	
ที่อยู่	
หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เลขที่ 126 ถนนพระวชิรธร	
ตำบล/แขวง	
บางมด	
อำเภอ/เขต	
ทุ่งครุ	
จังหวัด	
กรุงเทพฯ	
รหัสไปรษณีย์	
10140	
ประเทศ	
ไทย	
อีเมล	
เลขประจำตัวประชาชน	
1 1 0 1 5 0 0 6 3 1 7 5 0	
6.3 ชื่อ	
นายชัยชัย ตะยาวิวัฒนา	
ที่อยู่	
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 110 ถนนอินทวิโรด	
ตำบล/แขวง	
ศรีภูมิ	
อำเภอ/เขต	
เมือง	
จังหวัด	
เชียงใหม่	
รหัสไปรษณีย์	
50200	
ประเทศ	
ไทย	
อีเมล	
เลขประจำตัวประชาชน	
3 1 0 1 2 0 1 0 1 9 0 0 5	
6.4 ชื่อ	
Mr.Matthew DeLisa, Robert Frederick Smith	
ที่อยู่	
School of Chemical and Biomolecular Engineering, Cornell University, 120 Olin Hall, Ithaca, NY 14853	
ตำบล/แขวง	
อำเภอ/เขต	
จังหวัด	
รหัสไปรษณีย์	
ประเทศ	
อีเมล	
เลขประจำตัวประชาชน	

บัตรประจำตัวประชาชน Thai National ID Card
เลขประจำตัวประชาชน 3 6798 00121 18 7
Identification Number

ชื่อตัวและชื่อสกุล น.ส. ดจเดือน วราโห
Name Miss Dujduan
Last name Waraho

เกิดวันที่ 11 มี.ค. 2523
Date of Birth 11 Mar. 1980

ศาสนา พุทธ

ที่อยู่ 784 ซ.ริมคลองมอญ แขวงบางขุนศรี เขตบางกอกน้อย
กรุงเทพมหานคร
9 มี.ค. 2558
วันออกบัตร
9 Mar. 2015
Date of Issue

10 มี.ค. 2566
วันหมดอายุ
10 Mar. 2023
Date of Expiry

1020-02-03091405

ใช้เพื่อเป็นเอกสารประกอบการยื่นคำขอ

150 140 130

ประเทศไทย
THAILAND

Dujduan Waraho
รับจริงสำเนาถูกต้อง

BORA-1.9-01

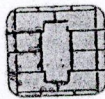
ประเทศไทย
THAILAND

JC2-0779495-52



บัตรประจำตัวประชาชน Thai National ID Card
เลขประจำตัวประชาชน 3 1012 01019 00 5
Identification Number

ชื่อตัวและชื่อสกุล นาย ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา



Name Mr. Chatchai

Last name Tayapiwatana

เกิดวันที่ 21 มี.ค. 2509

Date of Birth 21 Mar. 1966

ศาสนา พุทธ

ที่อยู่ 369/73 ซ.วัดจันทร์ใน แขวงบางค้อแหลม

เขตบางค้อแหลม กรุงเทพมหานคร

27 พ.ย. 2558

วันออกบัตร

27 Nov. 2015

Date of Issue

ร้อยตำรวจโท

(สุวัตร บุษตะโสภิต)

เจ้าพนักงานสอบสวน

20 มี.ค. 2567

วันบัตรหมดอายุ

20 Mar. 2024

Date of Expiry



1021-03-11271206

Signature
วัชร บุษตะโสภิต

BORA-8.3-05



ประเทศไทย



THAILAND

JT2-0947001-11

บัตรประจำตัวประชาชน Thai National ID Card
 เลขประจำตัวประชาชน 1 1015 00631 75 0
 Identification Number

ชื่อตัวและชื่อสกุล น.ส. เพ็ญบุญญา บุญยเลขา
 Name Miss Phenbunya
 Last name Boonyalekha

เกิดวันที่ 30 ต.ค. 2535
 Date of Birth 30 Oct. 1992

ศาสนา พุทธ

ที่อยู 58 หมู่ที่ 5 ต.แหลมฟ้าผ่า อ.พระสมุทรเจดีย์
 จ.สมุทรปราการ
 4 พ.ย. 2557
 วันออกบัตร
 4 Nov. 2014
 Date of Issue

29 ต.ค. 2566
 วันบัตรหมดอายุ
 29 Oct. 2023
 Date of Expiry

1105-01-11040841

น.ส. เพ็ญบุญญา บุญยเลขา
 ผู้อำนวยการ
 สำนักงานคณะกรรมการ
 ประกอบการปกครองส่วน
 地方自治

BORA-16-04

ประเทศไทย
 THAILAND

JTO-0836220-95

หนังสือสัญญาโอนสิทธิขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เขียนที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

วันที่

26 มิ.ย. 2561

สัญญานี้ทำขึ้นระหว่าง

1. นางสาวจุฑาเดือน วราโห 2. นางสาวเพ็ญบุญญา บุญยเสชา อยู่ที่ หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

3. นายชัชชัย ตะยาภิวัฒนา อยู่ที่ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 110 ถนนอินทวโรสุ ต่าบลศรีภูมิ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

4. Mr. Matthew DeLisa, Robert Frederick Smith School of Chemical and Biomolecular Engineering, Cornell University, 120 Olin Hall, Ithaca, NY 14853.

ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า “ผู้โอน” ฝ่ายหนึ่ง

กับ

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดย นายศักรินทร์ ภูมิรัตน์ ตำแหน่ง อธิการบดี

ตั้งอยู่เลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

2. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดย นายสุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตั้งอยู่ที่ชั้น 14 อาคารเอสเอ็มทาวเวอร์

คอนโดมิเนียม เลขที่ 979 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400

ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า “ผู้รับโอน” อีกฝ่ายหนึ่ง

โดยสัญญานี้ ผู้โอนซึ่งเป็นผู้ประดิษฐ์ผลงาน “องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการทวินอาร์จีนิทราสไลด์เคชั่นพาสเวย์” ขอโอนสิทธิในการประดิษฐ์ดังกล่าว ซึ่งรวมถึงสิทธิขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร รวมถึงสิทธิต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องให้แก่ ผู้รับโอน หากมีผลประโยชน์ใด ๆ ในเชิงพาณิชย์จะดำเนินการตกลงกันเป็นลายลักษณ์อักษรในภายหลัง

สัญญานี้ได้ทำขึ้นเป็นสื่อบันทึกข้อความถูกต้องตรงกันซึ่งคู่สัญญาได้อ่านและเข้าใจข้อความของสัญญานี้ โดยตลอดแล้วจึงลงลายมือชื่อไว้เพื่อเป็นหลักฐาน

(ลงชื่อ).....ผู้โอน
(นางสาวจุฑาเดือน วราโห)

(ลงชื่อ).....ผู้โอน
(Mr. Matthew DeLisa)

(ลงชื่อ).....ผู้โอน
(นายชัชชัย ตะยาภิวัฒนา)

(ลงชื่อ).....ผู้โอน
(นางสาวเพ็ญบุญญา บุญยเสชา)

(ลงชื่อ).....ผู้รับโอน
(นายศักรินทร์ ภูมิรัตน์)

(ลงชื่อ).....พยาน
(นายบัณฑิต พึ่งธรรมสาร)

(ลงชื่อ).....ผู้รับโอน
(นายสุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ)

(ลงชื่อ).....พยาน
(นางวรรณิณี เต็งสุวรรณ)



พนักงานองค์การของรัฐ

เลขที่ 056/2558

ชื่อ รองศาสตราจารย์ ศักรินทร์ ภูมิรัตน์

ตำแหน่ง อธิการบดี

เลขประจำตัวประชาชน

3 1009 01132 73 3

นาย

หมื่นไชยสิทธิ์

(รศ. กำนัน ดิเรก)

เลขาธิการคณะกรรมการการอุดมศึกษา

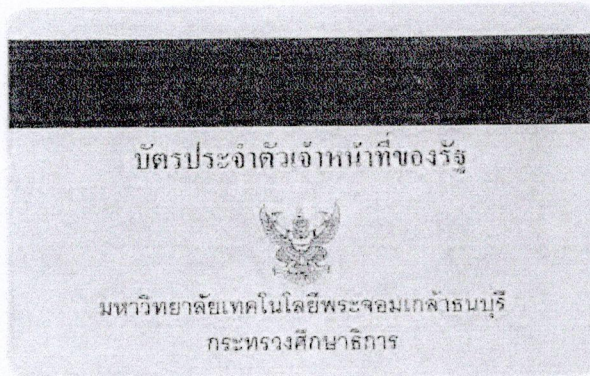
ผู้ออกบัตร

ออกบัตร 22 ธ.ค. 2557 บัตรหมดอายุ 21 ธ.ค. 2561

ใช้เพื่อรับเงินค่าตอบแทน
ใช้เพื่อรับเงินค่าตอบแทน

รับรองสำเนาถูกต้อง

(นาย ศักรินทร์ ภูมิรัตน์)



ประกาศสำนักนายกรัฐมนตรี

เรื่อง แต่งตั้งอธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ตามที่ได้มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้ง นายศักรินทร์ ภูมิรัตน์ ให้ดำรงตำแหน่ง อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ตั้งแต่วันที่ ๑๖ กรกฎาคม ๒๕๕๓ ตามประกาศสำนักนายกรัฐมนตรี ลงวันที่ ๑๘ มิถุนายน ๒๕๕๓ นั้น เนื่องจาก นายศักรินทร์ ภูมิรัตน์ ได้ดำรงตำแหน่งมาครบกำหนดตามวาระแล้ว และที่ประชุมสภามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ครั้งที่ ๑๗๖ เมื่อวันที่ ๑๔ มีนาคม ๒๕๕๗ ได้มีมติเห็นชอบให้เสนอขอพระราชทานโปรดเกล้าฯ แต่งตั้ง นายศักรินทร์ ภูมิรัตน์ ดำรงตำแหน่ง อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ต่อไปอีกวาระหนึ่ง ตั้งแต่วันที่ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งเป็นต้นไป และได้นำความกราบบังคมทูล พระกรุณาโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งต่อไปแล้ว

บัดนี้ ได้มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งบุคคลดังกล่าว ให้ดำรงตำแหน่ง อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ตั้งแต่วันที่ ๒๒ ธันวาคม ๒๕๕๗

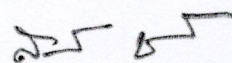
ประกาศ ณ วันที่ ๒๔ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

ผู้รับสนองพระบรมราชโองการ

ยงยุทธ ยุทธวงศ์

รองนายกรัฐมนตรี

รับรองสำเนาถูกต้อง



(นายศักรินทร์ ภูมิรัตน์)



พระราชบัญญัติ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
พ.ศ. ๒๕๕๑

ภูมิพลอดุลยเดช ป.ร.
ให้ไว้ ณ วันที่ ๑๒ กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๕๑
เป็นปีที่ ๕๓ ในรัชกาลปัจจุบัน

พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ ให้
ประกาศว่า

โดยที่เป็นการสมควรให้มีกฎหมายว่าด้วยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ตราพระราชบัญญัติขึ้นไว้โดยคำแนะนำและยินยอมของรัฐสภา
ดังต่อไปนี้

มาตรา ๑ พระราชบัญญัตินี้เรียกว่า “พระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
พ.ศ. ๒๕๕๑”

มาตรา ๒ พระราชบัญญัตินี้ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษา
เป็นต้นไป

มาตรา ๓ ให้ยกเลิกพระราชบัญญัติสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ พ.ศ. ๒๕๒๘
เฉพาะที่เกี่ยวกับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

บรรดาบทกฎหมาย กฎ และข้อบังคับอื่นในส่วนที่มีบัญญัติไว้แล้วในพระราชบัญญัตินี้ หรือซึ่ง
ขัดหรือแย้งกับบทแห่งพระราชบัญญัตินี้ ให้ใช้พระราชบัญญัตินี้แทน

รับรองสำเนาถูกต้อง

(นางสาวผ่องศรี เวสราธิ) และ/หรือ (นายบัณฑิต คำภูษา)

มาตรา ๕ ให้สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีตามพระราชบัญญัติสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ พ.ศ. ๒๕๒๘ เป็นมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีตามพระราชบัญญัตินี้ มีฐานะเป็นมหาวิทยาลัยของรัฐที่ไม่เป็นส่วนราชการ แต่อยู่ในกำกับดูแลของรัฐบาล และเป็นนิติบุคคล

มาตรา ๕ ในพระราชบัญญัตินี้

“มหาวิทยาลัย” หมายความว่า มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

“สภามหาวิทยาลัย” หมายความว่า สภามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

“สภาวิชาการ” หมายความว่า สภาวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

“สภาคณาจารย์และพนักงาน” หมายความว่า สภาคณาจารย์และพนักงานมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

“รัฐมนตรี” หมายความว่า รัฐมนตรีผู้รักษาการตามพระราชบัญญัตินี้

มาตรา ๖ ให้รัฐมนตรีว่าการทบวงมหาวิทยาลัยรักษาการตามพระราชบัญญัตินี้

หมวด ๑

บททั่วไป

มาตรา ๗ ให้มหาวิทยาลัยเป็นสถาบันทางวิชาการและวิชาชีพชั้นสูง มีวัตถุประสงค์ให้การศึกษา ส่งเสริมวิชาการและวิชาชีพชั้นสูง ทำการสอน ทำการวิจัย ให้บริการทางวิชาการแก่สังคม ริเริ่ม ปรับปรุง ถ่ายทอด พัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และทะนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม

มาตรา ๘ มหาวิทยาลัยอาจแบ่งส่วนงาน ดังนี้

(๑) สำนักงานอธิการบดี

(๒) คณะ

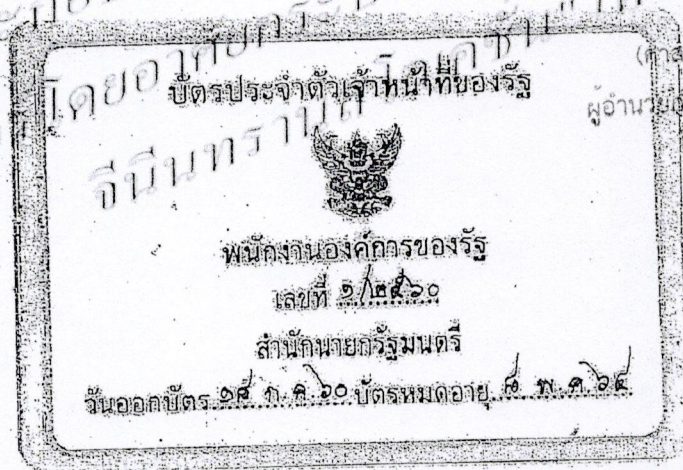
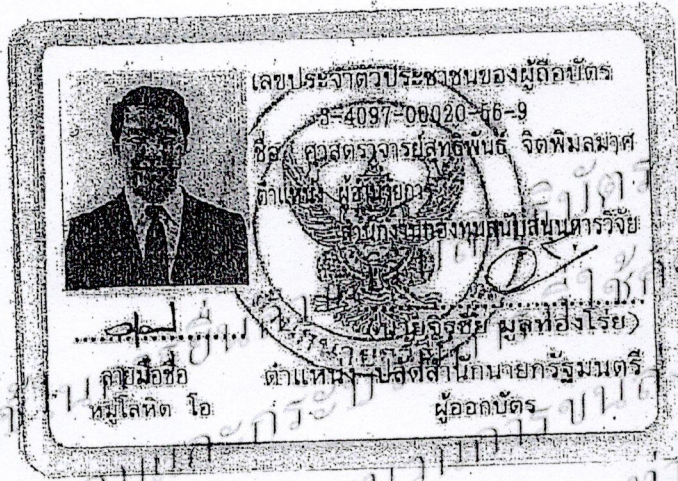
(๓) สถาบัน

(๔) สำนัก

มหาวิทยาลัยอาจให้มีส่วนงานที่เรียกชื่ออย่างอื่นที่มีฐานะเทียบเท่าคณะ เพื่อดำเนินการตามวัตถุประสงค์ในมาตรา ๗ เป็นส่วนงานในมหาวิทยาลัยอีกได้

สำนักงานอธิการบดีอาจแบ่งส่วนงานเป็นกอง หรือส่วนงานที่เรียกชื่ออย่างอื่นที่มีฐานะเทียบเท่ากอง
รับรองสำเนาถูกต้อง

(นางสาวผ่องศรี เวสารัช) และ/หรือ (นายบัณฑิต คำภูษา)



สำหรับใช้ใน
องค์ประกอบบัตร
อินทิเบต

อนุสิทธิบัตรเรื่อง
การเลือกโปรตีนเอส
โปรตีนทวินอาร์

สำเนาถูกต้อง

(ศาสตราจารย์สุทธีพันธ์ จิตพิมลมาศ)
ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย



ประกาศคณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย
เรื่อง แต่งตั้งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ตามที่ ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย จะดำรงตำแหน่งครบกำหนดสี่ปีตามวาระในวันที่ ๘ พฤษภาคม ๒๕๖๐ นั้น

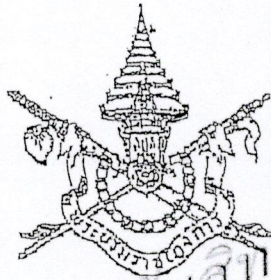
ออกสืบอำนาจตามความในมาตรา ๒๔ (๓) แห่งพระราชบัญญัติกองทุนสนับสนุนการวิจัย พ.ศ. ๒๕๓๕ คณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัยจึงได้พิจารณาผลการสรรหาผู้สมควรดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในวาระต่อไปในการประชุมนัดพิเศษเมื่อวันที่ ๒๘ เมษายน ๒๕๖๐ และได้มีมติให้แต่งตั้ง ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ต่ออีกวาระหนึ่ง โดยให้อยู่ในตำแหน่งเป็นเวลาสี่ปี นับตั้งแต่วันที่ ๙ พฤษภาคม ๒๕๖๐ เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๕ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๐

(ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นายแพทย์ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์)
ประธานกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำเนาถูกต้อง

(ศาสตราจารย์สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ)
ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย



สำหรับใช้ในการยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรเรื่อง
“องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอส-
อินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการทางชีววิทยา”
พ.ศ. ๒๕๓๕
ภูมิพลอดุลยเดช ป.ร.
ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๕ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๓๕
เป็นปีที่ ๔๘ ในรัชกาลปัจจุบัน

พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ ให้
ประกาศว่า

โดยที่เป็นการสมควรมีกฎหมายว่าด้วยกองทุนสนับสนุนการวิจัย
จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ตราพระราชบัญญัติขึ้นไว้โดยคำแนะนำและยินยอมของ
สภานิติบัญญัติแห่งชาติ. ทำห้วงที่รัฐสภา. ดังต่อไปนี้

มาตรา ๑ พระราชบัญญัตินี้เรียกว่า “พระราชบัญญัติกองทุนสนับสนุนการวิจัย พ.ศ.
๒๕๓๕”

มาตรา ๒ พระราชบัญญัตินี้ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษา
เป็นต้นไป

มาตรา ๓ ในพระราชบัญญัตินี้

“การวิจัย” หมายความว่า การค้นคว้าโดยการทดลอง สำรวจหรือการศึกษา
ตามหลักวิชาการเพื่อให้ได้ข้อมูล ความรู้ รวมทั้งการพัฒนาลักษณะและกระบวนการต่างๆ อันจะ
สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจ สังคม วิชาการ หรือเป็นพื้นฐานของการพัฒนาประเทศ
ในด้านต่างๆ ต่อไป

“กองทุน” หมายความว่า กองทุนสนับสนุนการวิจัย

(นางวรวรรณ นี เต็งสุวรรณ)
เจ้าหน้าที่ทรัพย์สินทางปัญญา

“คณะกรรมการนโยบาย” หมายความว่า คณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย

“คณะกรรมการประเมินผล” หมายความว่า คณะกรรมการติดตามและประเมินผลการสนับสนุนการวิจัย

“สำนักงาน” หมายความว่า สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

“ผู้อำนวยการ” หมายความว่า ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

มาตรา ๔ ให้จัดตั้งกองทุนขึ้นกองทุนหนึ่งเรียกว่า “กองทุนสนับสนุนการวิจัย” ประกอบด้วยเงินและทรัพย์สินตามมาตรา ๕ เพื่อเป็นทุนหมุนเวียนและใช้จ่ายในการสนับสนุนการวิจัยอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพในด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี สังคมศาสตร์ มนุษยศาสตร์ การวิจัยเชิงนโยบายและการวิจัยประยุกต์ต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเศรษฐกิจ สังคม และวิชาการของประเทศ

ให้กองทุนเป็นนิติบุคคล มีวัตถุประสงค์เพื่อดำเนินกิจการสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยตามพระราชบัญญัตินี้ และให้มีอำนาจกระทำการใด ๆ ที่จำเป็นหรือต่อเนื่องเพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวนี้ได้ แต่จะต้องไม่ดำเนินการวิจัยเอง

ให้กองทุนมีสำนักงานใหญ่ในกรุงเทพมหานครเรียกว่า “สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย” โดยให้เป็นหน่วยงานในกำกับของสำนักนายกรัฐมนตรี มีระบบการบริหารงานที่แตกต่างจากระบบราชการเพื่อให้เกิดความคล่องตัวภายใต้นโยบายของคณะกรรมการนโยบาย

มาตรา ๕ เงินและทรัพย์สินของกองทุนประกอบด้วย

(๑) เงินที่รัฐบาลจัดสรรให้

(๒) เงินอุดหนุนจากต่างประเทศรวมทั้งองค์กรระหว่างประเทศ

(๓) เงินหรือทรัพย์สินที่มีผู้มอบให้เพื่อสมทบกองทุน

(๔) ดอกผลหรือรายได้ของกองทุน รวมทั้งผลประโยชน์จากทรัพย์สินทางปัญญาและผลประโยชน์อื่น ๆ ที่เกิดจากการวิจัย

ให้ออเงินงบประมาณกองทุนสนับสนุนการวิจัยตามมาตรา ๒๖ (๒) แห่งพระราชบัญญัติงบประมาณรายจ่ายประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๓๕ จำนวนหนึ่งพันสองร้อยล้านบาทมาเป็นเงินของกองทุนสนับสนุนการวิจัย

มาตรา ๖ การใช้จ่ายเงินกองทุนให้เป็นไปตามที่คณะกรรมการนโยบายกำหนดโดยให้ใช้เพื่อกิจการดังต่อไปนี้

สำเนาถูกต้อง

พ.ว. เติ๋น

(นางวรรณฉวี เคียงสุวรรณ)

หนังสือมอบอำนาจ

เขียนที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
วันที่ 4 เมษายน 2561

โดยหนังสือฉบับนี้ ข้าพเจ้า

- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยนายศักรินทร์ ภูมิรัตน ตำแหน่ง อธิการบดี อยู่ที่ 126 ถนนประชาธิปไตย แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดยนายสุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตั้งอยู่ที่ชั้น 14 อาคารเอสเอ็มทาวเวอร์ เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400

