



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการออกแบบและสร้างแบบตีเรียล์ไลน์สั้นเคราะห์เป็นเครื่องจักรทางชีวภาพเพื่อใช้ในการหาโพธิ์ເອສວິນອີບິເຕວີ

โดย ผศ.ดร.ดุจเดือน วรา荷

พฤษจิกายน 2561

ลิขสิทธิ์ ลิขสิทธิ์ TRG5780079

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการออกแบบและสร้างแบบตีเรียอีโคไลน์สังเคราะห์เป็นเครื่องจักรทางชีวภาพเพื่อใช้ในการหาพรทีเอสอินอิบิเตอร์

ผศ.ดร. ดุจเดือน วรา荷
สังกัดหลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกอ.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5780079

ชื่อโครงการ : การออกแบบและสร้างแบปท์เรียกอีโคล์น์สังเคราะห์เป็นเครื่องจักรทางชีวภาพเพื่อใช้ในการคัดเลือกโพรตีເອສອນອີບີເຕອຣ໌

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ดุจเดือน วรากา

หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

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

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

โปรตีເອສອນອີບີເຕອຣ໌ສາມາຮາໃຊ້ຮັກໝາໂຣຄໄດ້ໜາກໜາຍ ເຊັ່ນ ໂຮງໝໍໃຈແລະໜຸດເລື່ອດ ແລະໂຣຄ ຕິດເຊື່ອເອໜ້າໄວ້ ໃນປັຈຈຸບັນ ໂປຣຕິເອສອນອີບີເຕອຣ໌ສ່ວນໃຫ້ໝັກທໍາການຍັນຍັງການທໍາການຂອງໂປຣຕິໂດຍ ອາສັຍຄວາມຈຳເພາະເຈາະຈັກບໍລິເວັນເຮັງຂອງເອນໄໝໜໍ້ສົ່ງຜລູ້ຂ້າງເຄີ່ງອັນເນື່ອມາຈາກການຈັບກັບໂປຣຕິນ ອື່ນຂອງຜູ້ປ່າຍໄດ້ ໂດຍຖຸກເຮີກວ່າ off-target effect ອີກວິທີກາຮັ່ງທີ່ໃຊ້ໃນການຍັນຍັງການທໍາການຂອງເອນໄໝໜໍ້ ໂປຣຕິເອສສາມາຮາໃຫ້ໄດ້ໂດຍອາສັຍຄວາມຈຳເພາະທີ່ຈຸດຕັດຈຳເພາະບນ້ຳສເຕຣຕແທນຄວາມຈຳເພາະທີ່ບໍລິເວັນ ເຮັງຂອງເອນໄໝໜໍ້ດັ່ງກ່າວ ດັນຜູ້ວິຈັຍໄດ້ເສັນອ່ທີ່ຈະໃຊ້ກະບວນການທ່າງໝົວທິຍາສັງເຄຣະໜໍ້ເພື່ອສ່ວັງ ແບບທີ່ເຮີຍອື່ໂໂລສໍາຫັນໃຊ້ເປັນເຄື່ອງມືອົດເລື່ອກາທ່າງໝົວກາພສໍາຫັນການຕິດເຊື່ອເອໜ້າໄວ້-1 ໂດຍອາສັຍຄວາມສາມາຮາຂອງຮະບັບຂນ່າງໂປຣຕິຂອງແບບທີ່ເຮີຍ Twin arginine translocation pathway ໃນການຂັ້ນສ່ງ ໂປຣຕິນທີ່ພັບມ້ານແລ້ວຝ່ານເຢືອໜຸ້ມ້ຳໃນຂອງແບບທີ່ເຮີຍອື່ໂໂລແລະໃຊ້ TEM-1 β -lactamase (Bla) ເປັນຕົວ ປ່ອງໜີ້ຄວາມສໍາເຮົາຂອງການຂັ້ນສ່ງໂປຣຕິນ ກະບວນການທີ່ສ່ວັງຂຶ້ນໃໝ່ນີ້ໃຊ້ໜີ້ວ່າ Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering (PROTECT) ໂດຍມີອົງດົກປະກອບສຳຄັນ 3 ປະກາດ ອື່ນ ຕັ້ງວັດຜລກການທໍາການຂອງເອນໄໝໜໍ້ໂປຣຕິເອສ (ໜີ້ປະກອບຂຶ້ນດ້ວຍ ຕັ້ງສ່ງສັນນູ້ງານທີ່ຈຳເພາະເຈາະຈັກບໍລິເວັນສ່ງໂປຣຕິຂອງແບບທີ່ເຮີຍ Twin arginine translocation pathway; ssTorA, ຊັບສເຕຣຕຂອງໄວ້ສ (p17dp24 ແລະ ໂປຣຕິນຮາຍງານຜລ (Bla)), ຕັ້ງພລິຕເອນໄໝໜໍ້ໂປຣຕິເອສຂອງໄວ້ສ ເອໜ້າໄວ້-1 ແລະ ດ້ວຍຍັນຍັງການທໍາການຂອງເອນໄໝໜໍ້ໂປຣຕິເອສ (ໜີ້ອື່ນ ໂປຣຕິເອສອນອີບີເຕອຣ໌; ອິນທາເຊລຸລູລັງ ແອນຕົບອື່ທີ່ ຢື່ອ single-chain antibody fragment (scFv)) ກາຣທດລອງທາງ *in vivo* ໄດ້ຢືນຍັນວ່າ ກະບວນການ PROTECT ສາມາຮາແສດງໃຫ້ເຫັນຄື່ງຄວາມແຕກຕ່າງຮ່ວງຊຸດຄວບຄຸມເຊີງບວກແລະລບ້ື່ນ້ຳ ອື່ນ ຄວາມສາມາຮາໃນການຈັບຈຳເພາະແລະໄມ່ຈັບຈຳເພາະຂອງ scFvts ກັບຊັບສເຕຣຕຂອງເອໜ້າໄວ້-1 ຕາມລຳດັບໂດຍໃນກາຣທດລອງພບວ່າໂປຣຕິເອສອນອີບີເຕອຣ໌ scFvp17 ສາມາຮາຈັບແລະປົກປ້ອງຈຸດຕັດຂອງຊັບສເຕຣຕແລະ ທຳໄໝ້ຊັບສເຕຣຕຖຸກຂນ່າງສ່ງໂດຍກະບວນການ Tat-pathway ໄປຢັງເພື່ອປຸລາສ້ານໃດ ທຳໄໝ້ແບບທີ່ເຮີຍດັ່ງກ່າວ