ขอแต่งตั้งและมอบอำนาจให้ นางสาวผ่องศรี เวสราวิช ตัวแทนสิทธิบัตรเลขที่ 1745 และ/หรือ นายบัณฑิต คำภูษา ตัวแทนสิทธิบัตรเลขที่ 2523 เป็นตัวแทนอันแท้จริง โดยร่วมกันและแยกกันในนามของข้าพเจ้าที่จะยื่นคำขอรับสิทธิบัตร หรือ อนุสิทธิบัตรภายใต้ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ว่า “องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จีนินทรานสโลเคชั่น” จดทะเบียน แก้ไข เปลี่ยนแปลงในส่วนที่เกี่ยวข้อง ถอนคำขอรับสิทธิบัตรยื่นคำคัดค้านจดทะเบียนสิทธิบัตร หรือยื่นคำขอให้มีการเพิกถอนสิทธิบัตรใดที่คล้ายหรือขัดกับคำขอดังกล่าว ให้มีอำนาจลงนาม และยื่นเอกสารหรือข้อความใดๆ ในนามของผู้มอบอำนาจ ซึ่งตัวแทนในฐานะดังกล่าวข้างต้น เห็นว่าจำเป็น หรือเหมาะสมเปลี่ยนแปลงและแก้ไขเอกสารดังกล่าว

เพื่อเป็นหลักฐานแห่งการนี้ข้าพเจ้าได้ลงลายมือชื่อ และประทับตราไว้เป็นสำคัญ (ถ้ามี)

ลงชื่อ ผู้มอบอำนาจ ลงชื่อ ผู้มอบอำนาจ
(นายศักรินทร์ ภูมิรัตน) (นายสุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ)

ลงชื่อ ผู้รับมอบอำนาจ ลงชื่อ ผู้รับมอบอำนาจ
(นางสาวผ่องศรี เวสราวิช) (นายบัณฑิต คำภูษา)

ลงชื่อ พยาน ลงชื่อ พยาน
(นายสุวิทย์ แซ่เตีย) (นางสาวจันทร์สม โคมเวียน)

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีน
ทวินอาร์จินินทรานสโลเคชันพาสเวย์

5 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินินทรานสโลเคชันพาสเวย์ (twin-arginine translocation pathway หรือ Tat pathway) ในการตัดแต่งพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่ใช้ยับยั้งโปรตีนที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ

10 ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์คือเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์และถูกนับว่าเป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับการพัฒนายารักษาโรคชนิดหนึ่ง สำหรับมนุษย์นั้น มีการค้นพบแล้วว่ามีความจำแนกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์อย่างน้อย 679 เอนไซม์ (Drag, M. and Salvesen, G.S., 2010) และนอกจากโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์แล้ว โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ของเชื้อโรคต่างๆ ก็นับเป็นเป้าหมายของการผลิตยาอีกด้วย โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์เป็นโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่ปัจจุบันถูกนำมาใช้
15 อย่างแพร่หลายในทางการแพทย์ ยกตัวอย่างเช่น โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension), โรคเอดส์ (HIV/AIDS), โรคมะเร็ง (Cancer) และโรคเบาหวาน (Diabetes) เป็นต้น (Drag, M. and Salvesen, G.S., 2010) โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่เคยถูกผลิตและได้รับการจดสิทธิบัตรแล้วคือ โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์สำหรับไวรัสเอชไอวี ซึ่งสิทธิบัตรดังกล่าวคือ US005413999A และ US5484926A ในส่วนของการผลิตโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ของไวรัสเอชไอวีในประเทศไทยนั้นก็มีเช่นเดียวกัน เช่น การผลิตโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่จำเพาะกับเม
20 ทริกซ์โปรตีน p17 ของไวรัสเอชไอวี (Kitidee, K., Nangola, S., Gonzalez, G., Boulanger, P., Tayapiwatana, C., & Hong, S. S., 2010) ซึ่งในงานวิจัยของผู้ประดิษฐ์นี้ได้นำโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ตัวดังกล่าวมาใช้ในการวิจัยอีกด้วย

วิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์อาศัยการโคลนนิ่งและผลิตโปรตีนที่สนใจทั้งด้วยวิธีใช้เซลล์และนำมาทำให้บริสุทธิ์ก่อนหรือวิธีไม่ใช้เซลล์ (cell-free expression) แล้วจึงนำโปรตีนที่ได้มา
25 คัดเลือกด้วยระบบการทดสอบทางอินวิโทร (in vitro assay system) เพื่อวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ เทคนิคส่วนใหญ่ที่ได้รับการพัฒนามานั้น อาศัยการใช้เปปไทด์หรือสารเคมีสับสเตรทที่เมื่อถูกตัดด้วยโปรตีนเอสแล้วสามารถปลดปล่อยตัวรายงานผล (reporter) ที่เป็นสารที่เกิดสี (chromogenic) สารเรืองแสง (fluorogenic) หรือ สารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immunological activity) อย่างไรก็ตาม การทดสอบแบบ *E. coli* ก็มีข้อจำกัด เช่น ไม่สามารถทำการคัดเลือกได้ครั้งละจำนวนมาก ต้องมีขั้นตอนการผลิตและทำ

โปรตีนให้บริสุทธิ์ คุณสมบัติของโปรตีนอาจเปลี่ยนไปเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์เมื่อเทียบกับเมื่ออยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตจริงๆ ดังนั้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยเทคนิคทางอินวิโว (*in vivo*) หรือในสิ่งมีชีวิตขึ้นมา ตัวอย่างของเทคนิคทางอินวิโวที่ใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่ได้ยื่นขอจดสิทธิบัตรแล้วได้แก่ WIPO Patent Application WO/2003/099846, WIPO Patent Application
5 WO/2005/097818 และ United States Patent Application 20080089862

สำหรับ WIPO Patent Application WO/2003/099846 คณะผู้ประดิษฐ์ใช้โปรตีนแสดงผลหรือรีพอร์ตเตอร์โปรตีน (reporter protein) เป็นอะพอพโทติกโปรตีน (apoptotic protein) ที่มีโปรตีนเอสคลีเวจไซต์ใส่ (insert) อยู่ภายใน อะพอพโทติกโปรตีนคือ โปรตีนที่มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ดังนั้น จึงสามารถประเมินประสิทธิภาพของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ได้จากการเปรียบเทียบความอยู่รอดของเซลล์
10 เมื่อมีหรือไม่มีโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์อยู่ ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้โปรตีนอะพอพโทติกโปรตีนซึ่งก็คือโปรตีนที่เมื่อถูกผลิตในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) จะกระตุ้นให้เซลล์ตาย เช่น Bax โปรตีน เมื่อไม่มีโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ โปรตีนเอสสามารถตัดได้ก็จะทำให้ Bax โปรตีนแยกออกเป็นสองส่วน ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ตามปกติ แต่เมื่อโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ไปขัดขวางการตัด Bax โปรตีนก็จะไม่ถูกตัดทำให้สามารถกระตุ้นให้เซลล์ตายได้ หรืออีกตัวอย่างคือ FADD (Fas associated via death domain) ซึ่งก็คือ อะแดปเตอร์โปรตีนซึ่งประกอบไปด้วย
15 สองโดเมน คือ DED และ DD โดยที่เซลล์ *E. coli* จะตายก็ต่อเมื่อ DD โดเมนถูกตัดและปลดปล่อยออกจาก FADD เมื่อโดนตัดออกเป็นสองส่วน ดังนั้น คลีเวจไซต์จึงถูกใส่ไปในบริเวณรอยเชื่อมต่อระหว่างสองโดเมนนี้ เมื่อ FADD ถูกผลิตในเซลล์ *E. coli* ในขณะที่มีโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์อยู่ ก็จะทำให้ FADD ไม่โดนตัด ทำให้เซลล์อยู่รอดได้ ในขณะที่เมื่อไม่มีโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ FADD โดนตัด ก็จะทำให้เซลล์ *E. coli* ตาย

สำหรับ WIPO Patent Application WO/2005/097818 นั้น คณะผู้ประดิษฐ์ใช้วิธีผลิตรีคอมบิแนนท์เอชไอวีโปรตีนเอสและเอนจินีแยร์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่มีคลีเวจไซต์ใส่อยู่ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 131
20 ซึ่งเป็นบริเวณลูบของโปรตีนที่เมื่อมีโปรตีนสายสั้นๆ จึงทำหน้าที่เป็นสับสเตรทของเอชไอวีโปรตีนเอส เมื่อโปรตีนเอสตัดโปรตีนเอสสับสเตรทคือ เอนจินีแยร์เบต้ากาแลคโตซิเดสออก ณ ตำแหน่งที่โปรตีนเอสคลีเวจไซต์อยู่ เอนจินีแยร์เบต้ากาแลคโตซิเดสก็จะไม่สามารถทำงานได้ คือไม่สามารถย่อยสาร *ortho*-nitrophenyl-D-galactopyranoside (ONPG) ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ เทคนิคการตรวจวัดแอกติวิตีของเบต้ากาแลคโตซิเดสอาศัยการย่อยสาร ONPG คือทำให้สับสเตรทเปลี่ยนจากที่ไม่มีสีเป็นมีสีฟ้า และ
25 สามารถตรวจวัดได้โดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยการทดลองนี้ถูกกระทำในไมโครเพลท 96 หลุมและแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสามารถถูกตรวจวัดได้โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

สำหรับ United States Patent Application 20080089862 นั้น คณะผู้ประดิษฐ์ใช้เอนจินีแยร์เบต้ากาแลคโตซิเดสคล้ายกับ WIPO Patent Application WO/2005/097818 แต่ได้มีการใส่คลีเวจไซต์
30 ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 279-280 แทน รวมถึงเทคนิคนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับโรคไวรัสตับอักเสบซีแทน อย่างไรก็ตาม การประดิษฐ์ขึ้นนี้ได้กล่าวถึงว่า มีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มกระบวนการไปโอแพนนิ่ง

- (biopanning) อย่างใดอย่างหนึ่งก่อนการคัดเลือกจากไลบรารี (library) เพื่อให้จำนวนโคลนีที่ต้องนำมาคัดเลือกมีจำนวนน้อยลงจนสามารถคัดเลือกได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเทคนิคนี้อาศัยเบต้ากาแลคโตไซด์เป็นรีพอร์ตเตอร์โปรตีนซึ่งเป็นการใช้เทคนิคสกรีนนิ่ง (screening) ไม่ใช่เทคนิคเซเลกชัน (selection) ทำให้ไม่สามารถทำการคัดเลือกเป็นจำนวนมากๆ ได้ในคราวเดียว อนึ่งในทางจุลชีววิทยาเทคนิคการสกรีนนิ่งคือการที่ต้องวิเคราะห์จำนวนโคลนีทั้งหมดเพื่อค้นหาโคลนีที่มีฟีโนไทป์ที่ต้องการ เช่น มีสีฟ้าเมื่อมีการผลิตเบต้ากาแลคโตไซด์และถูกเพลทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ONPG ดังนั้น เมื่อเพลทเซลล์เป็นจำนวนมากๆ ในคราวเดียวกันก็จะทำให้สามารถมองเห็นโคลนีเดียวที่มีสีฟ้าได้ยากขึ้น ในขณะที่เทคนิคเซเลกชันคือการคัดเลือกโดยอาศัยความต้อยาของโคลนี ทำให้เป็นการคัดเลือกโดยอาศัยความอยู่รอดของโคลนีเฉพาะเซลล์ที่ต้อยาได้ ทำให้สามารถทำการคัดเลือกเป็นจำนวนมากๆ ในคราวเดียวกันได้
- 5
- 10 โดยที่เทคนิคต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้น ก็มีความแตกต่างกันทั้งความไวต่อการตรวจวัด (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (assay time) ค่าใช้จ่าย (cost) และความจำเป็นในการใช้อุปกรณ์ที่อาจมีราคาแพง ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ที่อาจลดค่าใช้จ่าย ที่ง่ายกว่า รวดเร็วกว่า รวมถึงสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากในแต่ละครั้งได้ (High Throughput Screening, HTS)
- 15 การประดิษฐ์นี้ คณะผู้ประดิษฐ์ ได้นำกระบวนการขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย *E. coli* ที่เรียกว่า แททพาทเวย์ (Twin-arginine translocation (Tat) pathway) มาเป็นเครื่องมือทางชีวภาพเพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากไลบรารีของโปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* และจะไม่สามารถคัดเลือกรหัสพันธุกรรมของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ลักษณะพิเศษ 3 อย่างคือ 1) กระบวนการควบคุมคุณภาพ (quality control mechanism) คือความสามารถของแททพาทเวย์ที่เลือกขนส่งเฉพาะโปรตีนที่สามารถละลายน้ำ (soluble protein) ได้จากไซโตพลาสซึมไปสู่เพอริพลาสซึมของ *E. coli* และจะไม่สามารถขนส่งโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ 2) กระบวนการพิสูจน์อักษร (proofreading mechanism) คือกระบวนการที่แททพาทเวย์สามารถตรวจพบว่าโคแฟกเตอร์ได้ถูกใส่เข้าไปในโปรตีนคอมเพล็กซ์ก่อนที่จะขนส่งโปรตีนคอมเพล็กซ์นั้นออกไป 3) กระบวนการคนโบกรถ (hitchhiker's mechanism) คือความสามารถในการขนส่งโปรตีนสองตัวขึ้นไปที่จับกันอยู่เป็นคอมเพล็กซ์ได้ โดยมีโปรตีนเพียงตัวเดียวเท่านั้นที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide หรือ signal sequence) ที่จำเพาะกับแททพาทเวย์ (Tat signal sequence, ssTat) ซึ่งเป็น
- 20 เปปไทด์สายสั้นๆ ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณให้แททพาทเวย์ทำการขนส่งโปรตีนนั้นๆ ไปสู่เพอริพลาสซึม จึงเปรียบได้ว่าโปรตีนที่ไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณคนโบกรถของโปรตีนที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณเพื่อการขนส่งออกไปนั่นเอง ลักษณะพิเศษของแททพาทเวย์นี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในงานหลากหลายประเภทที่ได้รับการจดสิทธิบัตรแล้วเช่นกัน เช่น จาก United States Patent Application 20080287315 หรือ US8987173B2 ลักษณะพิเศษในข้อที่ 1 ได้ถูกนำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีนที่ถูกพัฒนาให้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีขึ้น หรือที่เรียกว่า เทคนิค ISELATE (Intrabody Selection after Tat Export) โดยกระบวนการนี้จากสิทธิบัตรเดิมใช้ในการตรวจสอบและคัดเลือกแอนติบอดีที่ผลิตภายในไซโทพลาสซึม
- 25
- 30

(cytoplasm) ว่าถูกผลิตในรูปที่ทำงานได้และส่งออกไปยังเพอริพลาสม (periplasm) ของแบคทีเรีย *E. coli* ได้หรือไม่ เทคนิคนี้ทำการคัดเลือกโปรตีนที่ละลายน้ำได้โดยการให้แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตฟิวชันโปรตีน (fusion protein) ที่ประกอบไปด้วย โปรตีนที่สนใจ (protein of interest, POI) อยู่ตรงกลางและมีเปปไทด์ส่งสัญญาณของแททพารเวย์อยู่ที่ปลายเอ็น (N-terminus) และมีรีพอร์ทเตอร์โปรตีนเป็นเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (β -lactamase) อยู่ที่ปลายซี (C-terminus) ไปพร้อมๆ กัน รีพอร์ทเตอร์โปรตีนจะทำให้เซลล์สามารถทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์ (β -lactamase ring) ได้ เมื่อรีพอร์ทเตอร์โปรตีนถูกขนส่งไปยังเพอริพลาสมเท่านั้น และเนื่องจาก Quality control mechanism ของแทท lactamase ทพารเวย์จะอนุญาตให้โปรตีนที่ละลายน้ำได้เท่านั้นถูกส่งออกมาสู่เพอริพลาสมได้ ก็จะทำให้เซลล์ที่มีโปรตีนที่สนใจเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ถูกส่งออกไปยังเพอริพลาสมซึ่งเป็นบริเวณที่รีพอร์ทเตอร์โปรตีนสามารถทำให้เซลล์ทนยาปฏิชีวนะชนิดที่ใช้ในการคัดเลือกได้ (อธิบายได้ดังรูปที่ 1) และจาก United States Patent 9150850 หรือ WO 2007024877A3 ลักษณะพิเศษในข้อที่ 3 ได้ถูกนำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีนสองตัวที่จับกัน เช่น แอนติเจนและชิ้นส่วนของแอนติบอดีที่สามารถถูกผลิตไม่เพียงแต่ในรูปที่ละลายน้ำได้แต่ยังสามารถทำงานได้อย่างถูกต้องอีกด้วย คือจับกับแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจงได้ หรือที่เรียกว่า เทคนิค FLI-TRAP, Functional Ligand-binding Identification by Tat-based Recognition of Associating Proteins เทคนิคนี้อาศัยรีพอร์ทเตอร์คือ เบต้า-แลคแทมเมสอีกเช่นกัน ในเทคนิคนี้ มีการผลิตฟิวชันโปรตีนสองชิ้น ชิ้นแรกประกอบไปด้วยเปปไทด์ส่งสัญญาณของแททพารเวย์อยู่ที่ปลายเอ็น และตามด้วยโปรตีนที่สนใจตัวที่หนึ่งที่ปลายซี อีกชิ้นประกอบไปด้วยโปรตีนที่สนใจตัวที่สองที่ปลายเอ็นและรีพอร์ทเตอร์ที่ปลายซี เมื่อโปรตีนตัวที่หนึ่งและตัวที่สองจับกัน จะเกิดการรวมตัวเป็นคอมเพล็กซ์ ทำให้โปรตีนทั้งก่อนถูกส่งออกไปยังเพอริพลาสม ทำให้เซลล์ทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์ได้ (อธิบายได้ดังรูปที่ 2)

20 ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอการออกแบบระบบอันประกอบไปด้วย องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้สำหรับคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสที่เป็นสาเหตุของโรคบางชนิดหรือที่เป็นส่วนสำคัญต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยใช้การทดสอบแบบอินวิโวในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยองค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้นี้สามารถนำไปคัดเลือกและวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ได้ นำไปคัดเลือกและวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตัดของสับสเตรทที่ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่างๆ โดยโปรตีนเอส หรือการตัดสับสเตรทต้นแบบโดยโปรตีนเอสที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ รวมถึงการนำไปใช้ในการคัดเลือทยาใหม่ๆ (drug screening) ได้ด้วยเช่นกัน เทคนิคนี้มีชื่อว่า Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering หรือเรียกสั้นๆ ได้ว่า PROTECT

30 เทคนิคนี้สามารถทำได้โดยการให้แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตโปรตีนเอส โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ และฟิวชันโปรตีน (fusion protein) ที่ประกอบไปด้วย สับสเตรทอยู่ตรงกลางและมีเปปไทด์ส่งสัญญาณของแททพารเวย์อยู่ที่ปลายเอ็น (N-terminus) และมีรีพอร์ทเตอร์โปรตีนเป็นเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (β -lactamase) อยู่ที่

ปลายซี (C-terminus) ไปพร้อมๆ กัน รีพอร์ทเตอร์โปรตีนจะทำให้เซลล์สามารถทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์ (β -lactamase ring) ได้เมื่อรีพอร์ทเตอร์โปรตีนถูกขนส่งไปยังเพอริพลาสมิ์เท่านั้น เพราะยาปฏิชีวนะชนิดนี้ สามารถผ่านเข้าเซลล์และไปอยู่ในเพอริพลาสมิ์ได้เท่านั้น ไม่สามารถผ่านไปยังส่วนไซโตพลาสมิ์ได้ ดังนั้นเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมสจึงไม่สามารถทำให้เซลล์ทนยาได้ขณะที่อยู่ในไซโตพลาสมิ์

5 ในขณะที่เปปไทด์ส่งสัญญาณของแททพารเวย์คือ ตัวส่งสัญญาณให้แททพารเวย์ทำหน้าที่ขนส่งฟิวชั่นโปรตีนออกไปยังเพอริพลาสมิ์ ดังนั้นการออกแบบฟิวชั่นโปรตีนในลักษณะนี้ ก่อให้เกิดความเชื่อมโยงทางกายภาพระหว่างการตัดของโปรติเอสหรืออีกนัยหนึ่งก็คือการยับยั้งการตัดของโปรติเอสอินฮิบิเตอร์กับความสามารถในการทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์นั่นเอง (อธิบายได้ดังรูปที่ 3) โดยที่ตัวอย่างของยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์คือ แอมพิซิลลิน และ คาร์เบนซิลลิน

10

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงภาพของระบบการขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย *E. coli* สามารถส่งออกได้เฉพาะโปรตีนที่พับม้วนอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้หรือทำงานได้เท่านั้น รูปภาพอ้างอิงจาก Fisher, A.C. and DeLisa, M.P., 2009.

รูปที่ 2 แสดงภาพการจับกันของโปรตีนที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณและไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณกับกระบวนการขนส่งโปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งคือกระบวนการ hitchhiker technique หรือ Functional Ligand-binding Identification by Tat-based Recognition of Associating Proteins (FLI-TRAP) รูปภาพอ้างอิงจาก Waraho, D. and DeLisa, M.P., 2009.

15

รูปที่ 3 แสดงหลักการการทำงานของโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ของสิ่งประดิษฐ์ทางซ้ายมือคือสามารถทำงานได้และทางขวามือคือไม่สามารถทำงานเพื่อปกป้องคลีเวจไซต์ของฟิวชั่นโปรตีนได้

รูปที่ 4 แสดงองค์ประกอบของพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวขนส่งยีนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* a. พลาสมิด pDD18 แสดงองค์ประกอบสำคัญทั้ง 3 ของสิ่งประดิษฐ์, b. พลาสมิด pDD322 แสดงโปรตีน TatABC ที่ช่วยในการขนส่งโปรตีนจากไซโตพลาสมิ์ไปยังเพอริพลาสมิ์

20

รูปที่ 5 แสดงการออกแบบพลาสมิดในงานประดิษฐ์ซึ่งมี 2 รูปแบบ a คือ ไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Tricistronic vector) และ b คือ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Bicistronic vector) ทั้งสองแบบอาศัยการแสดงออกร่วมกับ พลาสมิด pDD322 เช่นกัน

25

รูปที่ 6 แสดงผลการทดลองด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตเพื่อตรวจสอบการผลิตและการทำงานขององค์ประกอบทั้ง 3 ส่วนของระบบงานประดิษฐ์ โดย a คือผลการทดลองที่ตรวจสอบหาฟิวชั่นโปรตีน (ssTorA::p17 Δ p24:: β -lactamase), b คือ ผลการทดลองที่ตรวจสอบหาโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ (scFvp17 WT)

รูปที่ 7 แสดงผลการทดลองด้วยวิธีสปอตเพลทของ 1.) ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ของระบบไตรซิสทรอนิกส์ 2.) ชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ของระบบไตรซิสทรอนิกส์ 3.) ระบบไตรซิสทรอนิกส์ (WT) 4.) ระบบไบซิสทรอนิกส์ (WT) และ 5.) ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ของระบบไบซิสทรอนิกส์ ที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเข้มข้นของคาร์เบนิซิลิน 0, 25, 50, 100, 200 และ 400 µg/ml โดยรูป a คือ 0.1% อะราบิโนส, b คือ 0.2% อะราบิโนส, c คือ 0.5% อะราบิโนส และ d และ e คือตัวแทนกราฟที่แสดงผลการเจริญของทั้ง 5 ชุดทดลองด้วยวิธีสปอตเพลทโดยคัดเลือกมาจากคอนดิชันที่ดีที่สุดซึ่งก็คือเมื่อมีการกระตุ้นด้วย 0.5% อะราบิโนส (7c) จะแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองที่สนใจและชุดควบคุมเชิงลบได้มากที่สุด โดยเป็นการแสดงผลของระบบไตรซิสทรอนิกส์

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

- 10 การประดิษฐ์นี้ได้เปิดเผย ก. องค์ประกอบ ซึ่งในการประดิษฐ์นี้ได้ออกแบบและตัดแต่งพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) ให้ผลิตโปรตีนที่องค์ประกอบสำคัญ 3 ประการ เพื่อให้ทำงานในไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีสภาวะรีดิวซ์ โดยที่โปรตีนทั้ง 3 จะถูกผลิตออกมาแยกกันเป็นส่วนๆ เพื่อทำหน้าที่ของตนเอง ซึ่งคือ (1) โปรติเอสอินฮิบิเตอร์ (protease inhibitor) ซึ่งทำหน้าที่ในการปกป้องคลิเวจ
- 15 ไซต์ของสับสเตรทจากการตัดของโปรติเอส ส่วนที่ (2) หรือ ฟิวชันโปรตีน (fusion protein) ซึ่งมีองค์ประกอบย่อยอีก 3 ส่วนคือ โปรตีนหรือเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal sequence) ที่จำเพาะกับแททพาสเวย์ (ssTat), สับสเตรท และโปรตีนบ่งชี้หรือรีพอร์ตเตอร์โปรตีน (reporter protein) ในตัวอย่างนี้ รีพอร์ตเตอร์โปรตีนที่ถูกเลือกใช้คือ β -lactamase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดยาปฏิชีวนะจำพวก β -lactam ring ทำให้เซลล์สามารถทนยา
- 20 ปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์ (β -lactamase ring) เช่น แอมพิซิลลิน หรือคาร์เบนิซิลลินได้ สาเหตุที่เลือกเบต้าแลคแทมเมสเพราะเป็นโปรตีนโมเลกุลเดี่ยวที่มีขนาดค่อนข้างเล็กและยังสามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติเมื่อนำไปเชื่อมต่อกับโปรตีนอื่นๆ (Moore et al., *Anal Biochem* 247, 203-209, 1997) และสามารถ
- 25 ด้านทนยาปฏิชีวนะได้เมื่ออยู่ในเพอริพลาสซึมเท่านั้น องค์ประกอบย่อยในฟิวชันโปรตีนทั้งสาม จะถูกแสดงออกโดยการเชื่อมต่อกันเป็นโมเลกุลเดี่ยวเป็นฟิวชันโปรตีนดังต่อไปนี้ ssTat::substrate:: β -lactamase และ (3) โปรติเอส ทำหน้าที่คล้ายกรรไกร ทำหน้าที่ในการตัดบริเวณคลิเวจไซต์ของฟิวชันโปรตีนบนสับสเตรท
- และ ข. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรติเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินิน
- 25 ทรานสโลเคชั่น (twin-arginine translocation หรือ Tat) พาสเวย์ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพในการคัดเลือกโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ที่ใช้ปกป้องการตัดของโปรติเอส ไม่ว่าจะด้วยวิธีการปกป้องที่บริเวณบริเวณคลิเวจไซต์ของสับสเตรททำให้โปรติเอสไม่สามารถเข้าถึงได้ หรือที่ทำการจับกับโปรติเอสและยับยั้งการทำงานของโปรติเอส โดยที่กระบวนการนี้ประกอบไปด้วยขั้นตอนหลัก 3 ประการดังนี้ (1) การออกแบบการใส่ยีนที่จำเป็น
- 30 ในระบบเข้าพลาสซึมเพื่อให้ได้องค์ประกอบดังกล่าวข้างต้น (2) การวิเคราะห์คอนดิชันเพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือกโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ และ (3) การคัดเลือกโปรติเอสอินฮิบิเตอร์จากไลบรารี ซึ่งรายละเอียดของกระบวนการจะถูกอธิบายเพิ่มเติมในส่วนของการทดลอง

งานประดิษฐ์ชิ้นนี้มีการนำกระบวนการแทพพาเวย์มาประยุกต์ใช้ กล่าวได้คือ ในทางธรรมชาติ ภายในเซลล์แบคทีเรียจะมีกระบวนการขนส่งและเป้าหมายจำเพาะสำหรับการขนส่งโปรตีนที่ผลิตได้ในไซโตพลาสซึมไปยังจุดหมายต่างๆ หลากหลายกระบวนการ ซึ่งหนึ่งกระบวนการที่จะกล่าวถึงและเกี่ยวข้องกับงานประดิษฐ์ คือ กระบวนการขนส่งโปรตีน Twin-arginine translocation (Tat) pathway ซึ่งเคยกล่าวมาแล้ว

5 ข้างต้น กระบวนการขนส่งแทพพาเวย์มีความสามารถในการขนส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยกระบวนการขนส่งแทพพาเวย์นี้ประกอบขึ้นด้วยโปรตีนในกลุ่ม TatABC (Berks, Mol Microbiol 22, 393-404,1996; Settles et al., Science 278, 1467-1470,1997; Weiner et al., Cell 93, 93-101,1998) และในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้แทพพาเวย์ โดยนำความสามารถเฉพาะตัวของแทพพาเวย์ที่แสดงให้เห็นถึงกระบวนการควบคุมคุณภาพของกระบวนการขนส่งโปรตีนในแบคทีเรีย และคัดเลือกโปรตีนที่พับม้วนและ

10 โปรตีนที่ไม่พับม้วน (misfolded protein) ในการศึกษาแบบอินวิโว (*in vivo*) (Sanders et al., Mol Microbiol 41, 241-246,2001; Lutz et al., Protein Eng 15, 1025-1030,2002; DeLisa et al., Proc Natl Acad Sci USA 100, 6115-6120,2003) ยกตัวอย่าง เช่น งานวิจัยที่คิดค้นเพื่อใช้แทพพาเวย์เป็นแพลตฟอร์มพื้นฐานในการศึกษาและคัดเลือกความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction) ของโรคต่างๆ ดังต่อไปนี้ อัลไซเมอร์, พาร์กินสัน, โรคฮันติงตัน และโรคทางสมองอื่นๆ ที่เกี่ยวเนื่องกับโปรตีนที่

15 ไม่พับม้วน หรือในงานวิจัยที่ใช้แทพพาเวย์ เพื่อเป็นเครื่องมือที่ส่งเสริม และ/หรือ ยับยั้งความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของทั้งโปรตีนที่พับม้วนและโปรตีนที่ไม่พับม้วนในเซลล์สิ่งมีชีวิต นอกจากนั้นยังมีการประยุกต์ใช้แทพพาเวย์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้าน เช่น ใช้แทพพาเวย์เป็นวิธีในการช่วยวิเคราะห์และปรับปรุงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเพื่อให้เกิดการส่งเสริมหรือยับยั้งซึ่งกันและกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มงานวิจัยที่ใช้เพื่อคัดเลือกลาย หรือ สามารถใช้แทพพาเวย์ในการตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่าง

20 โปรตีนในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้โดยตรง ซึ่งคือใช้เป็นวิธีในการค้นหาและเป้าหมายของยา (drug target) ได้โดยตรง และภายใต้การประดิษฐ์นี้จะกล่าวถึงการนำแทพพาเวย์มาประยุกต์ใช้เป็นเทคโนโลยีเพื่อใช้หาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการตัดของโปรติเอสด้วยโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ ในปัจจุบันมีรายงานว่ามียาโปรติเอสอินฮิบิเตอร์กว่า 150 ชนิดที่อยู่ในระหว่างการพัฒนาทางคลินิกหรือถูกนำมาใช้ในทางคลินิกหรือการรักษาแล้ว โดยหนึ่งในสามของโปรติเอสอินฮิบิเตอร์นั้นนำมาใช้สำหรับโรคหัวใจและหลอดเลือด ส่วนที่เหลือมีการ

25 พัฒนาเพื่อนำไปใช้กับโรคอื่นๆ ได้อย่างหลากหลาย อันได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง, โรคเบาหวาน, โรคอัลไซเมอร์, การติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (HIV/AIDS), โรคเริม, โรคที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (coagulation) และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี (Insight Pharma Reports Protease inhibitors: Innovations drive drug pipeline; Drag, M. and Salvesen, G.S., 2010)

นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับงานประดิษฐ์ของผู้ประดิษฐ์ คือ การใช้แทพพาเวย์ของ

30 แบคทีเรีย *E. coli* ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนภายในเซลล์ (*in vivo* testing) ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีนที่สนใจ (ตัวอย่างเช่น โปรตีน หรือเปปไทด์สายสั้นจำพวกแอนติเจน) ที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณจำเพาะของแทพพาเวย์อยู่ (เช่น ssTorA) และโปรตีนบ่งชี้ (โปรตีนบ่งชี้จำพวกต่อต้านยาปฏิชีวนะ เช่น β -

lactamase อันเนื่องมาจากโปรตีนนี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้โดยเชื่อมโยงกับการเจริญของแบคทีเรียบนจานอาหารที่มียาปฏิชีวนะจำพวก คาร์เบนซิลลิน และ แอมพิซิลลิน) และในบางงานวิจัยสามารถใช้แททพาวเวอร์ในการขนส่งโปรตีนที่อยู่ในรูปการจับกันของสองโมเลกุล (heterodimeric complex) จากไซโตพลาสซึมไปยังเพอริพลาสซึมในเซลล์เจ้าบ้าน ในการคัดเลือกหรือระบุลักษณะจำเพาะของโปรตีนที่สนใจ (เช่น ลำดับทางชีวภาพ) ซึ่งการคัดเลือกดังกล่าวจะสังเกตได้จากการเจริญของเซลล์เจ้าบ้านในสภาพแวดล้อมที่กำหนด (เช่น จานอาหารที่บรรจุยาปฏิชีวนะ)

- ในส่วนของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการประดิษฐ์นี้ คือ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และ MC4100 แต่การประดิษฐ์นี้ไม่ได้จำกัดเฉพาะเพียงแต่สองสายพันธุ์ที่กล่าวมาแล้วเท่านั้น แต่ยังครอบคลุมถึงแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีระบบแททพาวเวอร์ด้วย เพราะในความเป็นจริงแล้วแบคทีเรียชนิดใดหรือสายพันธุ์ใดก็ตามที่มีระบบการขนส่งแททพาวเวอร์ถือว่านำมาใช้ในการคัดเลือกได้ แบคทีเรียเจ้าบ้านเหล่านั้นสามารถนำมาใช้งานแทนที่ *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ที่กล่าวไว้ข้างต้นได้ เช่น *E. coli* K12 และอนุพันธ์, *E. coli* B และอนุพันธ์, *E. coli* X1776 หรือ W3110 (เช่น F-, λ -, หรือ prototrophic), *E. coli* MC4100 และอนุพันธ์ (ตัวอย่างเช่น B0D, B1LK0, DADE, JARV16, *E. coli* LE392 และ RR1); แบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส (bacilli) ตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis*, กลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรีย (enterobacteriaceae) ตัวอย่างเช่น *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas sp.*, *Acetobacter*, *Actinomyces*, *Aerobacter*, *Agribacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bordetella*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Spirilla*, *Spirillum*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Trepanema*, *Vibrio*, และ *Yersinia* จากที่ได้กล่าวมานั้นทำให้ตระหนักได้ว่า เนื่องจากสิ่งประดิษฐ์ที่ผู้ประดิษฐ์ได้พัฒนาขึ้นอาศัยแททพาวเวอร์ที่มีระบบช่วยควบคุมและตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนดังที่กล่าวไปแล้วในส่วนของภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง ทำให้มั่นใจได้ว่าโปรตีนที่เลือกได้จะต้องสามารถเป็นรูปแบบที่ละลายน้ำได้และสามารถทำงานได้คือ ยับยั้งการทำงานของโปรตีนได้อีกด้วย

ผู้ประดิษฐ์ได้ใช้ระบบที่เกี่ยวข้องกับ เอชไอวี-1 โปรตีน และโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์เป็นหลักฐานของแนวคิด (proof of concept) นี้ ดังนั้นจะใช้ตัวอย่างนี้สำหรับอธิบายรายละเอียดในส่วนของการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์ในที่นี้

- สิ่งประดิษฐ์นี้เป็นสิ่งประดิษฐ์ที่เกิดจากการตัดแต่งพันธุกรรมของแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ (ในที่นี้ใช้อินทราเซลล์ลูลาร์แอนติบอดี) ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ของโปรตีนไวรัส p17 Δ p24 (สับสเตรท) จากการตัดของ

เอนไซม์เอชไอวี-1 โปรติเอส เนื่องด้วยในทางธรรมชาติของกระบวนการจำลองตัวของไวรัสจะมีช่วงของการตัดโปรตีนสายยาวของไวรัสและประกอบขึ้นเป็นไวรัสตัวใหม่ ช่วงกระบวนการดังกล่าวนี้เอนไซม์โปรติเอสจะทำหน้าที่ในการตัดข้อต่อเพื่อให้ง่ายออกเป็นสองโปรตีนย่อย ซึ่งคือ โปรตีนเมทริกซ์ (p17) และโปรตีนแคปซิด (p24) จากนั้นโปรตีนทั้งสองจะประกอบขึ้นเป็นไวรัสตัวใหม่ โดยแต่เดิมยาที่ใช้รักษาโรคเอดส์หรือยาต้านไวรัสเอชไอวีที่วางขายอยู่ตามท้องตลาดนั้น จะมีจุดประสงค์ในการยับยั้งการทำงานของไวรัสคล้ายคลึงกันคือ 5 ผลิตสารหนึ่งๆ ที่จำเพาะกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่มีความสำคัญกับไวรัสทั้งในกระบวนการจำลองตัวหรือกระบวนการการเข้ายึดเซลล์เจ้าบ้าน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านั้นถ้าเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วยนอกจากจะจับอย่างจำเพาะกับเอนไซม์ของไวรัสแล้ว เอนไซม์หรือโปรตีนบางตัวของผู้ป่วยถ้ามีลักษณะของบริเวณเร่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ของไวรัส สารนั้นจะเข้าจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือโปรตีนเหล่านั้นซึ่งเกิดผลเสียต่อ 10 ร่างกายผู้ป่วยโดยตรง เรียกว่า off-target effect จากข้อเสียนี้ทางผู้ประดิษฐ์จึงมีแนวความคิดที่จะลดปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น โดยการปรับเปลี่ยนบริเวณที่จะยับยั้งจากบริเวณเร่งของเอนไซม์มาเป็นบริเวณที่จะถูกตัดบนโปรตีนสายยาวของไวรัส (คลีเวจไซต์) แทน

รายละเอียดของหลักฐานของแนวคิดนี้สามารถชี้แจงได้ดังนี้ งานประดิษฐ์ชิ้นนี้มีการออกแบบ 3 องค์ประกอบที่สำคัญ คือ

1) โปรติเอสอินฮิบิเตอร์ หรือ อินทราเซลล์ลาร์แอนติบอดี (intracellular antibody) โดยในงานประดิษฐ์นี้ใช้อินทราเซลล์ลาร์แอนติบอดีในรูปแบบของซิงเกิลเชนแวนเดอร์เบลแฟรกเมนต์ (single-chain variable fragment, scFv) ที่จำเพาะต่อโปรตีนเอชไอวี-1 ชื่อ scFvp17

2) พิวชั่นโปรตีนที่ใช้รายงานผลอันประกอบไปด้วย ชิ้นส่วนของโปรตีนของเอชไอวี-1 ในสิ่งประดิษฐ์นี้ได้เลือกบริเวณที่มีจุดตัดของเอนไซม์โปรติเอสของเอชไอวี-1 หรือบริเวณโปรติเอสคลีเวจไซต์รวมอยู่ในชิ้นส่วนด้วย และชิ้นส่วนโปรตีนที่เลือกมา คือ ส่วนของโปรตีนเมทริกซ์ (p17) และแคปซิด (p24) โดยที่ส่วนของแคปซิดได้คัดเลือกส่วนที่มีขนาดเล็ก แต่มีรายงานก่อนหน้านี้แจ้งว่าสามารถถูกตัดได้ดีเช่นกันเมื่อเทียบกับชิ้นส่วนที่สมบูรณ์เพื่อให้สามารถถูกผลิตได้ขึ้นไม่ใหญ่นักและง่ายต่อการผลิตใน *E. Coli* ชิ้นส่วนนี้จึงถูกเรียกว่า p17Δp24 และมีบริเวณจดจำของกระบวนการขนส่งโปรตีนหรือเปปไทด์ส่งสัญญาณที่มาจากโปรตีนที่เป็น 20 สับสเตรทของแททพารเวียตามธรรมชาติชื่อ trimethylamine-N-oxide reductase (TorA signal sequence, ssTorA) ซึ่งถ้ากล่าวถึงเปปไทด์ส่งสัญญาณที่นำมาใช้ในงานประดิษฐ์ที่ต้องการตรวจสอบลักษณะจำเพาะหรือสังเกตความสามารถในการละลายน้ำหรือการพับม้วนตัวของโปรตีนที่สนใจหรือใช้ทดสอบความสามารถของสารหรือปัจจัยอื่นโดยใช้แททพารเวีย ไม่จำเป็นจะต้องใช้เปปไทด์ส่งสัญญาณเฉพาะตัว ssTorA ดังเช่นในงานประดิษฐ์นี้เท่านั้น ดังนั้น การประดิษฐ์นี้จึงยังครอบคลุมถึงการใช้เปปไทด์จำเพาะของ 25 แททพารเวียตัวอื่น เช่น CueO, DmsA, FdnG, FdoG, HyaA, NapA, SufI, WcaM, YagT, YcbK, YcdB, YdhX, and YnfE อีกด้วย และในด้านปลายเอ็น (N-terminus) และด้านปลายซี (C-terminus) เติมนอนไฮม์เบต้า-แลคแทมเมส (Beta/β-lactamase) เพื่อใช้ในการย่อยยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเบต้า-แลคแทม เขียนอย่างย่อได้ว่า ssTorA::p17Δp24::β-lactamase ซึ่งในกรณีโปรตีนบ่งชี้ก็เช่นกัน การประดิษฐ์นี้ไม่มีการจำกัดการ

ใช้เพียงแต่ β -lactamase ดังในงานประดิษฐ์นี้เท่านั้น แต่ยังครอบคลุมถึงการใส่โปรตีนบ่งชี้ตัวอื่น เช่น FLASH tag, streptomycin phosphotransferase, neomycin phosphotransferase, hygromycin phosphotransferase, โปรตีนที่ผลิตจากยีน aada, โปรตีนที่มีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ ประเภท ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, alkaline phosphatase, β -galactosidase, β -glucuronidase, chloramphenicol acetyl transferase (CAT), DHFR, luciferase และ โปรตีนในกลุ่มฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent protein) แต่ในงานประดิษฐ์นี้เลือกใช้โปรตีนบ่งชี้เป็น β -lactamase เพราะเอนไซม์หรือโปรตีนนี้เป็นโปรตีนโมเลกุลเดี่ยวที่มีขนาดค่อนข้างเล็กและยังสามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติเมื่อนำไปเชื่อมต่อกับโปรตีนอื่นๆ (Moore et al., *Anal Biochem* 247, 203-209, 1997) และเหตุผลสำคัญที่ผู้คิดค้นเลือกใช้โปรตีนบ่งชี้ชนิดนี้ คือ β -lactamase จะไม่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้เมื่ออยู่ในไซโตพลาสซึม ซึ่งกล่าวคือ สามารถทำงานได้ก็ต่อเมื่อถูกส่งออกมายังเพอริพลาสซึมเท่านั้น จึงเหมาะกับงานประดิษฐ์นี้เป็นอย่างมาก เนื่องจากผู้คิดค้นต้องการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่สนใจ โดยอาศัยเครื่องมือช่วยคัดเลือก แพทพาสเวย์ในการขนส่งโปรตีนที่ถูกปกป้องโดยโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์จากไซโตพลาสซึมไปยังเพอริพลาสซึม และสังเกตการเจริญบนจานอาหารที่บรรจุยาปฏิชีวนะได้จากการทำงานของ β -lactamase นั้นเอง และ

3) โปรตีนเอสของเอชไอวี-1 (HIV-1 protease) มีหน้าที่ตัดบริเวณคลีเวจไซต์ของชิ้นส่วนเมทริกซ์ (p17) และแคปซิดโปรตีน (p24) ในข้อ 2) สรุปคือ ชิ้นส่วนของงานด้านชีววิทยาสังเคราะห์มีทั้งหมด 3 ชิ้นส่วนประกอบกันดังนี้ scFvp17, ssTorA::p17 Δ p24:: β -lactamase, HIV-1 protease ชิ้นส่วนทั้งสามถูกตัดต่อและโคลนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งตัวนำส่งที่ใช้คือ พลาสมิด pDD18 ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 4a ซึ่งในระบบที่ใช้ทดสอบจริงนั้นจะมีการแสดงออกร่วมของอีกพลาสมิดหนึ่งด้วย ซึ่งคือพลาสมิด pDD322 ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 4b อันเนื่องมาจากพลาสมิดนี้มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของกระบวนการขนส่งโปรตีน (Twin arginine translocation/tat pathway) ซึ่งคือ โปรตีน tatA, tatB และ tatC โปรตีนทั้งสามชนิดนี้เป็นโปรตีนที่มีส่วนช่วยในการขนส่งโปรตีนโดยฝังตัวอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยโปรตีนเหล่านี้มีส่วนสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการขนส่งโปรตีนของสิ่งประดิษฐ์ และเป็นตัวช่วยลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากมีโปรตีนที่ช่วยในการส่งออกโปรตีนไม่เพียงพอ ทำให้ในงานประดิษฐ์นี้ไม่ต้องนำผลของประสิทธิภาพการส่งออกมาเป็นอุปสรรคเพิ่มในการออกแบบและทดสอบอีกต่อไป