สามารถเจริญบนงานอาหารที่มียาปฏิชีวนะประเภท β -lactam นอกจากนี้ ยังได้นำเทคนิคดังกล่าวไปทำการคัดเลือก scFvp17 กล่ายพันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปกป้องของโปรดิโอสอินอิบิเตอร์ ดังนั้น คณะผู้ทดลองจึงสร้างไลบรารีการกล่ายพันธุ์ของ scFvp17 (ตัวดังเดิม) และคัดแยกโปรดิโอสอินอิบิเตอร์ ที่ถูกกล่ายพันธุ์ที่สามารถทนต่อแรงกดดันที่สูงขึ้นได้ซึ่งคือทนต่อความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะคาร์เบนนิชิลินที่สูงขึ้น เป็นที่น่าเสียดายว่าคณะผู้ทดลองไม่พบว่ามีตัวใดที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องจุดตัดได้ดีกว่าตัวดังเดิม ดังนั้น เพื่อปรับปรุงและศึกษาคุณลักษณะของเทคนิค PROTECT นี้ให้ดีขึ้น ในอนาคต ควรมีการสร้างไลบรารีที่มีคุณภาพที่ดีมากกว่าที่สร้างได้ในปัจจุบันนี้แล้วนำมายทดสอบกับระบบ PROTECT นี้อีกรัง รวมถึงสามารถนำระบบนี้ไปใช้ทดสอบกับแอนติเจนต่างๆ นอกเหนือไปจาก p17 นี้ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ทำให้ได้กระบวนการใหม่สำหรับใช้ในการคัดเลือกโปรดิโอสอินอิบิเตอร์เพื่อลดการติดเชื้อเอชไอวี-1 และยังนำไปประยุกต์เพื่อใช้งานได้อย่างหลากหลาย เช่น การเพิ่มประสิทธิภาพของโปรดิโอสอินอิบิเตอร์ในเชิงพาณิชย์และ/หรือใช้ในการคัดเลือกโปรดิโอสอินอิบิเตอร์ตัวใหม่