จากที่กล่าวมาข้างต้นนั้นผู้ประดิษฐ์ได้ออกแบบพลาสมิดที่ใช้นำส่งยีน (gene) ที่ต้องการและส่งเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย *E. coli* ทำให้กล่าวได้ว่าผู้ประดิษฐ์มีการออกแบบ *E. coli* สังเคราะห์ (synthetic *E. coli*) เพื่อให้แบคทีเรีย *E. coli* สามารถผลิตโปรตีนทั้ง 3 ส่วนเพิ่มเติมจากการผลิตโปรตีนของแบคทีเรียในช่วงเวลาปกติ งานประดิษฐ์ชิ้นนี้มีการประยุกต์ใช้กระบวนการขนส่งโปรตีน (Tat-pathway) ที่มีอยู่ตามธรรมชาติเพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอส โดยในตัวอย่างนี้ อินทราเซลล์ลูลาร์แอนติบอดี scFvp17 ได้ถูกพิสูจน์แล้วว่าสามารถจับได้กับส่วน

ปลายของ p17 และจากการทดลองของผู้ประดิษฐ์พบว่าสามารถไปขัดขวางการจับของโปรตีนเอสต่อบริเวณคลีเวจไซต์ (ปกป้องคลีเวจไซต์) ของโปรตีนไวรัสเอชไอวี-1 (p17 Δ p24) ได้

เมื่อมีการผลิตทั้ง 3 ชิ้นส่วนโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของสิ่งประดิษฐ์เกิดขึ้น ชิ้นส่วนทั้งสามจะต้องทำหน้าที่ของตนเองในรูปแบบที่แตกต่างกันออกไปทั้งการปกป้องและการตัด ขณะเกิดการปกป้องโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์หรือ scFvp17 จะต้องเข้าจับอย่างจำเพาะกับบริเวณคลีเวจไซต์ของฟิวชั่นโปรตีน เพื่อทำการปกป้องไม่ให้ถูกตัดจากกระบวนการของเอชไอวีโปรตีนเอส ซึ่งสิ่งที่เกิดขึ้นคือ โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์จะเข้าจับอยู่บนฟิวชั่นโปรตีนเหมือนกับการขอเดินทางไปด้วยกันหรือกระบวนการคนโบกรถ (hitchhiker mechanism) อันเนื่องมาจากโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ไม่มีบริเวณจดจำเพาะกับกระบวนการขนส่งโปรตีน แต่ฟิวชั่นโปรตีนมีบริเวณดังกล่าวทำให้โปรตีนคอมเพล็กซ์นี้สามารถส่งออกไปยังบริเวณเพอริพลาสม์ของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ ซึ่งก็คืองานประดิษฐ์นี้อาศัยหลักการการจับกันของโปรตีนสองชนิดที่มีและไม่มีบริเวณจำเพาะและเกิดการส่งออกหรือ FLI-TRAP (Functional Ligand-binding Identification by Tat-based Recognition of Associating Proteins) แต่ความต่างของงานประดิษฐ์นี้คือนำเทคนิค PROTECT (Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering) นี้มาใช้ในการรายงานผลของการตัดของโปรตีนเอสและไม่ได้ใช้เพื่อหาโปรตีนสองชนิดที่สามารถจับกันได้ หลักการคือ ถ้าโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์สามารถจับอย่างจำเพาะและปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ได้ ฟิวชั่นโปรตีนก็จะไม่ถูกตัดโดยเอชไอวีโปรตีนเอส ทำให้เบต้า-แลคแทมเมสซึ่งเป็นรีพอร์ทเตอร์โปรตีนถูกส่งออกไปสู่เพอริพลาสม์และทำให้เซลล์ทนยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลคแทมได้ ถ้าโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ไม่สามารถปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ได้ ฟิวชั่นโปรตีนก็จะไม่ถูกตัดโดยเอชไอวีโปรตีนเอส ทำให้เบต้า-แลคแทมเมสซึ่งเป็นรีพอร์ทเตอร์โปรตีนยังคงค้างอยู่ในไซโตพลาสม์และทำให้เซลล์ทนยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลคแทมไม่ได้ เซลล์จึงตายและไม่เกิดเป็นโคโลนีขึ้น ส่วนการผลิตฟิวชั่นโปรตีนนั้น มีความคล้ายคลึงกับการออกแบบของ ISELATE technique (ISELATE: Intrabody Selection after Tat Export) ซึ่งมาจากอีกหนึ่งสิทธิบัตรที่ได้กล่าวถึงไปแล้ว แต่ข้อแตกต่างก็คือ ISELATE ใช้เพื่อคัดเลือหรือพัฒนาให้โปรตีนที่ไม่สามารถพับม้วนให้อยู่ในรูปละลายน้ำได้ให้กลายเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้โดยการสร้างการกลายพันธุ์แล้วใช้เทคนิค ISELATE คัดเลือก ในขณะที่เทคนิค PROTECT นี้ใช้ฟิวชั่นโปรตีนเพื่อเป็นตัวรายงานการทำงาน (การตัด) ของโปรตีนเอส

เมื่อกล่าวถึงวิธีที่ใช้ตรวจสอบและยืนยันว่าระบบของสิ่งประดิษฐ์ที่สร้างขึ้นนี้สามารถทำงานได้หรือไม่ จะกล่าวถึง การแสดงผลการทดสอบการทำงานของระบบที่ออกแบบเพื่อให้เกิดความเชื่อมโยงระหว่างการไม่ตัดของโปรตีนเอสกับการทนยาปฏิชีวนะของเซลล์โดยวิธีการทดลองแบบ *in vivo* ซึ่งคือสปอตเพลท (spot plate technique) และการยืนยันผลว่าการที่เซลล์ทนยาปฏิชีวนะได้นั้นเกิดจากการขนส่งฟิวชั่นโปรตีนให้ไปอยู่ในเพอริพลาสม์จริง ด้วยเทคนิคการติดตามโปรตีนเวสเทิร์นบลอต (western blot) ซึ่งเป็นวิธีแบบ *in vitro*

- วิธีสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันได้ว่าฟิวชั่นโปรตีนถูกตัดหรือไม่ เพราะถ้าฟิวชั่นโปรตีนไม่ถูกตัดก็จะถูกส่งออกทั้งโมเลกุลซึ่งจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าปลายเอ็นมีบริเวณจับจำเพาะของกระบวนการขนส่งโปรตีนจึงทำให้ฟิวชั่นโปรตีนที่ไม่ถูกตัดสามารถส่งออกไปยังเพอริพลาซมได้ทั้งโมเลกุล และทางปลายซีของฟิวชั่นโปรตีนมีเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมสอยู่ เมื่อถูกขนส่งออกไปยังเพอริพลาซมเอนไซม์นี้ก็จะทำงานโดยการย่อย
- 5 ยาปฏิชีวนะบริเวณโดยรอบและทำให้มีการเจริญของโคลนี *E. coli* ได้ ฉะนั้นวิธีนี้จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าฟิวชั่นโปรตีนถูกตัดหรือไม่ ซึ่งเป็นผลมาจากการปกป้องของโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ ส่วนอีกวิธีคือเวสเทิร์นบลอต วิธีนี้เป็นวิธีการติดตามผลในระดับโปรตีนว่าโปรตีนที่สำคัญทั้งสามชนิดถูกผลิตและทำงานหรือไม่ โดยวิธีการเวสเทิร์นบลอตนี้จะใช้การจับของแอนติบอดีกับเอพิโทปแท็กที่เชื่อมอยู่กับโปรตีน เช่น FLAG-tag ที่ใช้ในระบบนี้ ซึ่งเชื่อมอยู่กับโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ His-tag ที่เชื่อมอยู่กับเอชไอวีโปรติเอส และ Bla หรือเบต้า-แลคแทมเมสที่
- 10 เชื่อมอยู่ในฟิวชั่นโปรตีน เพราะฉะนั้นสามารถตรวจสอบได้ว่าฟิวชั่นโปรตีนและโปรติเอสอินฮิบิเตอร์สามารถผลิตและถูกส่งออกไปยังเพอริพลาซมหรือไม่จากการเตรียมทั้งไซโตพลาซมและเพอริพลาซมแยกกันจากตัวอย่างหนึ่งๆ ถ้าฟิวชั่นโปรตีนไม่ถูกตัดซึ่งเกิดจากการปกป้องโดยโปรติเอสอินฮิบิเตอร์จะสามารถติดตามฟิวชั่นโปรตีนได้ทั้งในไซโตพลาซมและเพอริพลาซม ซึ่งโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ก็เช่นเดียวกัน แต่ถ้าฟิวชั่นโปรตีนถูกตัดผลที่ควรสังเกตได้ คือ พบฟิวชั่นโปรตีนในเลนของไซโตพลาซมเท่านั้นและไม่พบในเพอริพลาซม การ
- 15 ติดตามผลโดยวิธีเวสเทิร์นบลอตนั้นจำเป็นต้องรู้ขนาดโปรตีนที่สนใจเพื่อเทียบว่าขนาดของโปรตีนที่ตรวจสอบได้ตรงกับขนาดโปรตีนที่ต้องการศึกษาหรือไม่

ต่อไปจะกล่าวถึงภาพรวมของสิ่งประดิษฐ์ ในขั้นตอนการออกแบบระบบของสิ่งประดิษฐ์ได้ทำการออกแบบเป็น 3 องค์ประกอบหลักดังต่อไปนี้

- 1.) โปรติเอสอินฮิบิเตอร์ หรือ อินทราเซลล์ลาร์แอนติบอดี (intracellular antibody) : “*scFvp17*”
- 20 2.) ชิ้นส่วนของโปรตีนของเอชไอวี-1 ในสิ่งประดิษฐ์นี้ได้เลือกบริเวณที่มีจุดตัดของเอนไซม์โปรติเอสของเอชไอวี-1 หรือบริเวณโปรติเอสคลีเวจไซต์รวมอยู่ในชิ้นส่วน สามารถเรียกชิ้นส่วนนี้ได้ว่า ฟิวชั่นโปรตีน (fusion proteins) : “*ssTorA::p17Δp24::Bla*”
- 3.) โปรติเอสของเอชไอวี-1 : “*HIV-1 protease*”

- สำหรับหลักการของเทคนิค PROTECT ภาพรวมที่เกิดจากการออกแบบนี้จะแสดงในรูปแบบที่ 3 ซึ่งคือ
- 25 ความน่าจะเป็นที่อาจเกิดขึ้นในสิ่งประดิษฐ์ทั้งสองประการคือ

- ประการที่หนึ่ง (จากภาพ 3a) คือ ความน่าจะเป็นที่เกิดขึ้นเมื่อโปรติเอสอินฮิบิเตอร์สามารถจับอย่างจำเพาะหรือเกิดปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (interaction) และปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ และยังสามารถส่งโปรตีนคอมเพล็กซ์ออกไปยังเพอริพลาซมของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ สิ่งที่เกิดขึ้นได้จากเหตุการณ์นี้ คือ จะสามารถเห็นโคลนีของ *E. coli* บนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะประเภทเบต้าแลคแทม เช่น แอมพิซิลลิน (ampicillin) และ
- 30 คาร์เบนนิซิลลิน (carbenicillin) เนื่องจากโปรตีนคอมเพล็กซ์ที่ถูกส่งออกไปยังเพอริพลาซมมีเอนไซม์เบต้า-

แลคแทมเมสที่ใช้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้นจะทั้งสองชนิดที่ได้กล่าวมาข้างต้นเป็นองค์ประกอบอยู่ในฟิวชันโปรตีน จึงสามารถเรียกได้ว่า เบต้า-แลคแทมเมสเป็นตัวรายงานการยับยั้งหรือไม่ยับยั้งการทำงานของโปรติเอส โดยโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ที่อยู่ในระบบของสิ่งประดิษฐ์นี้ได้ เบต้า-แลคแทมเมสเป็นตัวรายงานผลที่ทำให้ระบบนี้สามารถถูกนำมาใช้เป็นเทคนิคแบบซีเลคชั่นได้ เพราะเป็นการคัดเลือกด้วยความมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ ทำให้สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกราวละหลายๆ ได้ และ

ประการที่สอง (จากภาพ 3b) แสดงให้เห็นถึงโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ไม่มีคุณสมบัติในการปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ที่ไม่สามารถจับจำเพาะกับบริเวณคลีเวจไซต์ได้ หรือโปรติเอสไม่สามารถผ่านเข้าไปอยู่ในรูปละลายน้ำได้จึงไม่สามารถทำงานได้เช่นกัน ถ้าผลของการออกแบบระบบของสิ่งประดิษฐ์ออกมาในแบบภาพทางขวามือจะไม่สามารถเห็นการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะได้

ในลำดับต่อไปผู้ประดิษฐ์จะกล่าวถึงคำนิยามต่างๆ ที่ผู้ประดิษฐ์ได้ใช้อธิบายเกี่ยวกับสิ่งประดิษฐ์นี้

“โปรตีน” ใช้อ้างถึงสายโซ่ของกรดอะมิโนที่เชื่อมกันไว้ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ซึ่งจะสามารถเรียกว่าสายโซ่กรดอะมิโนก็ต่อเมื่อมีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบอย่างน้อยสองโมเลกุลขึ้นไป จนกระทั่งสามารถประกอบเป็นโปรตีนสายยาวได้ และยังนิยามคำว่าโปรตีนได้ไปจนถึงโปรตีนที่ประกอบขึ้นจากโมเลกุลโปรตีน และโมเลกุลอื่น เช่น น้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตจะเรียกว่าไกลโคโปรตีน (glycoprotein; glycosylated form), โปรตีนในรูปฟอสเฟต (phosphorylated form) เป็นต้น

“ปฏิสัมพันธ์” (interaction) สิ่ง que แสดงถึงความสัมพันธ์ทางกายภาพของสองโดเมน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจเกิดเนื่องจากความสัมพันธ์จากการสร้างพันธะทางเคมีต่อกันซึ่งส่งผลให้เกิดการเชื่อมต่อและความเสถียรที่มากขึ้นของทั้งสองโดเมน ยกตัวอย่างการมีปฏิสัมพันธ์ในเชิง ได้แก่ ปฏิสัมพันธ์เฉพาะระหว่างแอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี (antibody), ลิแกนด์ (ligand) และตัวรับ (receptor) ซึ่งเปรียบได้กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองโมเลกุลโปรตีน, ชิ้นส่วนโปรตีนหรือโปรตีนที่สมบูรณ์ที่มีอยู่ในสิ่งประดิษฐ์นี้

“โปรตีนเป้าหมาย” (target protein) ใช้เมื่อได้อ้างถึงโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกที่ใช้ผลิตโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกที่ใช้บ่งบอกถึงโปรตีนนั้นๆ ซึ่งสนใจในคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีน เช่น การละลายน้ำ การพับม้วนตัว เพื่อนำมาวิเคราะห์และใช้ประโยชน์ในสิ่งประดิษฐ์ โดยคำว่าโปรตีนเป้าหมายนิยามถึงทั้งโปรตีนต้นแบบ (wild-type หรือเขียนย่อๆ ว่า WT) และโปรตีนที่เป็นอนุพันธ์ของโปรตีนต้นแบบ หรือในบางงานวิจัยจะให้ความหมายของโปรตีนเป้าหมายว่า ตัวแปร (variant) หรือ กลายพันธุ์ (mutant) ซึ่งการประดิษฐ์นี้ไม่ได้จำกัดชนิดของโปรตีนเป้าหมายที่จะนำมาวิเคราะห์

“ฟิวชันโปรตีน” (fusion protein) หมายถึง สายโพลิเปปไทด์ หรือกรดนิวคลีอิกที่แสดงถึงสายโพลิเปปไทด์ดังกล่าว ฟิวชันโปรตีนประกอบไปด้วย เปปไทด์ที่จำเพาะกับกระบวนการขนส่งโปรตีน (tat pathway), โปรตีนเป้าหมาย และ โปรตีนที่ใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ (marker protein) ซึ่งเปปไทด์ที่จำเพาะกับ

กระบวนการขนส่งโปรตีนที่ระบุอยู่ใน DeLisa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 6115 (2003) ซึ่งได้นำมาใช้ประโยชน์ในการประดิษฐ์ขึ้นนี้ด้วย

“โปรตีนเครื่องหมายคัดเลือกหรือยีนรายงานผลหรือโปรตีนบ่งชี้” (selectable marker หรือ reporter gene) อธิบายถึงลำดับของกรดนิวคลีอิก (ยีน) ที่แสดงออกถึงกิจกรรม (activity) ของโปรตีนหรือ เอนไซม์ และแสดงถึงความสามารถในการเจริญในอาหารที่ขาดสารอาหารสำคัญต่อการเจริญ หรืออีกประการ 5 หนึ่งสามารถแสดงถึงการต่อต้านต่อยาปฏิชีวนะหรือยาอื่นๆ ที่เกิดขึ้น เมื่อโปรตีนเครื่องหมายคัดเลือกหรือยีน รายงานผลนี้เกิดการแสดงออก โดยในสิ่งประดิษฐ์นี้จะใช้โปรตีนเครื่องหมายคัดเลือกหรือยีนรายงานผล ต่อเชื่อมอยู่กับฟิวชั่นโปรตีน ยกตัวอย่างเช่น เซลล์เจ้าบ้านมีลำดับของกรดนิวคลีอิกที่ผลิตฟิวชั่นโปรตีนซึ่ง สามารถเจริญในสภาวะคัดเลือกได้ (เช่น สามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ) เนื่องจากกรดนิวคลีอิก 10 เหล่าที่ผลิตฟิวชั่นโปรตีนนั้นสามารถแสดงออกได้ถึงกิจกรรม (เช่น กิจกรรมของเบต้า-แลคแทมเมส, β -lactamase activity) ในการต่อต้านยาปฏิชีวนะได้

“คุณสมบัติการละลายน้ำ” (solubility profile) อธิบายถึงคุณสมบัติการละลาย และ/หรือ การพับ ม้วนตัวของโปรตีนเป้าหมาย โดยสามารถสังเกตคุณสมบัติเหล่านี้ได้จากความสามารถของเซลล์เจ้าบ้านที่มี ฟิวชั่นโปรตีนหรือโปรตีนเป้าหมายอยู่ในตัวและแสดงออกโดยการเจริญบนยา, ยาปฏิชีวนะ หรือตัวคัดเลือก 15 อื่นๆ (เช่น การแสดงออกของยาแอมพิซิลลิน) ฉะนั้นเซลล์เจ้าบ้านที่เจริญได้ในสภาวะที่มียา, ยาปฏิชีวนะ หรือ ตัวคัดเลือกอื่น บ่งบอกได้ถึงความสามารถในการละลายของโปรตีนเป้าหมายได้ ในขณะเดียวกันถ้าโปรตีน เป้าหมายไม่มีความสามารถในการละลายเซลล์เจ้าบ้านจะไม่สามารถเจริญในสภาวะคัดเลือกได้เช่นกัน คุณสมบัติ การละลายที่กล่าวถึงในสิ่งประดิษฐ์นี้สามารถใช้วิเคราะห์การละลายหรือการพับม้วนตัวของโปรตีนเป้าหมาย 20 และโปรตีนเป้าหมายที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutant target protein) ซึ่งคุณสมบัติการละลายสามารถตรวจจับ ได้จากความสามารถในการละลายของโปรตีนที่อยู่ในระหว่างทาง (intermediate) ของกระบวนการ (แสดงให้เห็น ถึงความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของเซลล์เจ้าบ้านที่สามารถผลิตฟิวชั่นโปรตีนในสภาวะที่มีการ แสดงออกของยา, ยาปฏิชีวนะ หรือตัวคัดเลือกอื่น กับการแสดงออกของฟิวชั่นโปรตีนที่เพอร์ฟาสซึม เช่น 25 ความสามารถในการละลายของฟิวชั่นโปรตีนที่มีโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนเครื่องหมายคัดเลือกเป็น องค์ประกอบอยู่)

“ระบบการส่งผ่านยีน” อธิบายถึงการส่งผ่านลำดับของกรดนิวคลีอิก (ยีน) เข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อ หนึ่งๆ ยกตัวอย่างเช่น การส่งผ่านยีนโดยใช้เวกเตอร์ (vector) (เช่น retroviral, adenoviral, adeno-associated viral, และการขนส่งกรดนิวคลีอิกด้วยกระบวนการขนส่งอื่น), การฉีดหรือยิงกรดนิวคลีอิกเข้าไป โดยตรง (microinjection of naked nucleic acid), การส่งผ่านโดยใช้โพลิเมอร์ (ลิโปโซมและอนุภาคโลหะ 30 อื่นๆ : liposome-based and metallic particle-based system), การยิงกรดนิวคลีอิกโดยวิธีทางชีวภาพ (gene gun) หรือวิธีการอื่นที่ใกล้เคียงกับวิธีการเหล่านี้

“บริเวณจำเพาะเพื่อใช้ในการจับของลำดับเป้าหมาย” (site-specific recombination target sequence) อธิบายถึงลำดับของกรดนิวคลีอิกที่ใช้เป็นลำดับจดจำของการจับกับสารหนึ่งๆ

“กรดนิวคลีอิก” (nucleic acid) อธิบายได้ว่าการรวมตัวของกรดนิวคลีอิกเพื่อกลายเป็นโมเลกุลหนึ่งๆ ไม่จำกัดว่าจะเป็นที่เอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ แต่ยังคงครอบคลุมทุกลำดับอื่นด้วย เช่น 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N6-methyladenosine, aziridinylcytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methyl pseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxy-aminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonylmethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine

“ยีน” (gene) อธิบายถึงลำดับของกรดนิวคลีอิก (เช่น ดีเอ็นเอ:DNA) ที่เป็นลำดับที่สำคัญสำหรับการผลิตโพลีเปปไทด์, อาร์เอ็นเอ (RNA) (รวมทั้ง เอ็มอาร์เอ็นเอ:mRNA, ทีอาร์เอ็นเอ:tRNA และ อาร์อาร์เอ็นเอ:rRNA) หรือสารตั้งต้นอื่น ยีนจะเป็นลำดับทางพันธุกรรมที่สามารถส่งต่อไปยังลูกหลานได้ ส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอได้ เรียกว่า exon และ บริเวณที่ไม่สามารถถอดรหัสได้ เรียกว่า intron ในทางกายภาพจะเกิดการตัดส่วนของ intron ออกซึ่งเรียกว่ากระบวนการ spliced out ในขั้นตอนการถอดรหัสช่วงต้น ซึ่งยีนในความหมายนี้ยังรวมถึง ซีดีเอ็นเอ (cDNA) อีกด้วย

“สิ่งต้นแบบ” (wild-type) หมายถึง ยีนหรือผลิตภัณฑ์ของยีนที่มีลักษณะเหมือนยีนหรือผลิตภัณฑ์ของยีนที่คัดเลือกจากแหล่งธรรมชาติ โดยยีนต้นแบบเหล่านี้จะพบได้บ่อยในกลุ่มประชากรหนึ่งๆ ดังนั้นจึงได้ชื่อว่าเป็นยีน “ปกติ” หรือ “ต้นแบบ” ในทางกลับกันคำว่า “ปรับเปลี่ยน (modified)” “กลายพันธุ์ (mutant)” “ความหลากหลาย (polymorphism)” “ตัวแปรหรือสิ่งที่เปลี่ยนผันได้ (variant)” ซึ่งคือยีนหรือผลิตภัณฑ์ของยีนที่ลำดับถูกปรับเปลี่ยน และ/หรือ คุณสมบัติบางประการถูกปรับเปลี่ยน เมื่อเทียบกับยีนต้นแบบหรือผลิตภัณฑ์ของยีนต้นแบบ ซึ่งสามารถคัดเลือกสิ่งที่เกิดการกลายพันธุ์และระบุได้อย่างเฉพาะเจาะจงถึงลักษณะที่เปลี่ยนไปได้ (เช่น การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของคุณสมบัติการละลายน้ำ)

“เอนไซม์ตัดจำเพาะ” (restriction enzyme) หมายถึง เอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยที่แต่ละชนิดนั้นจะสามารถตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับบริเวณจดจำของลำดับบนนิวคลีโอไทด์ได้แตกต่างกันไป

“การคัดแยก” (isolated) แสดงถึงลำดับของกรดนิวคลีอิกที่ถูกระบุและแยกออกจากองค์ประกอบ
 หนึ่งๆ หรือแยกออกจากการปนเปื้อนโดยปกติจะเกี่ยวข้องกับแหล่งธรรมชาติของสิ่งนั้น การคัดแยกโดยปกติ
 จะใช้วิธีคัดจากรูปร่างที่ปรากฏหรือการตั้งค่าหาความแตกต่างที่เคยพบจากธรรมชาติ ในทางตรงกันข้ามลำดับ
 ของกรดนิวคลีอิกที่ไม่ถูกคัดแยกคือ ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอที่พบได้อย่างปกติในธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น ดี
 5 เอ็นเอที่พบได้ปกติในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน หรืออาร์เอ็นเอ ที่ในแต่ละเอ็นอาร์เอ็นเอจะผลิตโปรตีนแต่ละ
 ชนิดแตกต่างกันออกไป ซึ่งจะพบได้จำนวนมากโดยอาจอยู่รวมกันแต่ผลิตโปรตีนเฉพาะตัวของแต่ละลำดับ
 ออกมา

“การทำให้บริสุทธิ์” (purified/to purify) อธิบายถึงการแยกองค์ประกอบที่ต้องการออกจากตัวอย่าง
 ตั้งต้น ตัวอย่างเช่น การแยกแอนติบอดีออกจากประปนของโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนอิมมูโนโกลบูลิน โดยการ
 10 ทำให้บริสุทธิ์เช่นนี้ คือ การแยกอิมมูโนโกลบูลินที่ไม่สามารถจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมายได้ โดยการ
 กระทำทั้งหมดนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตอบสนองต่อเป้าหมายให้มากขึ้น ในอีกตัวอย่าง คือสายโพลีเปป
 ไทด์สังเคราะห์ที่ใส่เข้าเซลล์เจ้าบ้านเกิดการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านนั้นจะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการแยก
 โปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านออกไป ซึ่งทำให้สายโพลีเปปไทด์สังเคราะห์มีปริมาณมากขึ้นในตัวอย่าง

“เวสเทิร์นบลอต” (western blot) คือวิธีการวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกตรึงอยู่บนตัวรองรับ เช่น ไนโตร
 15 เซลลูโลส (nitrocellulose) หรือเยื่อหุ้มอื่นๆ โปรตีนจะวิ่งในเจลอะครีลาไมด์เพื่อแยกโปรตีนแต่ละชนิดออก
 จากกัน และจากนั้นก็ย้ายโปรตีนจากเจลไปยังตัวรองรับอื่นที่เป็นของแข็ง เช่น ไนโตรเซลลูโลส หรือเยื่อไนลอน
 โปรตีนที่สนใจจะถูกตรึงไว้บนกระดาษจะถูกจับโดยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อกัน และสุดท้ายการตรวจจับการจับ
 กันของแอนติเจนและโปรตีนที่สนใจมีหลากหลายวิธี ตัวอย่างเช่น การติดแท็กด้วยสารรังสี

“เซลล์เจ้าบ้าน” (host cell) อธิบายถึงเซลล์ทั้งในหลอดทดลองหรือในสิ่งมีชีวิตที่ได้รับยีนจาก
 20 ภายนอก (เช่น เวกเตอร์ที่มียีนผลิตพิวซ์โปรตีนประกอบอยู่), โพลีนิวคลีโอไทด์ และ/หรือ โปรตีนที่ปรากฏอยู่
 ในสิ่งประดิษฐ์นี้เข้าสู่เซลล์ เซลล์เหล่านี้อาจเป็นเซลล์ยูคาริโอตหรือโพรคาริโอต ซึ่งไม่จำกัดว่าจะเป็นเซลล์
 ประเภทใดหรือกลุ่มใด ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านได้ตั้งแต่เซลล์แบคทีเรียไปจนถึงเซลล์สัตว์ชั้นสูง (เช่น *E. coli*,
 เซลล์ยีสต์, เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม, เซลล์สัตว์ปีก, เซลล์สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ, เซลล์พืช, เซลล์ปลา และเซลล์
 แมลง)

“แอนติบอดี” (antibody/immunoglobulin) คือโปรตีนที่จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน รวม
 25 ไปถึงโพลีโคลนอล (polyclonal), โมโนโคลนอล (monoclonal), แอนติบอดีที่มีการดัดต่อพันธุกรรมจากของ
 หนูและคน (chimeric) และแอนติบอดีที่มีสัดส่วนจากพันธุกรรมมนุษย์ (humanized antibodies), ส่วนของ
 Fab, ส่วนของ $F(ab')_2$ และรวมไปถึงอิมมูโนโกลบูลินคลาสต่างๆ เช่น IgG, IgA, IgM, IgD, IgE และ อิมมูโน
 โกลบูลินที่หลั่งออกมา (secretion immunoglobulin; slg) ซึ่งโดยปกติแอนติบอดีจะมีองค์ประกอบหลัก 2
 30 ส่วนคือ 2 เส้นใยโปรตีนชนิดหนัก (heavy chain) และ 2 เส้นใยโปรตีนชนิดเบา (light chain) อย่างไรก็ตาม

คำนิยามของแอนติบอดีรวมไปถึงแอนติบอดีทั้งสายเดี่ยว (single chain antibody) และสายคู่ (two chain antibody)

“อีพิโทป” (epitope) คือตำแหน่งบนแอนติเจนที่เป็นบริเวณจำเพาะกับส่วนหนึ่งของแอนติเจน หรืออิมมูโนโกลบูลิน

- 5 “การจับกันอย่างจำเพาะเจาะจง” (specific/specifically binding) ถ้าอ้างอิงจากปฏิสัมพันธ์ของแอนติบอดีและโปรตีนหรือเปปไทด์ ซึ่งปฏิสัมพันธ์นี้ขึ้นอยู่กับปรากฏส่วนของโครงสร้าง (เช่น อีพิโทป) เฉพาะบนโปรตีนนั้นๆ หรือในอีกนัยหนึ่ง คือ แอนติบอดีสามารถจดจำและเข้าจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีน ยกตัวอย่างเช่น ถ้าแอนติบอดีมีความจำเพาะกับเอพิโทป A ถ้ามีโปรตีนที่มีเอพิโทป A ปรากฏขึ้นโดยที่
- 10 อื่นที่จับกับเอพิโทป A ลดลง

จากทั้งหมดที่ได้กล่าวมาข้างต้น ผู้ประดิษฐ์ได้ดำเนินการตามลำดับของวิธีการทดลองและสามารถแสดงผลการทดลองได้ต่อไปนี้

การทดลอง

- 15 ขณะทำการทดลองสิ่งประดิษฐ์นี้มีขั้นตอนหลากหลายและแต่ละขั้นตอนอาจใช้อักษรย่อที่แตกต่างกันออกไป ผู้ประดิษฐ์จึงได้รวบรวมอักษรย่อต่างๆ ไว้ในตารางด้านล่างนี้

อักษรย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ชื่อเต็ม (ภาษาไทย)	ชื่อเต็ม (ภาษาอังกฤษ)
hr	ชั่วโมง	hours
g	กรัม	grams
l, L	ลิตร	liters
μ l	ไมโครลิตร	microliters
μ M	ไมโครโมลาร์	micromolar
μ mol	ไมโครโมล	micromoles
mg	มิลลิกรัม	milligrams
ml	มิลลิลิตร	milliliters
mmol	มิลลิโมล	millimoles
mM	มิลลิโมลาร์	millimolar
M	โมลาร์	molar

mol	โมล	moles
ng	นาโนกรัม	nanograms
nm	นาโนเมตร	nanometers
nmol	นาโนโมล	nanomoles
LB	-	Luria-Bertani broth
Sigma	บ.ซิกม่า	Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo
Abcam	บ.แอปแคม	Abcam, Inc., Cambridge, Mass

ขั้นที่ 1 การออกแบบการใส่ยีนที่จำเป็นในระบบเข้าพลาสมิด โดยการออกแบบตัวนำส่งยีนหรือเวกเตอร์ หรือพลาสมิดนี้ได้อธิบายส่วนประกอบสำคัญหลัก 3 ประการไว้แล้วในข้างต้นและแสดงองค์ประกอบตามคำอธิบายไว้ในรูปที่ 4a และ 4b ในส่วนรายละเอียดการออกแบบพลาสมิด, เวกเตอร์ หรือตัวนำส่งยีนนั้น สามารถอธิบายได้ดังนี้

ในขั้นตอนการออกแบบพลาสมิดของสิ่งประดิษฐ์นี้ใช้พลาสมิดชื่อ pDD18 และ pDD322 (Waraho, D. and DeLis, M.P., (2009) Proc Natl Acad Sci U S A. 106(10):3692-7) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถูกดัดแปลงมาจากพลาสมิดต้นแบบคือ pBAD18-Cm และ pBR322 เนื่องจาก pBAD18-Cm และ pBR322 มีชิ้นส่วนของเบต้า-แลคแทมเมสซินค้างอยู่จากการตัดต่อพลาสมิดต้นแบบของพลาสมิดเหล่านั้น และทำให้เกิดความผิดปกติของระบบได้ดังที่กล่าวไว้ในงานวิจัยที่อ้างถึงนี้ โดยที่พลาสมิดทั้งสองชนิดนี้ ได้ถูกนำมาใช้ในระบบ FLI-TRAP ด้วยเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ เนื่องจาก pDD322 มียีนที่ทำให้เซลล์ทนยาเตตราไซคลินซึ่งเป็นยาที่ยังมีการใช้ในมนุษย์เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก (selectable marker) ทำให้ผู้ประดิษฐ์ตัดต่อยีนนั้นออกและเปลี่ยนเป็นยีนที่ทำให้เซลล์ทนยากานามัยซินแทนและเรียกเวกเตอร์ใหม่นี้ว่า pDD322-Kan จากนั้นจึงทำการตัดต่อพันธุกรรมของยีนต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 องค์ประกอบในระบบ PROTECT ลงใน pDD18 ได้แก่

1) โปรติเอสอินฮิบิเตอร์ (protease inhibitor) หรือในตัวอย่างที่ใช้นี้คือ อินทราเซลล์ูลาร์แอนติบอดี (intracellular antibody) ที่อยู่ในรูปแบบ scFv (single chain variable fragment) โดยโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ที่เลือกใช้ในงานประดิษฐ์นี้คือ scFvp17 เนื่องจาก scFvp17 สามารถจับอย่างจำเพาะกับบริเวณปลายซีของโปรตีน p17 ซึ่งบริเวณอนุรักษของโปรตีน p17 คือ ¹²¹DTGHSSQVSQNY¹³² โดยผู้ประดิษฐ์เชื่อว่าโปรติเอสอินฮิบิเตอร์นี้จะสามารถปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ของโปรตีนเป้าหมายและยับยั้งการทำงานของโปรติเอสได้ และบริเวณที่ใช้ในการตัดต่อ คือ ระหว่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ SacI และ SalI ในขณะเดียวกันที่ปลายซีของโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ผู้ประดิษฐ์ได้ทำการตัดต่อ FLAG-tag เพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ (purification) หรือใช้เพื่อติดตามผลการทดลองด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต

- 2) พิวชั้นโปรตีน ซึ่งในตัวอย่างนี้มีสับสเตรทหรือโปรตีนเป้าหมายเอชไอวี-1 โดยสิ่งประดิษฐ์นี้เลือกโปรตีนเป้าหมายที่มีบริเวณจดจำหรือบริเวณโปรติเอสคลีเวจไซต์ของเอนไซม์โปรติเอสเอชไอวี-1 เพื่อให้เอนไซม์ดังกล่าวทำงานโดยการตัดโปรตีนเป้าหมายได้ โดยบริเวณที่ใช้ในการตัดต่อ คือ ระหว่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ XbaI ดังนั้นโปรตีนเป้าหมายที่เลือกมาใช้ในการสิ่งประดิษฐ์นี้คือ เมทริกซ์โปรตีน (matrix protein : p17) และแคปซิดโปรตีน (capsid protein : p24) นอกจากนั้นผู้ประดิษฐ์ยังได้ออกแบบเพิ่มเติมให้โปรตีนเป้าหมายนี้อยู่ในสภาพพิวชั้นโปรตีน โดยเติม ssTorA (signal sequence TorA) ที่ปลายเอ็น (N-terminus) และเติมเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (Beta/ β -lactamase) ที่ปลายซี (C-terminus) ของโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมสมีคุณสมบัติการย่อยสลายยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเบต้า-แลคแทม ซึ่งในที่นี้เปรียบเสมือนตัวรายงานผลการทดลองหรือโปรตีนติดตามผลซึ่งใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบด้วยวิธีสปอตเพลท และเวสเทิร์นบลอต
- 3) เอนไซม์โปรติเอส ซึ่งในตัวอย่างนี้คือโปรติเอสของเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 (HIV-1 protease) มีหน้าที่จับอย่างจำเพาะและตัดบริเวณคลีเวจไซต์ของโปรตีนเป้าหมาย บริเวณที่ใช้ในการตัดต่อ คือ ระหว่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ ApaI และ XhoI ในขณะเดียวกันที่ปลายซีของเอนไซม์โปรติเอสผู้ประดิษฐ์ได้ทำการตัดต่อ Histidine-tag เพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ (purification) หรือใช้เพื่อติดตามผลการทดลองด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต
- กระบวนการในขั้นตอนนี้ การประดิษฐ์จะครอบคลุมถึงการโคลนยีนที่เป็นองค์ประกอบทั้งสามอย่างเข้าสู่พลาสมิดเท่านั้น ไม่ว่าจะเป็นการใช้พลาสมิดใดๆ ก็ตาม ไม่เพียงแต่ pDD18 และ pDD322 หรือมีการแยกองค์ประกอบออกจากพลาสมิดเดียวกัน เช่นในระบบไตรซิสทรอนิก หรือไบซิสทรอนิกที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ 1 トラバใดที่องค์ประกอบ トラバใดที่มีการโคลนองค์ประกอบทั้งสามนี้ได้แก่ โปรติเอส พิวชั้นโปรตีน และโปรติเอสอินฮิบิเตอร์และนำไปผลิตในเซลล์พร้อมกันเพื่อคัดเลือกโปรติเอสอินฮิบิเตอร์
- ลำดับต่อไปจะกล่าวถึงตัวอย่างขั้นตอนการทดลอง โดยสายพันธุ์ของแบคทีเรียและสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ใช้ในการประดิษฐ์นี้คือ สายพันธุ์ต้นแบบ (wild-type) MC4100 ซึ่งใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกและการทดสอบทั้งหมด และ DH5 α ซึ่งใช้ในขั้นตอนการตัดต่อและโคลนนิ่ง โดยปกติแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเจริญได้ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) และอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) โดยในการประดิษฐ์นี้จะใช้แบคทีเรีย *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการรับพลาสมิดที่เกิดจากการตัดต่อพันธุกรรมให้มียีนประกอบหลัก 3 องค์ประกอบดังที่กล่าวไปแล้ว เพราะฉะนั้นจึงต้องเตรียมเซลล์ *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน (competent cell) ซึ่งทำได้โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ อัตราการเขย่า 200 rpm เป็นเวลาอย่างต่ำ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงใน 50 มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ใหม่ โดยใส่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในอัตราส่วน 1:50 แล้วเลี้ยงในสภาวะเดิมประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งค่า OD₆₀₀ (optical density) ที่วัดได้จะอยู่ในช่วง 0.4-0.6 (วัดในช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) หลังจากได้ความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการแล้ว จึงทำตามขั้นตอนเพื่อให้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* อยู่ในสภาพพร้อมรับพลาสมิดซึ่งเตรียมได้ 2 รูปแบบ คือ เซลล์

E. coli ที่อาศัยการนำส่งพลาสมิดโดยใช้ความร้อนกระตุ้น (heat shock transformation) และ เซลล์ *E. coli* ที่อาศัยการนำส่งพลาสมิดโดยใช้ไฟฟ้ากระตุ้น (electroporation)

- หลังจากนั้นจึงส่งผ่านพลาสมิดทุกแบบข้างต้นเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ที่พร้อมใช้งานด้วยวิธีส่งผ่านโดยใช้ไฟฟ้าหรือความร้อนกระตุ้นอย่างใดอย่างหนึ่ง พร้อมทั้งคัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดทั้งสองโดย
- 5 อาศัยการใส่ยาปฏิชีวนะอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ซึ่งคือ คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) และ กานาไมซิน (kanamycin) เพราะ pDD18 สามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลและ pDD322 สามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะกานาไมซิน หลังจากนั้นจึงนำเซลล์ *E. coli* ที่บรรจุด้วยสองพลาสมิดนี้ไปทำการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ต่อไป

- เพราะฉะนั้นผลสรุปของการออกแบบดังกล่าวนี้ คือ scFvp17, ssTorA::p17 Δ p24:: β -lactamase
- 10 และ HIV-1 protease นอกจากนี้ ยังมีการโคลนยีนที่ผลิตองค์ประกอบของแทพพาร์เวย์ได้แก่ TatA TatB และ TatC (TatABC) ไว้ใน pDD322-Kan อีกด้วยเพื่อให้ถูกผลิตพร้อมกับองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค PROTECT ยิ่งขึ้น เวกเตอร์ใหม่นี้เรียกว่า pDD322-Kan TatABC ระบบที่กล่าวไปแล้วนั้น เรียกว่าเป็นระบบที่เป็นแบบไตรซิสทรอนิก (ดังรูปที่ 4a และ 4b) เนื่องจาก
- 15 ยีนองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT นั้นอยู่ใน pDD18-Cm ทั้งหมดและอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ตัวเดียวกันคือ AraBAD โปรโมเตอร์ ในขณะที่โปรตีน TatABC นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ TatABC native ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนตลอดเวลา ยิ่งไปกว่านั้นในสิ่งประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ได้ออกแบบการแสดงออกของพลาสมิดไว้ใน 2 รูปแบบคือ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Bicistronic vector) และ
- 20 ไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Tricistronic vector) สำหรับระบบที่เป็นแบบไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ คือการออกแบบให้มีเพียง 2 องค์ประกอบหลักซึ่งคือ โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ (scFvp17) และ พิวชั่นโปรตีนหรือโปรตีนเป้าหมาย (ssTorA::p17 Δ p24:: β -lactamase) เท่านั้นที่อยู่ในพลาสมิด pDD18-Cm ส่วนเอนไซม์โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์จะเปลี่ยนไปบรรจุในพลาสมิด pDD322 แทน (pDD322-Kan TatABC HIV-1 PR) ดังรูปที่ 5a และ 5b ทำให้โปรตีนเอสที่อยู่ในระบบนี้จะถูกผลิตตลอดเวลาไปพร้อมๆ กับโปรตีน TatABC

นอกจากนี้ผู้ประดิษฐ์ยังได้ออกแบบชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ที่กล่าวไว้ในตัวอย่างที่ 1 ในลำดับถัดไป

- 25 **ขั้นที่ 2** การวิเคราะห์คอนดิชันเพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ การวิเคราะห์ผลการป้องกันการตัดสับเสตรโทโดยโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ จำเป็นต้องมีการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุด การวิเคราะห์ผลสามารถทำได้จากตัวอย่างดังนี้ นำพลาสมิดที่ได้ออกแบบไว้นั้นทำการส่งผ่าน (ทรานสฟอร์ม) เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* แล้วจึงนำมาศึกษาการแสดงผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์จากระบบของสิ่งประดิษฐ์โดยจะแสดงผลการทดลองในส่วนนี้ในรูปแบบของวิธีสปอตเพลทเพื่อ
- 30 สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* บนจานอาหารที่มีความเข้มข้นของปริมาณยาปฏิชีวนะคาร์เบนซิลลิน

และตัวกระตุ้น (น้ำตาลอะราบิโนส) ในการทดลองครั้งที่ 1 เป็นการทดลองเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตของระบบที่ได้สร้างขึ้น โดยใช้อุณหภูมิที่ 30°C และ 37°C ที่ความเข้มข้นอะราบิโนส 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลปรากฏว่าที่ 30°C ระบบที่สร้างขึ้นนี้ทำงานได้ดีกว่า หรือในอีกทางสามารถบอกได้ว่าที่อุณหภูมิ 30°C scFvp17 หรือ โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ สามารถถูกผลิตในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ดีกว่าจึงทำงานปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ของสับสเตรทของไวรัส HIV-1 ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 37°C อันเนื่องมาจากที่อุณหภูมิ 37°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* เป็นอย่างมาก เพราะฉะนั้นที่อุณหภูมิดังกล่าวแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวออกได้เป็นจำนวนมากซึ่งทำให้ไม่เหมาะสมกับการผลิตโปรตีนที่มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น scFvp17 ซึ่งขึ้นส่วนของแอนติบอดี เนื่องจากระบบการทำงานที่ได้ออกแบบและส่งผ่านเข้าสู่แบคทีเรียถูกสร้างและผลิตในอัตราเร็วที่สูงตามการเจริญและการแบ่งตัวของแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเป็นเหตุผลให้ scFvp17 ถูกผลิตเร็วและมีจำนวนมากพร้อมๆ กันจนเกินไป เมื่อเทียบกับอัตราส่วนเวลาเดียวกันที่อุณหภูมิ 30°C จึงส่งผลให้บริเวณไม่ชอบน้ำ (hydrophobic patch) ของโปรตีนจำนวนมากที่ยังไม่ได้มันพับนั้นเกิดการจับกันเองและเกิดการบดบังกันของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำจนส่งผลให้โปรตีนหรือเอนไซม์ดังกล่าวเกิดการจับตัวกันเองและตกตะกอนไปอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (aggregation/inclusion body) และไม่สามารถอยู่ในรูปที่ทำงานได้หรือพับมันและทำงานได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น และนอกจากนั้นพื้นที่ที่ใช้ผลิตในแบคทีเรีย *E. coli* ก็มีจำกัด เมื่อโปรตีนถูกผลิตออกมาจนเกินไปในพื้นที่จำกัดก็ยิ่งส่งผลให้โปรตีนตกตะกอนมากขึ้น จากการทดลองครั้งที่ 1 ทำให้ทราบได้ว่าระบบของงานประดิษฐ์นี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C

เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมแล้วลำดับต่อมาคือศึกษาประสิทธิภาพของระบบที่สร้างขึ้นด้วยวิธีสปอตเพลท โดยมีลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้ เลี้ยงเซลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดทั้งสองบรรจุอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และกานามัยซิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C อัตราการเขย่า 200 rpm เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาบ่มจะทำการปรับความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นให้เท่ากันคือ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.5 แล้วจากนั้นจึงเจือจางเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้ง 5 ระบบ ดังต่อไปนี้ 1) ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ของระบบไตรซิสทรอนิก 2) ชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ของระบบไตรซิสทรอนิก 3) เวกเตอร์แบบไตรซิส 25 ทรอนิก (Tricistronic vector) (WT หรือสับสเตรทที่มีคลีเวจไซต์แบบโปรตีนดั้งเดิมของไวรัส HIV-1) 4) เวกเตอร์แบบไบซิสทรอนิก (Bicistronic vector) (WT) และ 5) ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ของระบบไบซิสทรอนิก ตั้งแต่ความเข้มข้น 2.5×10^{-1} - 10^{-6} cfu/ml ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งนั้นจะมีส่วนประกอบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ความเข้มข้นของอะราบิโนสเท่ากับ 0.1%, 0.2% และ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เป็นอินดิเวอร์ของพลาสมิด pDD18 ใส่เพื่อให้โปรโมเตอร์ของพลาสมิดเริ่มการผลิตโปรตีน) และยาปฏิชีวนะประเภทเบต้า-แลคแทม (คาร์เบนซิลลิน) ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100, 200 และ 30 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากเจือจางเชื้อ *E. coli* และเตรียมอาหารแข็งแล้ว ลำดับต่อไปจะเป็นการสปอตเชื้อ *E. coli* ที่ได้เจือจางไว้ลงอาหารแข็ง โดยหยดเชื้ออีโกลีเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6} cfu/ml

(colony-forming unit/ml) โดยความเข้มข้นละ 5 ไมโครลิตรเป็นแถวต่อกันไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อสังเกตผลการทดลองที่เกิดขึ้นว่าระบบของสิ่งประดิษฐ์ที่สร้างขึ้นสามารถผลิตทำงานและตรวจสอบได้โดยใช้ระบบการขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ตามวัตถุประสงค์หรือไม่ ถ้าโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ (scFvp17) มีประสิทธิภาพในการปกป้องคลีเวจไซต์ของโปรตีนเป้าหมายจะสามารถสังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* บนจานอาหารแข็งที่ได้ทำการสปอตเพลทไว้ แต่ถ้าโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ไม่มีประสิทธิภาพ (GLF) หรือไม่สามารพพับม้วนเพื่ออยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้จะไม่มีผลการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ในจานอาหารแข็ง

ซึ่งผลการทดลองที่ออกมาสามารถระบุได้ว่าองค์ประกอบทั้ง 3 ส่วนซึ่งคือ โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ (scFvp17 หรือ GLF), พิวซ์โปรตีน (ssTorA::p17 Δ p24:: β -lactamase) และ เอนไซม์โปรติเอส HIV-1 สามารถถูกผลิตและมีประสิทธิภาพในการทำงานปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ของพิวซ์โปรตีนจากการตัดของเอนไซม์โปรติเอส HIV-1 ได้ (ดังตัวอย่างที่ 1)

หลังจากทดสอบประสิทธิภาพของระบบสิ่งประดิษฐ์แล้วว่าสามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะด้วยวิธี สปอตเพลทตามที่ได้ออกแบบระบบไว้ เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคแบบ *in vivo* จึงควรมีการยืนยันผลด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตซึ่งเป็นเทคนิคแบบ *in vitro* อีกด้วย วิธีเวสเทิร์นบลอตจะช่วยในการพิสูจน์ว่าการที่เซลล์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะเป็นเพราะเบต้า-แลคแทมเมสถูกส่งออกไปยังเพอริพลาซึมจริง ซึ่งแปลว่าองค์ประกอบต่างๆ นั้นถูกผลิตให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้และอยู่ในรูปที่ทำงานได้จริง ซึ่งมีลำดับขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงเซลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดทั้งสองบรรจุอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และกานามัยซิน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C อัตราการเขย่า 200 rpm เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะทำการลงเชื้อ *E. coli* (subculture) ใน 50 มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ใหม่ (โดยใส่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในอัตราส่วน 1:50) และใส่ยาปฏิชีวนะเช่นเดิม จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิ 37°C อัตราการเขย่า 200 rpm ประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งค่า OD₆₀₀ ที่วัดได้จะอยู่ในช่วง 0.4-0.5 (วัดในช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) หลังจากนั้นใส่ สารละลายอะราบิโนสเข้มข้น 0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเพื่อเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของพลาสมิด pDD18 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C อัตราการเขย่า 200 rpm เพื่อให้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ผลิตโปรตีนทั้งสามส่วนที่บรรจุอยู่ในพลาสมิด เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะใช้ทำการแยกส่วนของไซโตพลาสซึมและเพอริพลาซึมของแบคทีเรียออกจากกันเป็นสองส่วน โดยเริ่มจากการจะทำการปรับความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นให้เท่ากันคือ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.5 วิธีการคือวัด OD₆₀₀ ของเซลล์คัลเจอร์ของแต่ละตัวอย่างแล้วปั่นเหวี่ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ปริมาตรตั้งต้นที่เมื่อทำการละลายด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 5 mM MgSO₄ ในขั้นตอนหลังแล้วจะทำให้ได้ OD₆₀₀ = 75 สามารถคำนวณได้โดยใช้สมการดังนี้

โดยที่ OD₆₀₀ (x) หมายถึง ค่าของ $\frac{75}{OD_{600}(x)} \times 0.25 \text{ ml}$ ที่วัดได้เมื่อถึงเวลาเก็บเซลล์มาทำการสกัดแยกส่วน หลังจากนั้นจึงละลายเชื้อแบคทีเรียด้วย 1 มิลลิลิตร subcellular fractionation buffer (ประกอบด้วย 30

- mM Tris-HCl, 1 mM กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก (EDTA), 0.6 M ซูโครส) จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ลำดับต่อไปใส่ 250 ไมโครลิตร ของ 5 mM MgSO₄ (เป็นการปรับความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรียให้เป็น OD₆₀₀ = 75) และแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 16,000 rcf เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และเก็บส่วนใสด้านบนตะกอน (supernatant) เป็น**ส่วนของ**
- 5 **เพอร์พลาสซึม** และละลายตะกอนที่เหลือด้วย 250 µL phosphate buffered saline (PBS) และทำให้เซลล์แตกโดยการใช้คลื่นเสียงกระแทก (sonication) ซึ่งจะทำในน้ำแข็งเพื่อลดความร้อนที่เกิดจากการใช้คลื่นเสียงที่อาจทำลายโปรตีนได้ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 16,000 rcf เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และเก็บส่วนใสของรอบนี้เป็นส่วนของไซโตพลาสซึม และตะกอนที่เหลืออยู่ด้านล่างเปรียบได้กับส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble fraction) จากนั้นทำการแยกโปรตีนต่างๆ ที่มีอยู่ในส่วนของไซโตพลาสซึมและ
- 10 เพอร์พลาสซึมด้วยวิธี SDS/PAGE และจากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลเข้าสู่ส่วนรองรับชนิดแข็ง (polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes) โดยวิธีเวสเทิร์นบลอตตามมาตรฐาน หลังจากนั้นจะเป็นการตรวจสอบหาโปรตีนองค์ประกอบหลักทั้ง 3 ส่วน คือ 1) พิวชันโปรตีนจะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับเบต้า-แลคแทมเมส (mouse anti-Bla 1:150; Abcam) เป็นตัวตรวจสอบซึ่งขนาดที่ถูกต้องควรจะเป็น 58.5 kDa, 2) โปรติเอสอินฮิบิเตอร์จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ FLAG-tag (mouse anti-FLAG M2-HRP 1:3,000; Sigma-Aldrich)
- 15 เป็นตัวตรวจสอบซึ่งขนาดที่ถูกต้องควรจะเป็น 27.6 kDa และ 3) ถ้าต้องการตรวจสอบเอนไซม์โปรติเอสของไวรัสเอชไอวี-1 จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ His-tag (anti-6X His tag® antibody (HRP) ab1187 1:5000; Abcam) ซึ่งขนาดที่ถูกต้องของเอนไซม์คือ 12.17 kDa

- ผลการทดลองขั้นที่ 2 รายงานได้ดังต่อไปนี้ 1) จากรูปที่ 6a ย้ำชัดให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ 30°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผลิตโปรตีนมากกว่า 37°C และยังแสดงให้เห็นว่าระบบสังเคราะห์โปรตีนสามารถผลิตและ
- 20 ส่งออกพิวชันโปรตีนได้จริงที่แสดงในเลนของ WT สับสเตรท และ KP สับสเตรท (ชุดควบคุมเชิงบวก) เพราะสามารถตรวจสอบพิวชันโปรตีนได้ทั้งส่วนของไซโตพลาสซึมและเพอร์พลาสซึม ซึ่งตรงข้ามกับเลนที่ 1-2 ที่แสดงผลของชุดควบคุมเชิงลบ เพราะผลการทดลองดังกล่าว สามารถตรวจพบพิวชันโปรตีนแค่ในส่วนของไซโตพลาสซึมเท่านั้น ซึ่งเน้นย้ำผลที่ว่า GLF scFv ไม่มีความสามารถในการปกป้องคลิเวจไซต์ และ scFvp17 มีความสามารถในการปกป้องคลิเวจไซต์ของพิวชันโปรตีนได้จริง 2) โปรติเอสอินฮิบิเตอร์จะใช้แอนติบอดีที่
- 25 จำเพาะกับ FLAG-tag (mouse anti-FLAG M2-HRP 1:3,000; Sigma-Aldrich) เป็นตัวตรวจสอบซึ่งขนาดที่ถูกต้องควรจะเป็น 27.6 kDa แสดงในรูปที่ 6b ซึ่งขนาดแถบ (band) ที่พบใกล้เคียงกับสิ่งที่คาดหวังแสดงว่าเป็นแถบของ scFvp17 จริง อย่างไรก็ตาม ในสิ่งที่คาดหวังไว้นั้นคือจะพบ scFvp17 ทั้งส่วนของไซโตพลาสซึมและเพอร์พลาสซึมเช่นเดียวกับพิวชันโปรตีน แต่จากรูปพบแค่ในไซโตพลาสซึมเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นผลจาก scFvp17 สามารถทำงานได้จริงแต่การจับกับพิวชันโปรตีนอาจไม่แข็งแรงเท่าที่ควร ดังนั้นขณะทำการส่งออก
- 30 ไปยังเพอร์พลาสซึมทำให้ scFvp17 หลุดออกจากพิวชันโปรตีนและยังคงอยู่ในไซโตพลาสซึมเพื่อปกป้องพิวชันโปรตีนตัวอื่นๆ ต่อไป หรือในอีกเหตุผลคือ scFvp17 ที่จับได้ไม่แข็งแรงนั้นอาจถูกส่งออกเช่นกันแต่ส่งออกได้ในปริมาณที่น้อยเกินกว่าปริมาณขั้นต่ำที่เทคนิคเวสเทิร์นบลอตจะสามารถตรวจจับได้ และลำดับที่ 3) ซึ่งเป็น

ลำดับสุดท้าย คือแอนติบอดีของไวรัสเอชไอวี-1 จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ His-tag (anti-6X His tag® antibody (HRP) ab1187 1:5000; Abcam) ซึ่งขนาดที่ถูกต้องของแอนติบอดีที่กล่าวมาข้างต้นคือ 12.17 kDa (ไม่มีรูปประกอบผลการทดลอง)

ขั้นที่ 3 การคัดเลือกโปรตีนอินฮิบิเตอร์จากไลบรารีโดยวิธีการตรวจคัดกรองไลบรารี

- 5 การประดิษฐ์นี้ไม่มีการจำกัดชนิดของไลบรารีที่เลือกใช้ อาจมาจาก naïve library เมื่อไม่มีโปรตีนอินฮิบิเตอร์ที่จำเพาะกับตัวสับสเตรตที่ต้องการอยู่แล้ว หรืออาจเป็นไลบรารีของ mutant ที่มาจากการปรับเปลี่ยนโปรตีนอินฮิบิเตอร์ต้นแบบที่จำเพาะกับตัวสับสเตรตที่ต้องการอยู่แล้ว แต่จะครอบคลุมถึงการคัดเลือกโปรตีนอินฮิบิเตอร์ที่ต้องการด้วยการทำการคัดเลือกในรูปแบบของไลบรารีโดยการโคลนไลบรารีลงในตำแหน่งของโปรตีนอินฮิบิเตอร์ ในขั้นต้นนั้น การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโปรตีนอินฮิบิเตอร์แต่ละตัวที่ถูกคัดเลือกมาจากไลบรารีสามารถทำได้โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกอยู่ ทำให้สามารถคัดเลือกโปรตีนอินฮิบิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้ในขั้นต้นจำนวนหนึ่ง แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีทาง *in vitro* เช่น เวสเทิร์นบลอต ELISA หรือ Surface Plasmon Resonance (SPR) ต่อไป
- 10

- ในตัวอย่างนี้คือการสร้างไลบรารีของโปรตีนอินฮิบิเตอร์ในระบบของการประดิษฐ์ข้างต้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error-Prone PCR (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit: Agilent technologies) โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเวกเตอร์ที่บรรจุโปรตีนอินฮิบิเตอร์เป็น 4 นาโนกรัม หลังจากนั้นนำส่งพลาสมิดหรือเวกเตอร์ของไลบรารีดังกล่าวเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ NEB® 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) (ต้องทำการการคำนวณขนาดของไลบรารีเพื่อให้ครอบคลุมพลาสมิดของไลบรารีทั้งหมด) จึงเตรียม *E. coli* สายพันธุ์ NEB® 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร และทำการนำส่งพลาสมิดจากไลบรารีโดยต้องทำการขจัดเกล็ดออกจากตัวอย่างไลบรารีโดยการหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่มีรูพรุนขนาด 0.025 ไมโครเมตร จากนั้นจึงทำการนำส่งพลาสมิดจากไลบรารี 5 ไมโครลิตร/50 ไมโครลิตร electro competent *E. coli* โดยใช้กระแสไฟฟ้าและใช้อาหาร SOC ในการเลี้ยงและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการสเปรดเพลท (spread plate) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเจือจางตัวอย่างจากไลบรารีให้อยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6}
- 20 และใช้จานอาหารที่บรรจุยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล เพื่อใช้ระบุและประมาณขนาดของไลบรารี ส่วนของไลบรารีที่เหลือให้เติม LB ให้ครบ 100 มิลลิลิตรและเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลให้ได้ความเข้มข้นตามอัตราส่วนและนำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน เช้าวันรุ่งขึ้นเก็บเชื้อเพื่อทำ freezer stock (1:1 30% glycerol) นอกจากนั้นต้องนับจำนวนโคโลนีบนเพลทและประมาณหาขนาดของไลบรารีดังสูตรต่อไปนี้
- 25

$$\text{ขนาดไลบรารี} = \frac{\text{ปริมาตรเชื้อทั้งหมด (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรเชื้อที่ใช้ spread plate (มิลลิลิตร)}} \times \text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ} \\ \times \frac{1}{\text{สัดส่วนการเจือจาง}}$$

ตัวอย่างเช่น ถ้านับโคโลนีบนจานอาหารได้ 100 โคโลนี ปริมาตรที่ใช้สเปรดเพลท คือ 100 ไมโครลิตร สัดส่วนการเจือจาง คือ 10^{-5} จากปริมาตรเชื้อทั้งหมด 1 มิลลิลิตร

$$\text{ขนาดไลบรารี} = \frac{1 \text{ มิลลิลิตร}}{0.1 \text{ มิลลิลิตร}} \times 100 \times \frac{1}{10^{-5}} = 10^8 \text{ สมาชิกในไลบรารี (library members)}$$

- 5 จากนั้นจะทำการสกัดพลาสมิดซึ่งต้องคำนึงถึงความครอบคลุมขนาดของไลบรารีที่สร้างขึ้นด้วย โดยใช้หลักการที่ว่า $OD_{600} = 1$ ของเชื้อ 1 มิลลิลิตร จะมีเชื้ออยู่ 10^9 cfu/ml เพราะฉะนั้นตัวเลขนี้ครอบคลุมขนาดของไลบรารี จึงทำการสกัดพลาสมิดให้ครอบคลุมขนาดของไลบรารีดังที่กล่าวไว้ จากนั้นนำส่งพลาสมิดของไลบรารีเหล่านั้นเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ MC4100 ที่มีพลาสมิด pdd322 TatABC บรรจุอยู่ด้วยวิธีทางไฟฟ้า และทำการสเปรดเพลทที่การเจือจางเดียวกับการสเปรดเพลทข้างต้น บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ
- 10 คลอแรมเฟนิคอลและกานามัยซิน เชื้อที่เหลือจากการสเปรดเพลทจะใส่ LB ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลและกานามัยซินให้ได้ความเข้มข้นตามอัตราส่วนและนำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน วันรุ่งขึ้นเก็บเชื้อเพื่อทำ freezer stock (1:1 30% glycerol) นอกจากนั้นจึงนับจำนวนโคโลนีบนเพลทและประมาณหาขนาดของไลบรารีดังสูตรข้างต้น

- 15 จากนั้นจะทำการคัดเลือก E. coli ที่บรรจุพลาสมิดไลบรารีการกลายพันธุ์ของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ ด้วยกระบวนการสเปรดเพลทโดยทำการเจือจางตัวอย่างให้อยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-3} และความเข้มข้นของคาร์เบนิซิลลินที่ 200-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของตัวอย่างและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะเป็นผลมาจากการทดลองสเปรดเพลทก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าไบซิทรอนิกเวกเตอร์ (WT) สามารถโตได้ที่ 10^{-2} ที่ความเข้มข้นของยา 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น ดังนั้นข้อกำหนดข้างต้นจะสามารถใช้คัดเลือกพลาสมิดที่กลายพันธุ์แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ไวซ์ต์มากกว่า WT จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C
- 20 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สุดท้ายจะคัดเลือกโคโลนีที่สามารถโตบนจานอาหารที่มียาคาร์เบนิซิลลินที่เวลา 48 ชั่วโมง ไปใช้ในการทดสอบหาประสิทธิภาพของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ด้วยวิธีทาง *in vitro* เช่น ELISA, western blot และ SPR ต่อไป

ตัวอย่างที่ 1 การทดสอบความแตกต่างของชุดควบคุมเชิงลบและชุดควบคุมเชิงบวกกับระบบไตรซิทรอนิกและไบซิทรอนิก

- 25 ตัวอย่างนี้เป็นการนำระบบมาใช้งานโดยมีการทดสอบว่าเมื่อองค์ประกอบทั้งสามมีการผลิตมาจากพลาสมิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน จะส่งผลให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการแสดงออกที่แตกต่างกันหรือไม่

อย่างไร ในการประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ออกแบบ, ตัดต่อและนำส่งโปรตีนทั้ง 3 ส่วนใน 2 รูปแบบด้วยกัน คือ รูปแบบที่ 1 เรียกว่า Tricistronic version ซึ่งรูปแบบนี้โปรตีนทั้ง 3 ส่วนจะบรรจุอยู่ในพลาสมิดที่ชื่อว่า pDD18 โดยแสดงออกร่วมกันกับพลาสมิด pDD322 ที่บรรจุโปรตีน TatA, TatB และ TatC ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขนส่งของแทพพาร์เย แต่ในการทดลองโปรตีนของเอชไอวี-1 มีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่ทำให้ใช้เวลาในการพับม้วนเพื่อทำงาน อาจทำให้โปรตีนอีก 2 ส่วนถูกผลิตและทำงานก่อนที่ โปรตีนของเอชไอวี-1 จะทำงาน เนื่องจากทั้ง 3 ส่วนถูกผลิตพร้อมกัน ผู้ประดิษฐ์จึงออกแบบรูปแบบที่ 2 เรียกว่า Bicistronic version โดยรูปแบบนี้โปรตีนส่วนที่ (1) และ (2) เท่านั้นที่อยู่ใน พลาสมิด pDD18 ส่วนโปรตีนส่วนที่ (3) จะบรรจุอยู่ในพลาสมิด pDD322 แทน ซึ่งคาดว่าจะได้ผลดีกว่า เพราะถูกผลิตและทำงานได้พร้อมกับโปรตีนอีก 2 ส่วนได้ทันที ในการประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ใช้พลาสมิด 2 ประเภทที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในการออกแบบและตัดต่อ แต่ในการประดิษฐ์หรืองานวิจัยอื่นสามารถใช้พลาสมิดหรือตัวนำส่งยีนประเภทอื่นได้เช่นกัน

ตัวอย่างที่ 1.1 การออกแบบและสร้างชุดควบคุมเชิงบวก

เริ่มต้นจากชุดออกแบบเชิงบวกซึ่งทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตัวบนโปรตีน p17 จาก YP เป็น KP (Y = ไทโรซีน, K = โลซีน, P = โพรลีน) ด้วยวิธี Round The Horn เนื่องด้วยเมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนตัวดังกล่าวแล้วจะทำให้เอนไซม์โปรตีนเอสไม่สามารถจับหรือจับได้แบบอ่อนกับโปรตีนเป้าหมาย (Tritsch, R., Cheng, Y., Yin, F. and Erickson-Viitanen, S., 1991) ซึ่งเหตุการณ์นี้สามารถใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวกได้ เนื่องจากเอนไซม์โปรตีนเอสไม่สามารถจับและตัดโปรตีนเป้าหมายได้ ฉะนั้นฟิวชั่นโปรตีนจะไม่ถูกตัดและสามารถถูกส่งออกไปยังเพอริพลาซึมได้ ดังนั้น *E. coli* ที่ถูกบรรจุด้วยพลาสมิดของชุดควบคุมเชิงบวกจึงสามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะได้

ตัวอย่างที่ 1.2 การออกแบบและสร้างชุดควบคุมเชิงลบ

ในส่วนของชุดทดสอบเชิงลบทางผู้ประดิษฐ์ได้ใช้วิธีเปลี่ยนโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์จาก scFv p17 เป็น scFv-GLF แทนเนื่องจากโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ตัวใหม่ไม่มีความสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมาย หรือยังสามารถใช้โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ตัวอื่นที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องหรือมีความสัมพันธ์กับสับสเตรตของเอชไอวี-1 ซึ่งหมายถึงไม่สามารถจับหรือปกป้องโปรตีนเป้าหมายได้ เพราะฉะนั้นในกรณีนี้โปรตีนเป้าหมายจะถูกตัดออกเป็นสองส่วนโดยเอนไซม์โปรตีนเอสได้อย่างแน่นอน