คำหลัก : ชีววิทยาสังเคราะห์; โปรดิโอสอินอิบิเตอร์; ระบบขันส่งโปรดีนของแบคทีเรีย ทวิน-อาร์จินีน ทรานส์โลเคชัน พาราเวีย; อินทร่าเซลลูลาร์แอนติบอดี/ 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-prone 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* 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. 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 polyprotein 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].

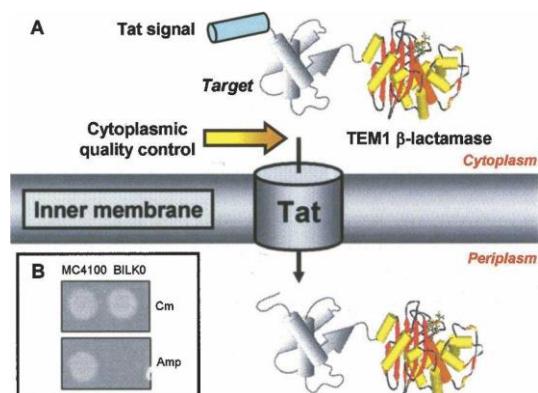


Figure 1. Exploiting the Tat pathway's folding quality control and hitchhiker mechanisms for isolation of intrabodies. (A) A tripartite fusion protein is created between a Tat signal peptide (e.g., ssTorA), a target protein, and the TEM1 β -lactamase protein (Bla). Discrimination between folded and misfolded 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 – SalI 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-XbaI 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.