หลังจากนั้นจึงนำระบบมาทำการเปรียบเทียบชุดควบคุมทั้งเชิงบวก เชิงลบ และระบบที่สนใจทั้งในระบบไทรซิสทรอนิกและไบซิสทรอนิก อันเนื่องมาจากการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนซิลลินบรรจุอยู่ โดยอัตราการเจริญในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกันออกไป ซึ่งความคาดหวังที่เกิดขึ้นคือ ชุดการทดลองเชิงลบจะต้องไม่สามารถเจริญได้ในจานอาหารที่บรรจุด้วยคาร์เบนซิลลิน เพราะโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ของชุดควบคุมเชิงลบ (อินทราเซลล์ลาร์แอนติบอดีที่จับกับ transcription factor จากยีสต์ หรือ anti-GCN4 scFv ที่มีชื่อเรียกอย่างย่อว่า GLF) ไม่มีความสามารถในการปกป้องคลีเวจ

ไซต์ของฟิวชั่นโปรตีน เมื่อไม่สามารถปกป้องได้ฟิวชั่นโปรตีนจะถูกตัดโดยเอนไซม์โปรติเอสและส่วนที่ถูก
 ส่งออกไปยังเพอริพลาซซิมจึงมีแค่ ssTorA::p17 เท่านั้น โดยส่วนของ p24::Bla ยังคงอยู่ในไซโตพลาซซิมจึง
 ทำให้ชุดการทดลองดังกล่าวไม่มีเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (Bla) ในเพอริพลาซซิมจึงไม่สามารถทนยา
 ปฏิชีวนะได้ ดังนั้น ชุดการทดลองนี้จึงไม่ควรเจริญได้บนจานอาหารที่มีคาร์เบนซิลลิน อย่างไรก็ดี จากรูปที่ 7
 5 (เลนที่ 1) จะเห็นว่าชุดการทดลองดังกล่าวสามารถเจริญบนจานอาหารได้บ้างเมื่อมีการหดยเซลล์จำนวนมาก
 หรือที่มีการเจือจางน้อยๆ (dilution) เช่น ที่ 10^{-1} หรือ 10^{-2} เท่า ลงในจุดนั้น เป็นเพราะเมื่อแบคทีเรีย *E. coli*
 เกิดการตายและทับถมกันจำนวนมาก ทำให้แบคทีเรียบางส่วนสามารถเจริญบนเศษซากของแบคทีเรียที่ตาย
 ในช่วงต้นและปลดปล่อยเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมสที่ถูกผลิตออกมาจากไซโตพลาซซิมและทำให้แบคทีเรีย
 ดังกล่าวคล้ายกับสามารถย่อยยาปฏิชีวนะและเจริญได้ ในขณะที่เมื่อมีการหดยเซลล์จำนวนน้อยหรือที่มีการ
 10 เจือจางมากๆ เช่น ที่ 10^{-5} หรือ 10^{-6} เท่า ลงในจุดนั้น เซลล์จะไม่สามารถเจริญได้เพราะปริมาณเอนไซม์เบต้า-
 แลคแทมเมสจากเซลล์ที่ตายนั้นมีไม่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์ทนยาปฏิชีวนะได้ และในเลนที่ 2 คือชุดการ
 ทดลองที่เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ในชุดการทดลองนี้เซลล์ควรจะสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีคาร์เบนซิลลิน
 เพราะชุดการทดลองนี้ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนที่บริเวณคลีเวจไซต์บนสับสเตรทที่เป็น
 ส่วนหนึ่งของฟิวชั่นโปรตีนจาก YP เป็น KP ซึ่งมีรายงานในปี 1991 ว่าเมื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนดังกล่าว
 15 แล้วจะทำให้เอนไซม์โปรติเอสไม่สามารถจับกับฟิวชั่นโปรตีนหรือจับได้อย่างอ่อนมากทำให้ฟิวชั่นโปรตีนไม่
 สามารถถูกตัดโดยเอนไซม์โปรติเอส HIV-1 แต่ก็อาจมีบางส่วนที่ยังสามารถจับได้อย่างอ่อนจึงมีบางส่วนของ
 ฟิวชั่นโปรตีนถูกตัดได้บ้าง (Tritch, R., Cheng, Y., Yin, F. and Erickson-Viitanen, S., 1991) ซึ่งก็เป็นไป
 ตามผลการทดลองในรูปที่ 7 ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถเจริญได้บนจานอาหารแต่ก็ยังเจริญได้น้อยกว่า
 ระบบไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (WT) และ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (WT) ในเลนที่ 3-4 โดยจากผลการทดลองนี้
 20 แสดงให้เห็นว่าโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ (scFvp17) มีความสามารถหรือมีประสิทธิภาพในการปกป้องคลีเวจไซต์
 บนฟิวชั่นโปรตีนสูงกว่าตัวอย่างที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของคลีเวจไซต์จาก YP เป็น KP ดังเลนที่ 2 ที่ได้
 กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่จากการทดลองในเลนที่ 3 และ 4 จะเห็นว่าแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวกเตอร์แบบไตรซิส
 ทรอนิกในเลนที่ 3 สามารถเจริญบนจานอาหารได้มากกว่าแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวกเตอร์แบบไบซิสทรอนิก ใน
 เลนที่ 4 ซึ่งเป็นเพราะเวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกทั้ง 3 องค์ประกอบสำคัญถูกบรรจุอยู่ในพลาสมิด pDD18
 25 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีจำนวนชุดของพลาสมิด (copy number) สูงกว่าพลาสมิด pDD322 จึงทำให้สามารถผลิต
 องค์ประกอบทั้ง 3 ออกมาได้ปริมาณมากและจากเหตุผลดังกล่าวนี้ทำให้เห็นถึงข้อบกพร่องของระบบที่มี
 เวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกนี้ในระบบที่ใช้เอชไอวี-1 เป็นตัวอย่าง เพราะเมื่อฟิวชั่นโปรตีนที่ใช้เป็นตัวรายงาน
 ผลถูกผลิตออกมามาก และถูกส่งออกไปมากเช่นเดียวกัน ทำให้จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในความเข้มข้นที่สูง
 จึงจะเห็นความแตกต่างของปริมาณของฟิวชั่นโปรตีนที่ถูกส่งออกไปสู่เพอริพลาซซิม ซึ่งก็เป็นตัวแสดงถึง
 30 ประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของโปรติเอสโดยโปรติเอสอินฮิบิเตอร์ที่ถูกแสดงออกด้วยนั่นเอง เหตุผลนี้จึง
 เชื่อได้ว่าระบบที่มีเวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการปกป้องได้อย่าง
 ชัดเจน เมื่อมีการใช้โปรติเอสอินฮิบิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพดีแล้ว แต่ถ้ามีการนำเทคนิค PROTECT ไปใช้กับ

การคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร หรือคัดเลือกจาก naïve library ก็อาจจำเป็นต้องใช้ระบบที่มีเวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกที่สามารถผลิตโปรตีนได้เป็นจำนวนมากซึ่งเปรียบเสมือนเป็นการเพิ่มสัญญาณที่แสดงถึงประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่ถูกแสดงออกด้วย ทำให้สามารถสังเกตผลของระบบได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ เมื่อโปรตีนถูกผลิตเป็นจำนวนมากและโปรตีนทุกองค์ประกอบถูกกระตุ้นให้เกิดการผลิตพร้อมกัน อาจส่งผลให้เอนไซม์โปรตีนเอส HIV-1 ไม่สามารถตัดพิวซ์โปรตีนได้ทั้งหมดได้ทันทั่วทั้งที่ จึงทำให้เกิดการหลุดรอดของพิวซ์โปรตีนบางส่วนที่ถูกผลิตออกมาแต่ไม่ได้รับการปกป้องด้วยโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์แต่ถูกส่งออกยังเพอริพลาซมโดยแทพพาสเวย์ไปเสียก่อน ส่งผลให้เกิดการเจริญของเซลล์ที่เป็นพื้นหลัง (background growth) เมื่อมีการหยดจำนวนเซลล์จำนวนมากๆ ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ทางผู้ประดิษฐ์จึงมีการประดิษฐ์ระบบ PROTECT ในอีกรูปแบบหนึ่งคือ ระบบที่มีเวกเตอร์แบบไบซิสทรอนิก ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนเอสได้ตลอดเวลา จึงทำให้เมื่อเซลล์ถูกนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมีการเติมอะราบินอสเพื่อกระตุ้นโปรโมเตอร์ AraBAD ที่ควบคุมการผลิตโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์และพิวซ์โปรตีนนั้น โปรตีนเอสที่ถูกผลิตอยู่ก่อนแล้วภายในไซโตพลาซม จึงสามารถทำการตัดพิวซ์โปรตีนที่ไม่ถูกปกป้องด้วยโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ได้ทันทั่วทั้งที่ ทำให้ลดการเกิดการเจริญของเซลล์ที่เป็นพื้นหลังลงได้ ดังนั้นระบบที่มีเวกเตอร์แบบไบซิสทรอนิกนี้จึงสามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการปกป้องของ scFvp17 WT ได้มากกว่า อันจะสังเกตได้จากระบบไบซิสทรอนิกนี้สามารถเจริญบนจานอาหารได้น้อยกว่าระบบไตรซิสทรอนิกแต่สามารถให้ความถูกต้องได้มากกว่า และเลนที่ 5 ในรูปที่ 7 แสดงการเจริญของชุดควบคุมเชิงลบของระบบไบซิสทรอนิกซึ่งมีเหตุผลในการเจริญได้เหมือนกับเลนที่ 1 นั่นเอง ในรูปที่ 7d-7e แสดงความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ในจานอาหารที่บรรจุด้วยคาร์เบนนิซิลลินในรูปแบบของกราฟ เพื่อให้เข้าใจผลการทดลองสเปกโทรสโกปี ในรูปที่ 7 ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งกราฟแสดงผลการทดลองในรูปที่ 7c เนื่องจากที่ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอะราบินอสเป็นผลการทดลองที่สามารถเห็นความต่างของแต่ละระบบได้ดีที่สุด โดยแกน x แสดงการเจือจางของแบคทีเรีย *E. coli* ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} เท่า (OD600 ตั้งต้นของทุกตัวอย่างเท่ากับ 2.5) และแกน y แสดงถึงความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ (คาร์เบนนิซิลลิน) นอกจากนั้นจากการทดลองยังสามารถแสดงความเข้มข้นของตัวกระตุ้นที่เหมาะสมของระบบซึ่งตรวจสอบที่ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, 0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอะราบินอส โดยผลการทดลองระบุได้ว่าในทุกความเข้มข้นของอะราบินอสช่วยกระตุ้นให้เกิดการผลิตและทำงานขององค์ประกอบทั้ง 3 ในระบบแต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอะราบินอสโดยที่ความเข้มข้นนี้ระบบสามารถผลิตและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

โดยสรุปแล้ว การประดิษฐ์นี้ทำการคัดเลือกภายในเซลล์ (in vivo) ดังนั้นจึงควรมีผลที่แสดงออกคล้ายคลึงกับเมื่อโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ไปรักษาโรคในเซลล์มนุษย์ ได้ใกล้เคียงกว่าระบบที่ทำการคัดเลือกแบบภายนอกเซลล์ (in vitro) นอกจากนี้ การเลือกใช้เบต้า-แลคแทมเมสเป็นรีพอร์ทเตอร์โปรตีน คือใช้ความสามารถในการทนยาปฏิชีวนะของเซลล์มาคัดเลือก เซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกจะมีชีวิตอยู่ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ผ่านการคัดเลือกก็จะตายไป ทำให้ระบบเป็นการคัดเลือกแบบเซเลกชัน จึงสามารถทำการคัดเลือกได้คราว

ละมากๆ ได้ นอกจากนี้ ระบบมีการใส่สับสเตรทไประหว่างเปปไทด์ส่งสัญญาณและรีพอร์ตเตอร์โปรตีนซึ่งแต่ละตัวมีความเป็นอิสระต่อกัน เพราะจะสามารถพับม้วนเป็นรูปร่างของแต่ละองค์ประกอบเองได้ ทำให้ระบบมีอิสระด้านขนาดของสับสเตรทมากขึ้น เมื่อเทียบกับการแทรกสับสเตรทไประหว่างลูปของรีพอร์ตเตอร์โปรตีน นอกจากนี้จากงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ไปก่อนหน้านี้พบว่า (1) เนื่องจากระบบใช้การขนส่งของโปรตีนในการคัดเลือก ทำให้ระบบคัดเลือกแต่การจับกันของโปรตีนที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูง เพื่อให้การจับกันต้องสามารถทนต่อขั้นตอนการขนส่งที่ต้องมีการผ่านเซลล์เมมเบรนของอีโคไลได้ด้วย ทำให้เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นระบบในการคัดเลือกลาย และ (2) ความสามารถในการละลายน้ำของ scFv หรือ affinity ของ scFv สามารถเพิ่มได้เมื่อทำการคัดเลือกที่มีการกดดันเซลล์มากขึ้น ในที่นี้คือการเพิ่มความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกล้วนเอง แปลว่าเราสามารถนำโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่มีอยู่ไปทำการพัฒนาประสิทธิภาพให้ดียิ่งขึ้นได้โดยง่าย นอกจากนี้ การประดิษฐ์นี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมได้ คือ สามารถนำระบบของงานประดิษฐ์นี้ไปใช้กับโรคอื่นๆ ได้ เพราะระบบนี้เปรียบเสมือนระบบต้นแบบที่ใช้ประโยชน์จากระบบการขนส่งโปรตีนในแบคทีเรียอีโคไลเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบหรือคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ ดังนั้นในทางอุตสาหกรรมจึงสามารถประยุกต์ระบบจากงานประดิษฐ์นี้ เพื่อใช้ในรูปแบบต่างๆ อาจเป็นการหาโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ของโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ HIV-1 เช่น โรคไวรัสตับอักเสบบี, โรคอัลไซเมอร์ หรือโรคอื่นๆ เป็นต้น เนื่องจากระบบนี้ถูกทดสอบในสิ่งมีชีวิต (แบคทีเรียอีโคไล/in vivo) นอกจากนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบได้อย่างแม่นยำแล้วยังสามารถใช้ศึกษาผลกระทบหรือผลการทดสอบอื่นๆ ที่สามารถเกิดขึ้นจริงในเซลล์สิ่งมีชีวิตอีกด้วย

การประยุกต์ทางอุตสาหกรรมของการประดิษฐ์นี้แบ่งได้เป็น 3 แบบคือ

1. สามารถประยุกต์ใช้ในรูปแบบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากในแต่ละครั้งได้ (high-throughput screening) ได้ เนื่องจากระบบนี้มีการนำระบบการคัดเลือกแบบเซลล์ชั้นโดยอาศัยเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมสมาใช้ นอกจากนี้ระบบนี้ทำการคัดเลือกภายในในสิ่งมีชีวิต (แบคทีเรีย *E. coli* / อินวีโว) ทำให้สามารถใช้เป็นเครื่องมือคัดเลือกได้อย่างแม่นยำแล้วยังสามารถศึกษาผลกระทบหรือผลการทดสอบอื่นๆ ที่สามารถเกิดขึ้นจริงในเซลล์สิ่งมีชีวิตอีกด้วย
2. โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่ต้องการคัดเลือก ไม่จำเป็นต้องเป็นชนิดที่จับบนสับสเตรทและปกป้องคลีเวจไซต์เท่านั้น สามารถนำมาใช้คัดเลือกชนิดที่จับกับโปรตีนเอสและยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอสได้ด้วยเช่นกัน
3. สามารถนำการประดิษฐ์นี้ไปประยุกต์ใช้กับการรักษาโรคอื่นๆ ได้ เพราะระบบนี้เปรียบเสมือนระบบต้นแบบ (platform) ที่ใช้ประโยชน์จากระบบการขนส่งโปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบสิ่งหนึ่งๆ ดังนั้นในทางอุตสาหกรรมสามารถประยุกต์ระบบในงานประดิษฐ์นี้ เพื่อใช้ในรูปแบบต่างๆ อาจเป็นการหาโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ของโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ HIV-1 เช่น โรคไวรัสตับอักเสบบี โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น

4. อาจนำไปใช้เพื่อคัดเลือกโปรตีนอินฮิบิเตอร์ได้ตามความต้องการในทางอุตสาหกรรมที่ไม่จำเป็นต้องอยู่ในรูปแบบของอินทราเซลล์แอนติบอดี เช่น เปปไทด์แอปตาเมอร์

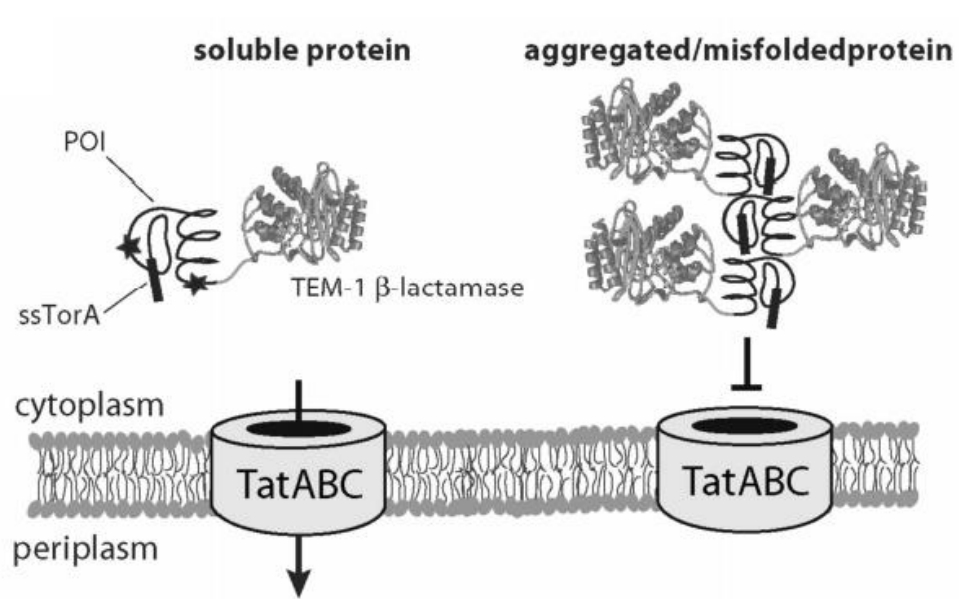
วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เหมือนกับที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

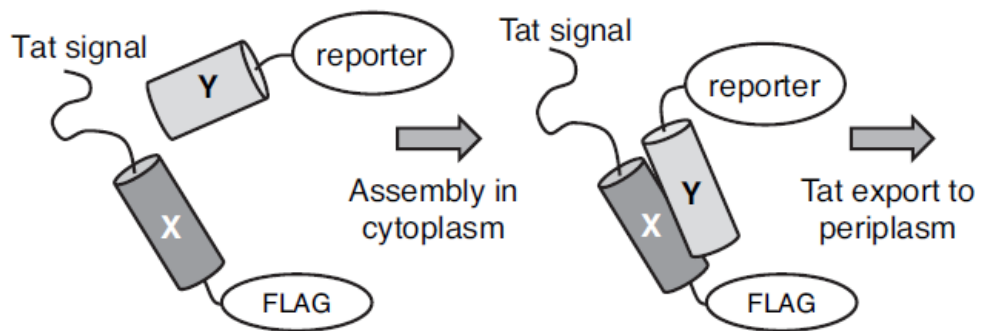
ข้อถกเถียง

1. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์ มีลักษณะเฉพาะ 3 ขั้นตอน คือ
 - 5 ก. การผลิตองค์ประกอบสำคัญของระบบในเซลล์เจ้าบ้านที่เลือกใช้ ซึ่งมี 3 องค์ประกอบหลักดังต่อไปนี้ (1) โปรตีนเอส, (2) โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ และ (3) สับสเตรทหรือฟิวชั่นโปรตีน ที่ประกอบไปด้วยเปปไทด์ส่งสัญญาณที่จำเพาะกับแททพาสเวย์, สับสเตรทของเอนไซม์โปรตีนเอสที่จำเป็นต้องมีบริเวณคลีเวจไซต์รวมอยู่ และโปรตีนบ่งชี้ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ (ssTat::protease substrate with cleavage site::Bla) ซึ่งทั้ง 3 องค์ประกอบหลักจะถูกผลิตภายในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน
 - 10 ข. การติดตามการเจริญของแบคทีเรียเจ้าบ้านที่อยู่ภายใต้ข้อกำหนดหรือแรงกดดันคือ ความสามารถทนยาปฏิชีวนะของเซลล์ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อสับสเตรทหรือฟิวชั่นโปรตีน ถูกปกป้องโดยโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ ทำให้สับสเตรทหรือฟิวชั่นโปรตีน ไม่ถูกตัดโดยโปรตีนเอส และเกิดการขนส่งของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ จากไซโตพลาสซึมไปยังเพอริพลาสซึม หรือในอีกนัยหนึ่งสามารถระบุได้ว่าฟิวชั่นโปรตีนไม่ถูกตัดโดยโปรตีนเอส เนื่องจากการทำงานของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ในการปกป้องโปรตีนโอไลติกคลีเวจไซต์
 - 15 ค. การระบุและคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปกป้องโปรตีนโอไลติกคลีเวจไซต์
2. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์ ตามข้อถกเถียงข้อที่ 1 ที่ซึ่ง ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ คือ ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเบต้าแลคแทมริงค์ (β -lactam ring)
- 20 3. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์ ตามข้อถกเถียงข้อที่ 1 หรือ 2 ที่ซึ่ง เซลล์เจ้าบ้าน คือ แบคทีเรีย *E. coli*
4. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์ ตามข้อถกเถียงข้อที่ 3 ที่ซึ่ง สายพันธุ์ของ *E. coli* ที่ใช้ คือ MC4100
5. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์ ตามข้อถกเถียงข้อที่ 1 ที่ซึ่ง เปปไทด์ส่งสัญญาณที่จำเพาะกับแททพาสเวย์ คือ ssTorA
- 25 6. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์ ตามข้อถกเถียงข้อที่ 5 ที่ซึ่ง เปปไทด์ส่งสัญญาณที่จำเพาะกับแททพาสเวย์ที่ใช้แทน ssTorA เลือกได้จาก CueO, DmsA, FdnG, FdoG, HyaA, NapA, Sufi, WcaM, YagT, YcbK, YcdB, YdhX, หรือ YnfE
- 30 7. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์ ตามข้อถกเถียงข้อที่ 1 ที่ซึ่ง โปรตีนบ่งชี้ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ คือ เอนไซม์เบต้าแลคแทมเนส (β -lactamase)
8. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขนส่งโปรตีนทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพาสเวย์ ตามข้อถกเถียงข้อที่ 7 ที่ซึ่ง โปรตีนบ่งชี้ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะที่ใช้แทนที่เอนไซม์

เบต้า-แลคแทมเมส เลือกได้จาก streptomycin phosphotransferase, neomycin phosphotransferase, hygromycin phosphotransferase, โปรตีนที่ผลิตโดยยีน aada, โปรตีนที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ ampicillin, โปรตีนที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ tetracycline, โปรตีนที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ chloramphenicol, alkaline phosphatase, β -galactosidase, β -glucuronidase หรือ chloramphenicol acetyl transferase