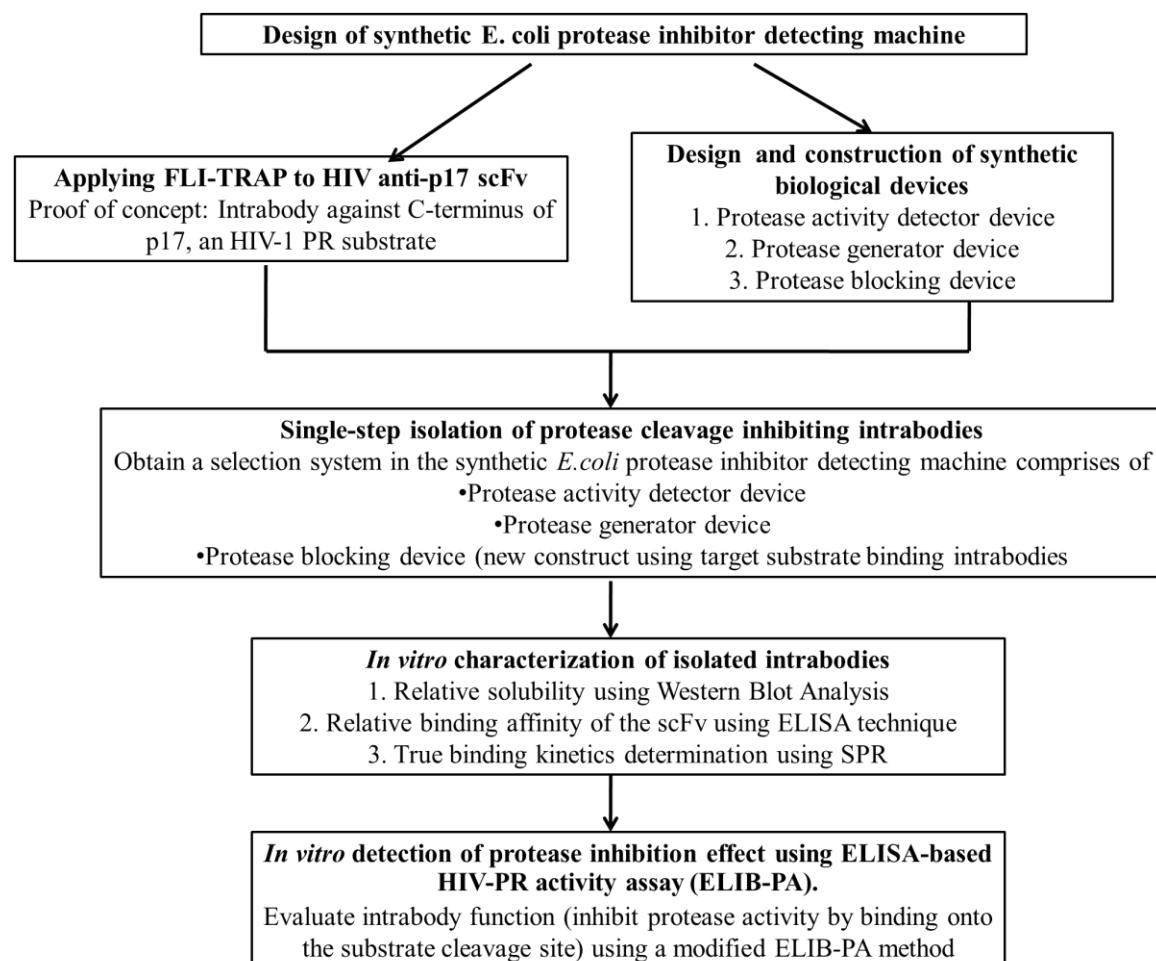


Figure 2. Flow chart highlighting critical steps involved with construction and characterization of a synthetic *E. coli* protease inhibitor detecting machine.

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.

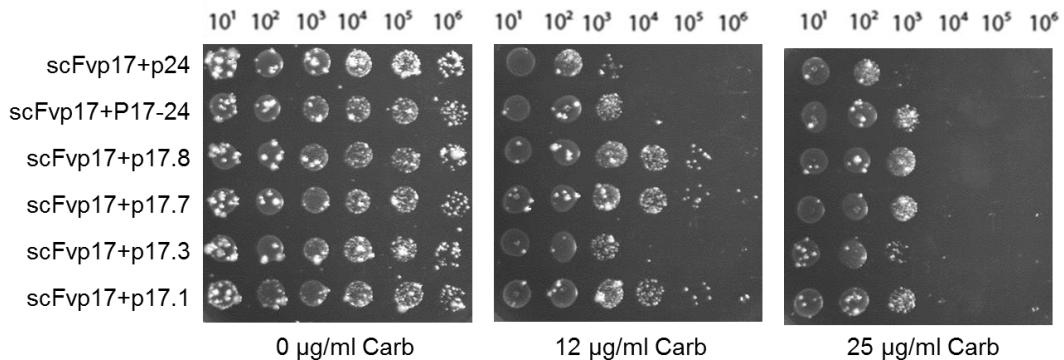


Figure 3. Selection of scFvp17 that binds HIV antigens. Selective plating of serially diluted cells expressing different antigen-antibody pairs on Carb as indicated. Each spot corresponds to 5 µL of serially diluted cells.

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 bind to the p24 peptide thus cannot be transported via the hitchhiker mechanism (figure 4).

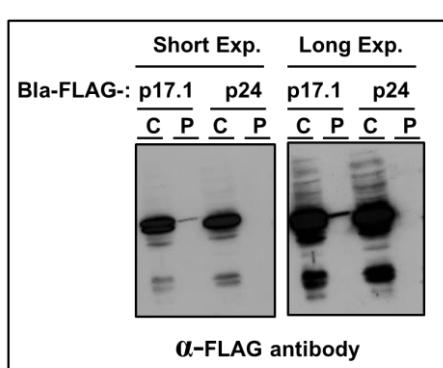


Figure 4. Co-translocation of Bla chimeras to the periplasm. Western blot analysis of periplasmic and cytoplasmic fractions generated from wt MC4100 cells carrying pBR-TatABC and co-expressing ssTorA-scFvp17-His-HA and Bla-FLAG-p17.1 or p24 as indicated. Detection of Bla-antigen constructs was with anti-FLAG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

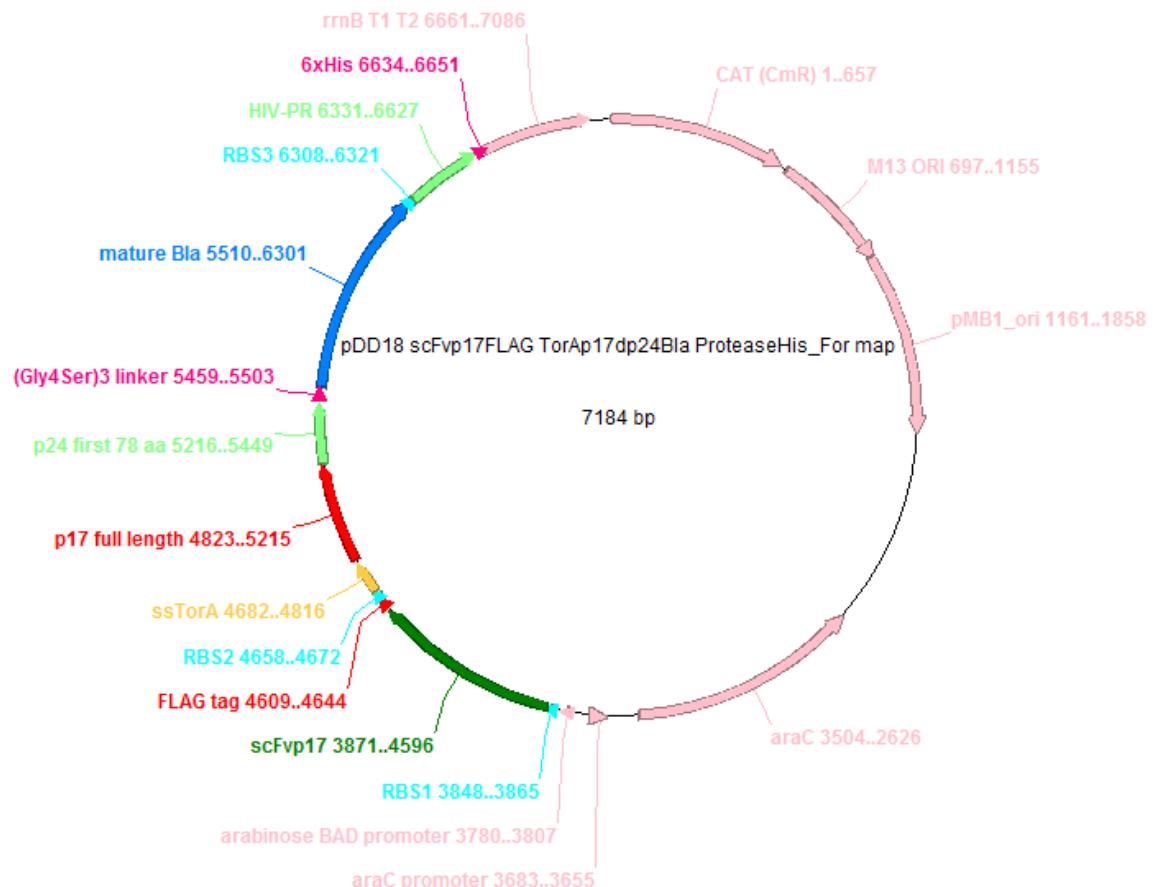


Figure 5: Plasmid map of the system used for construction of the synthetic *E. coli* biomachine. The devices are placed as an operon and controllable by the same promoter, AraBAD promoter.

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 *SaII* 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-p17dp24-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 Kanamycin 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.