รูปที่ 1

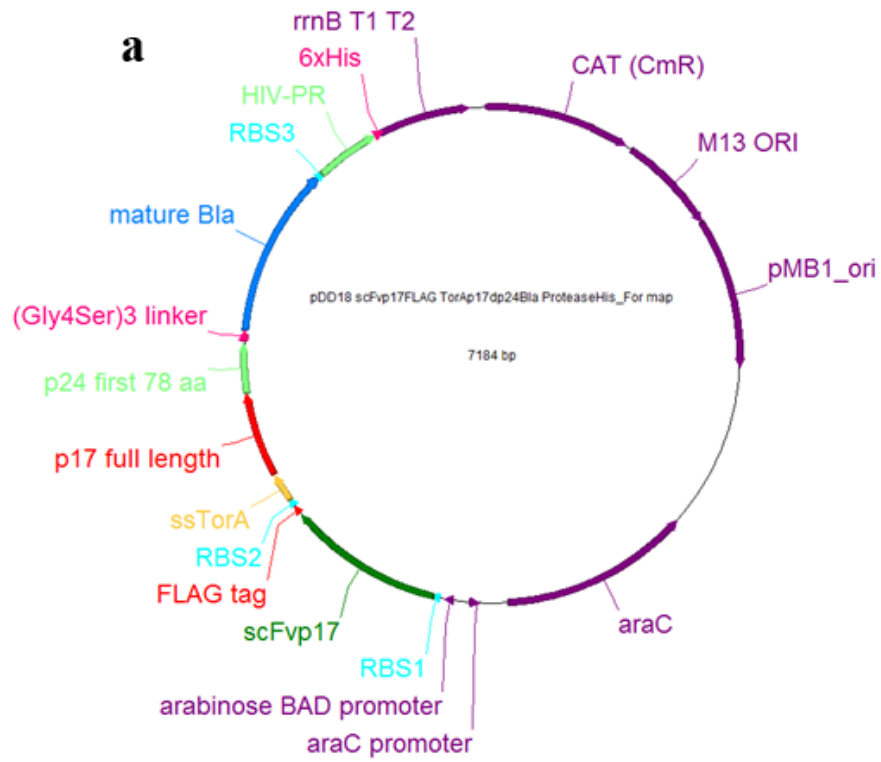


รูปที่ 2

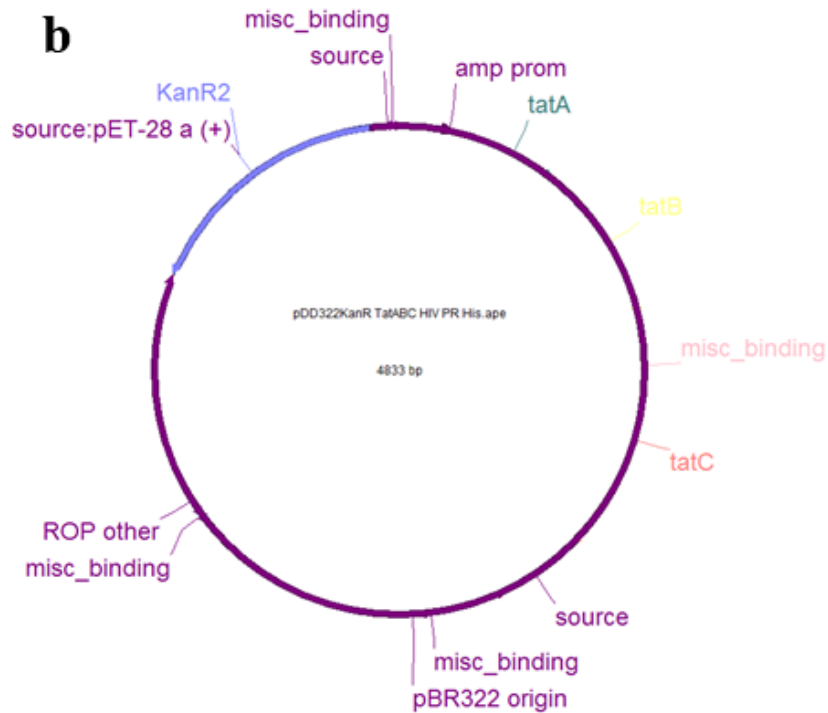
a Tat export of Bla to periplasm resulting in resistance to Carb

b No Tat export of Bla to periplasm hence No resistance to Carb

รูปที่ 3

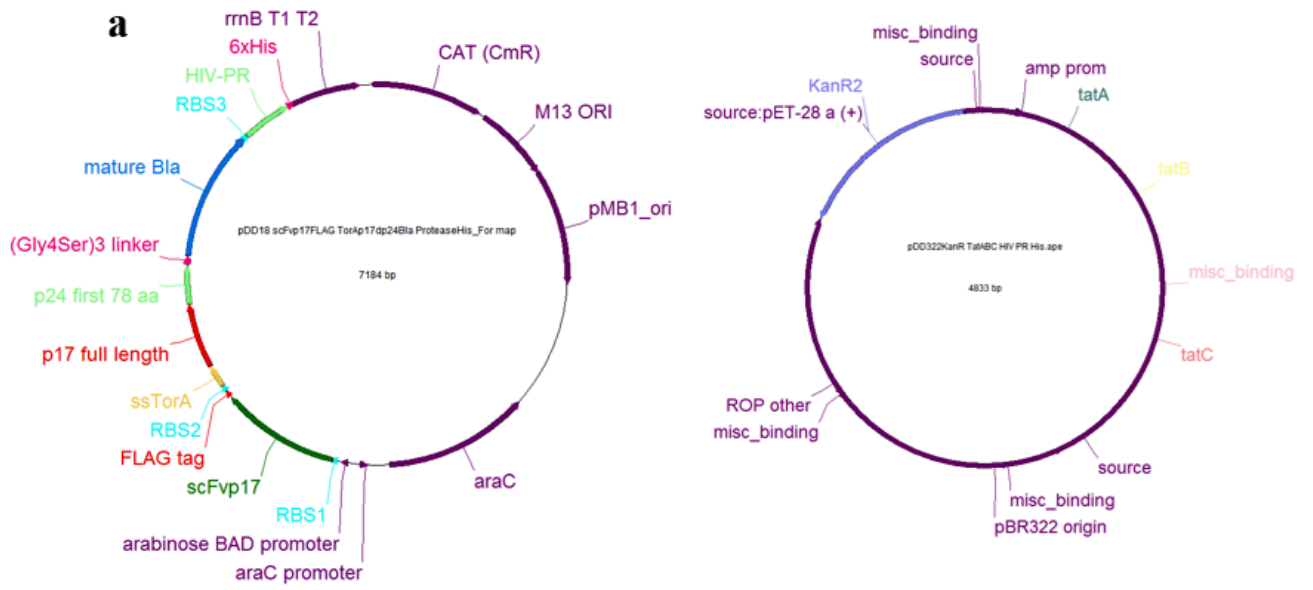


รูปที่ 4a

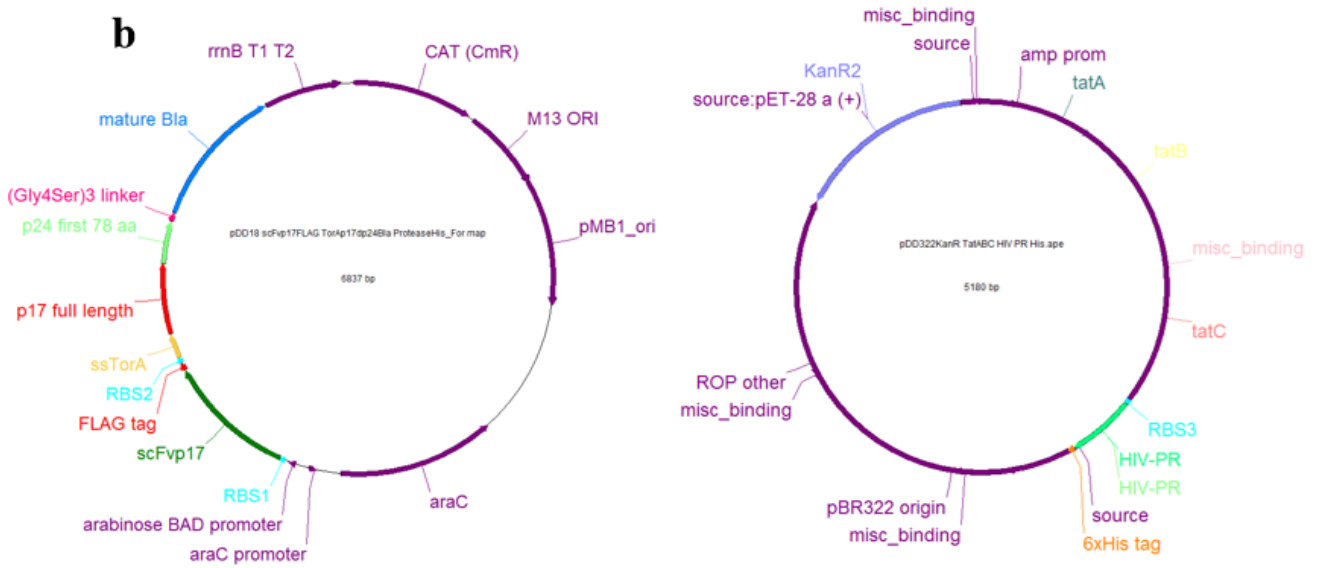


รูปที่ 4b

รูปที่ 4

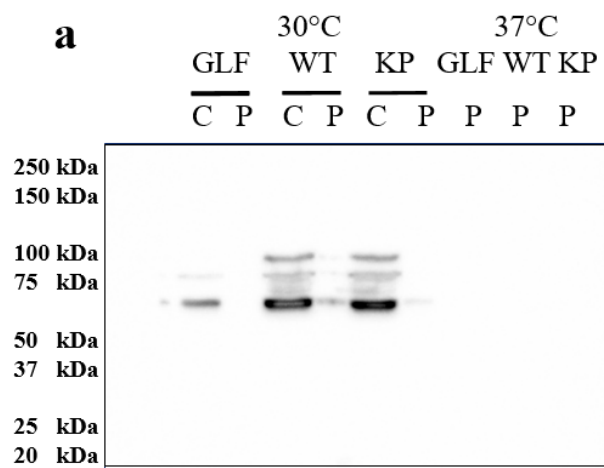


รูปที่ 5a

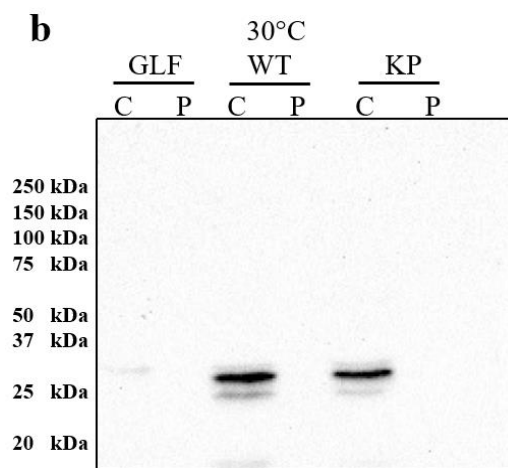


รูปที่ 5b

รูปที่ 5

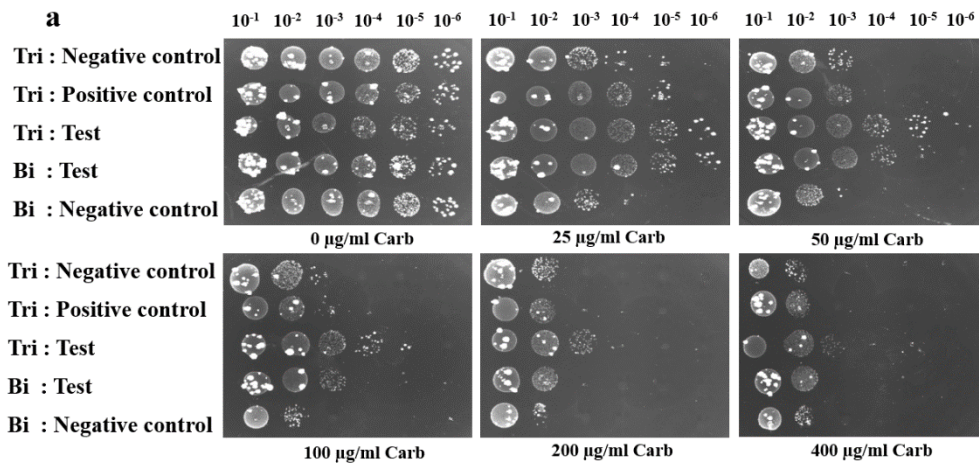


รูปที่ 6a

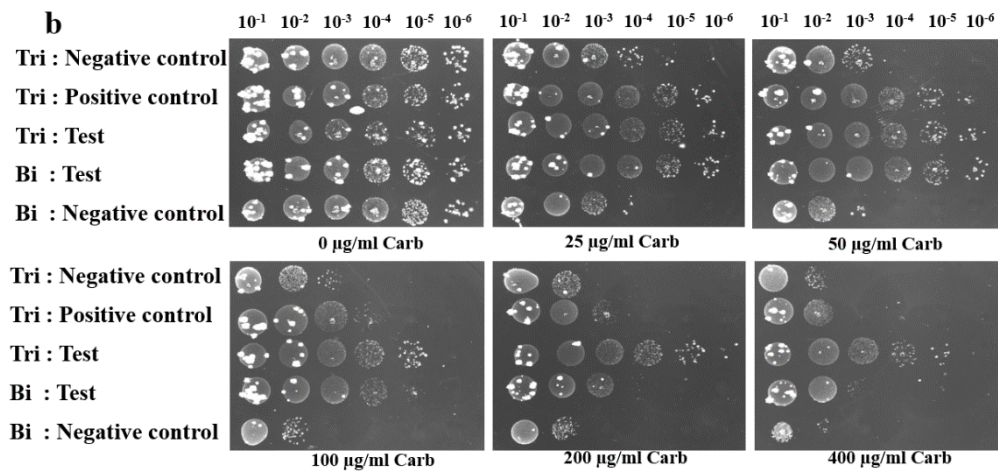


รูปที่ 6b

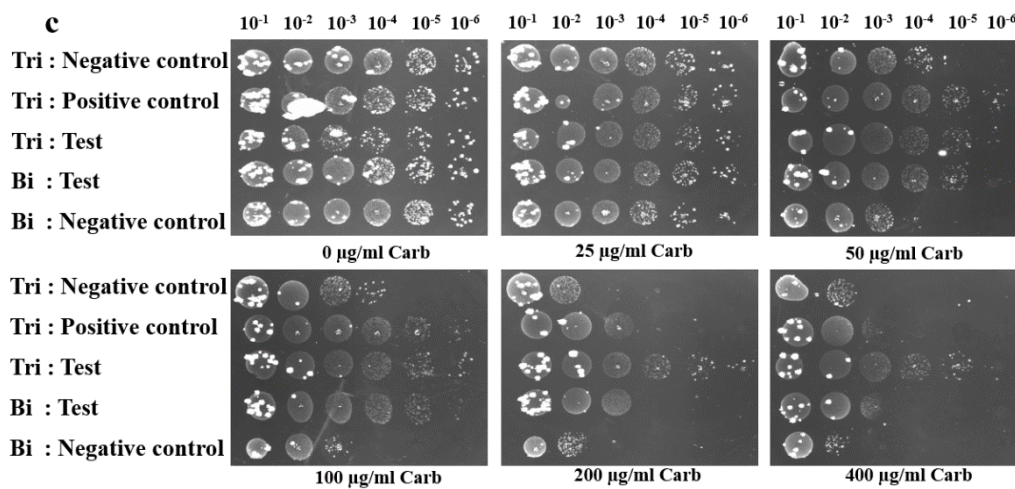
รูปที่ 6



รูปที่ 7a

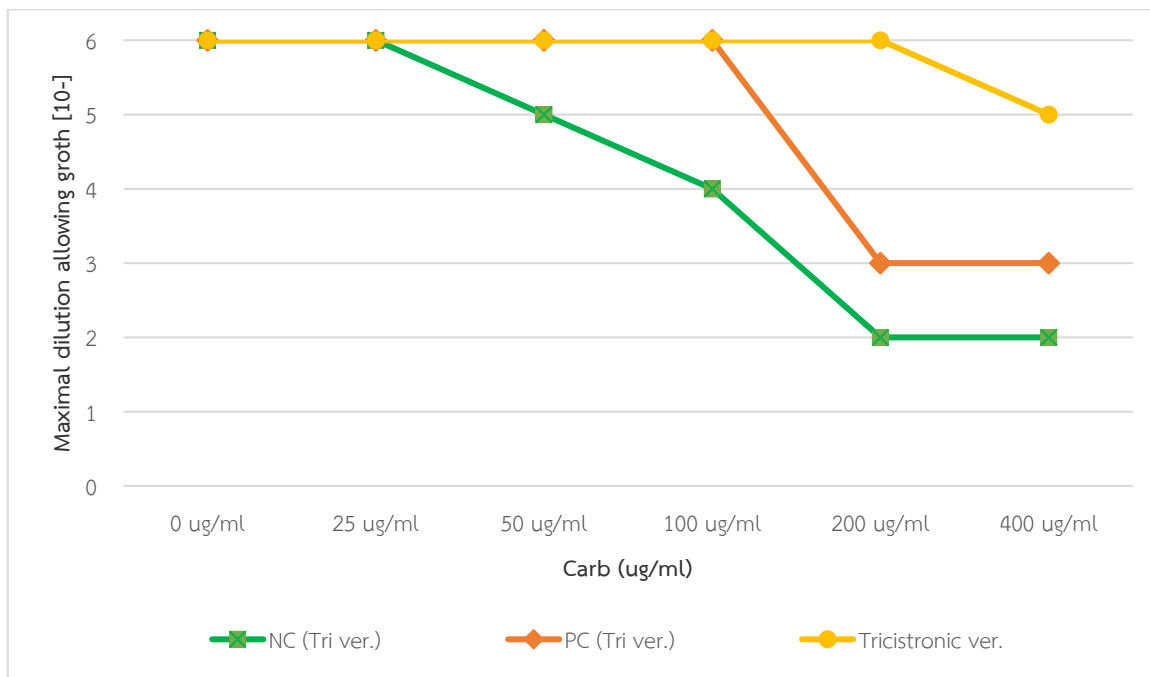


รูปที่ 7b

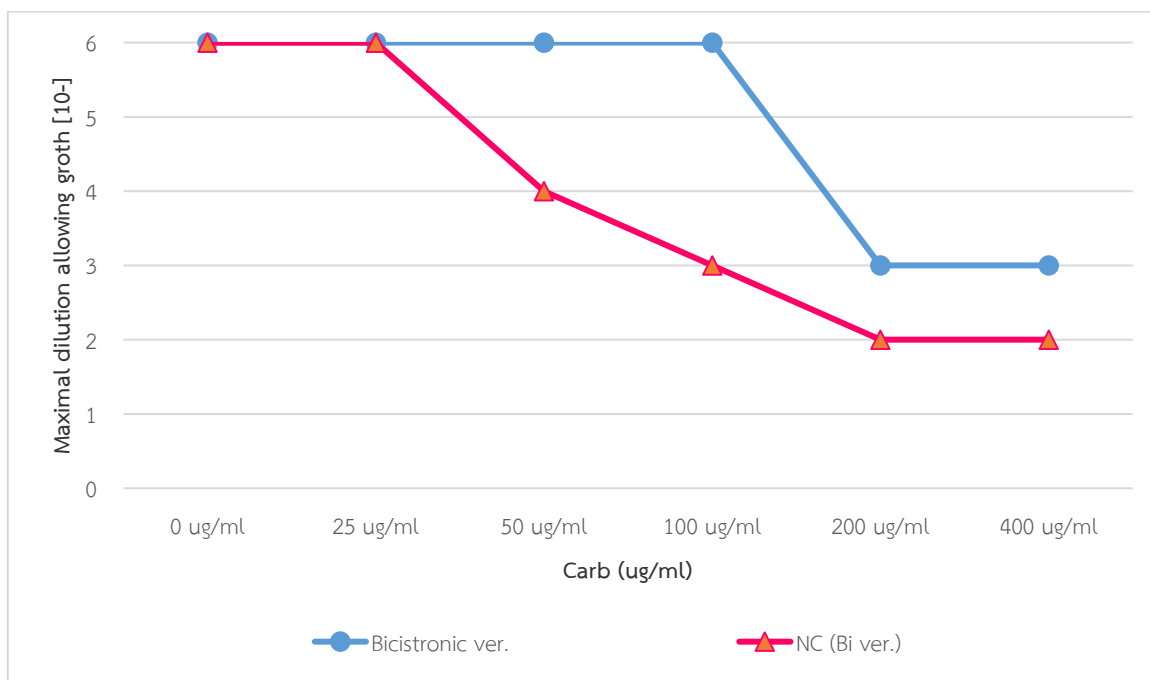


รูปที่ 7c

หน้า 7 ของจำนวน 7 หน้า



รูปที่ 7d



รูปที่ 7e

รูปที่ 7

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอการออกแบบระบบอันประกอบไปด้วยองค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้สำหรับคัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสที่เป็นสาเหตุของโรคบางชนิดหรือที่เป็นส่วนสำคัญต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยใช้การทดสอบแบบอินวิโวในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยองค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้นี้สามารถนำไปคัดเลือกและวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ได้ นำไปคัดเลือกและวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตัดของสับสเตรทที่ถูกทำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่างๆ โดยโปรตีนเอส หรือการตัดสับสเตรทต้นแบบโดยโปรตีนเอสที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ รวมถึงการนำไปใช้ในการคัดเลือดยาใหม่ๆ (drug screening) ได้ด้วยเช่นกัน เทคนิคนี้มีพื้นฐานมาจากการประยุกต์ใช้ทวินอาร์จินีนทรานสโลเคชั่นพารเวย์หรือแทพพารเวย์ของแบคทีเรีย *E. coli*

เทคนิคนี้สามารถทำได้โดยการให้แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตฟิวชั่นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยสับสเตรทอยู่ตรงกลางและมีเปปไทด์ส่งสัญญาณของแทพพารเวย์อยู่ที่ปลายเอ็น (N-terminus) และมีรีพอร์ตเตอร์โปรตีนเป็นเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (β -lactamase) อยู่ที่ปลายซี (C-terminus) รวมทั้งโปรตีนเอสและโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ไปพร้อมๆ กัน เมื่อโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ยับยั้งการย่อยที่คลิเวจไซต์ของสับสเตรทโดยโปรตีนเอสจะเกิดการขนส่งด้วยแทพพารเวย์ของฟิวชั่นโปรตีนที่ไม่ถูกตัดจากไซโตพลาสซึมไปยังเพอริพลาสซึมและทำให้เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สามารถทนยาปฏิชีวนะได้ ทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้คัดเลือกโปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ได้