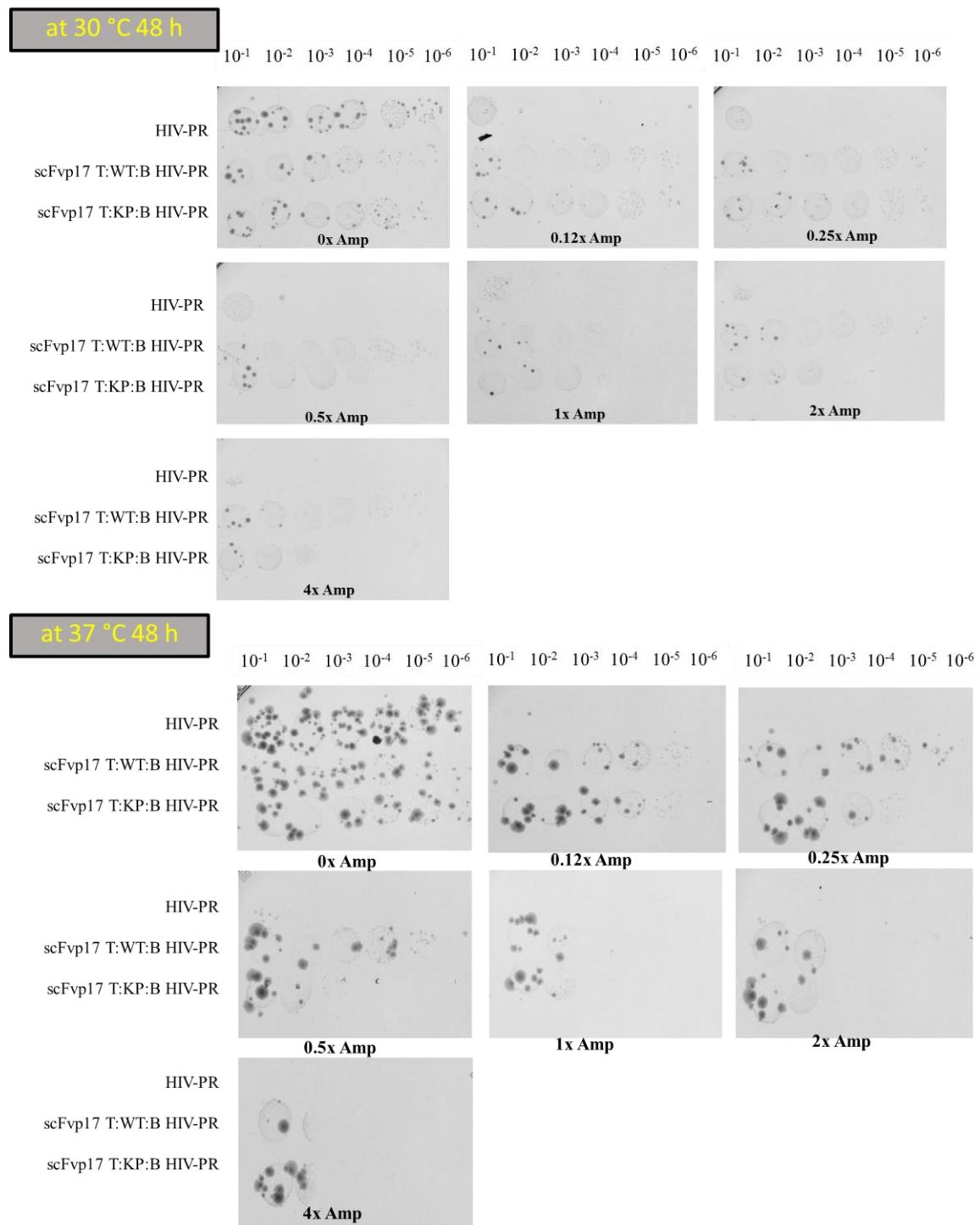


Figure 6. Selection of scFvp17 that binds HIV antigens. Selective plating of serially diluted cells expressing different antigen-antibody pairs on Carb as indicated. Each spot corresponds to 5 μ L of serially diluted cells.

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.

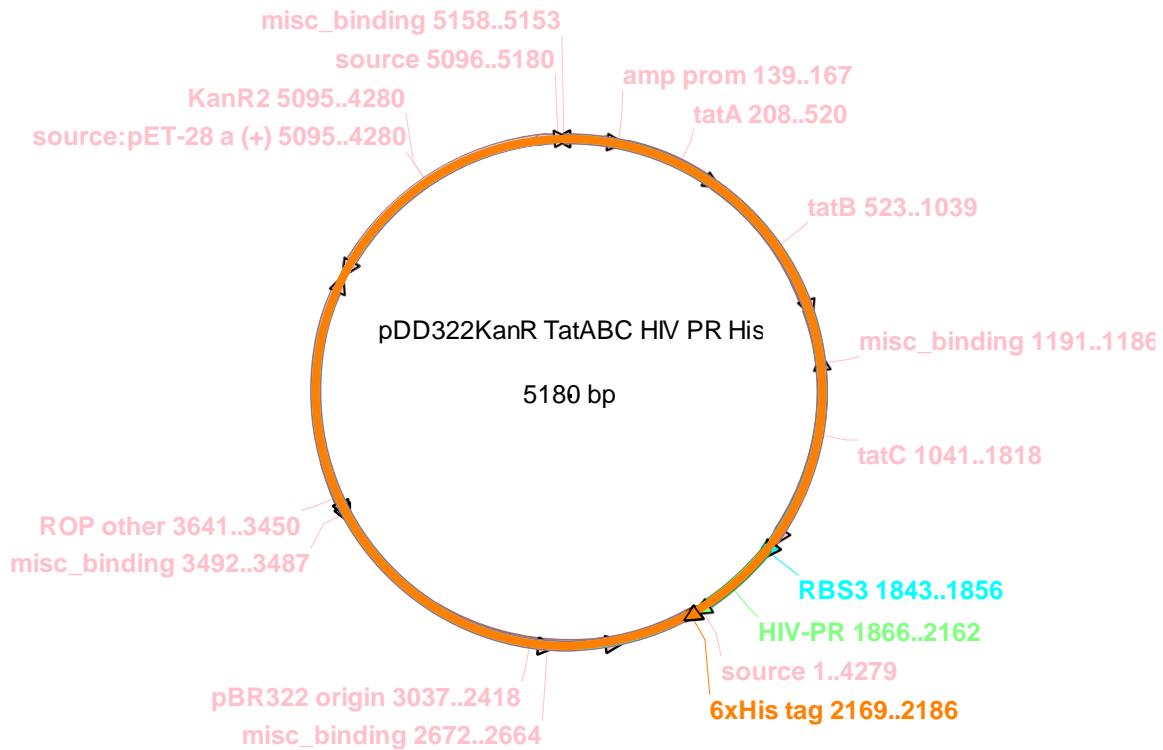


Figure 7: Plasmid map of the system used for construction of the synthetic *E. coli* biomachine. HIV-PR was placed in a low-copy-number plasmid, pDD322, where it is under the TatABC constitutive promoter.

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 dead 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 a 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.

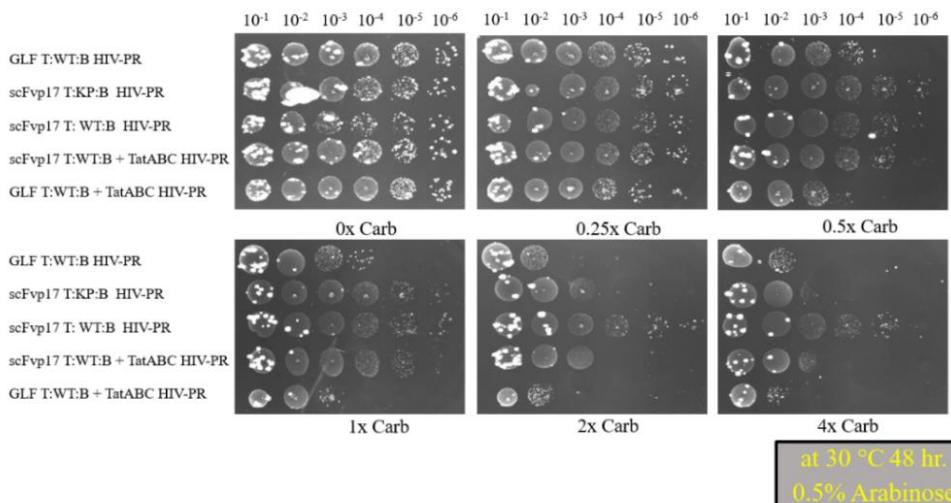
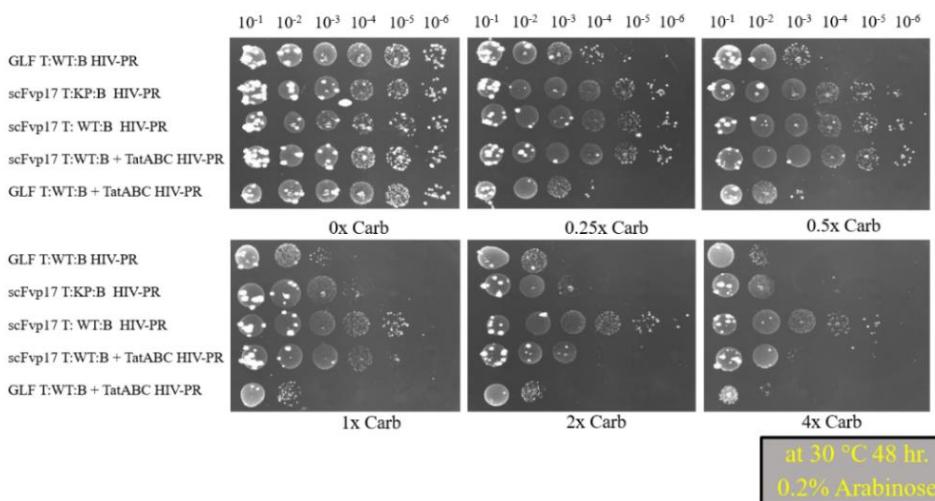
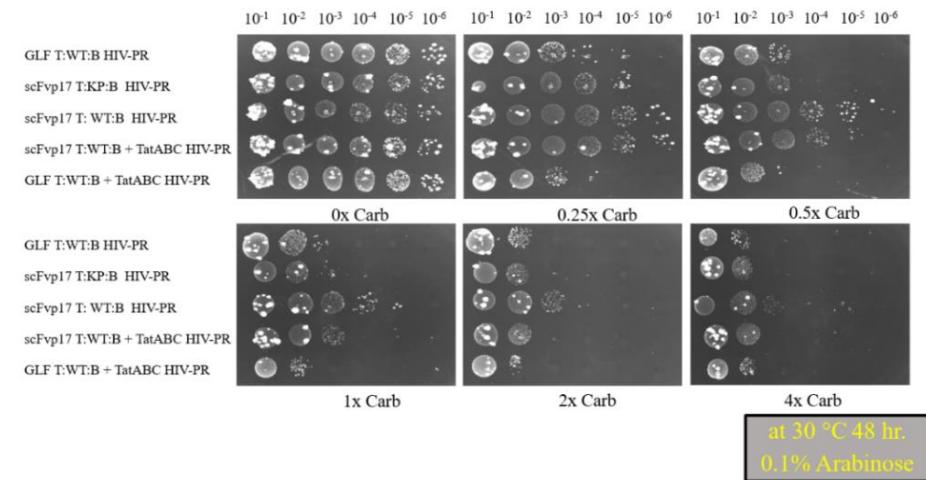


Figure 8. Comparison of tricistronic and bicistronic system for selection of scFvp17 that binds HIV antigens. Selective plating of serially diluted cells expressing different antigen-antibody pairs on Carb as indicated. Each spot corresponds to 5 µL of serially diluted cells.

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 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.

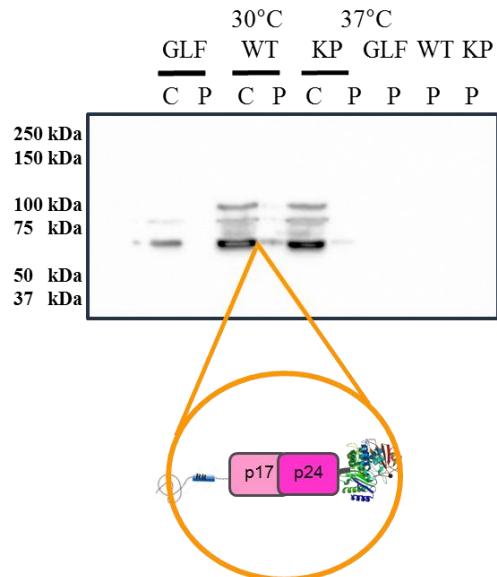


Figure 9 Western blot analysis of transport.

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.

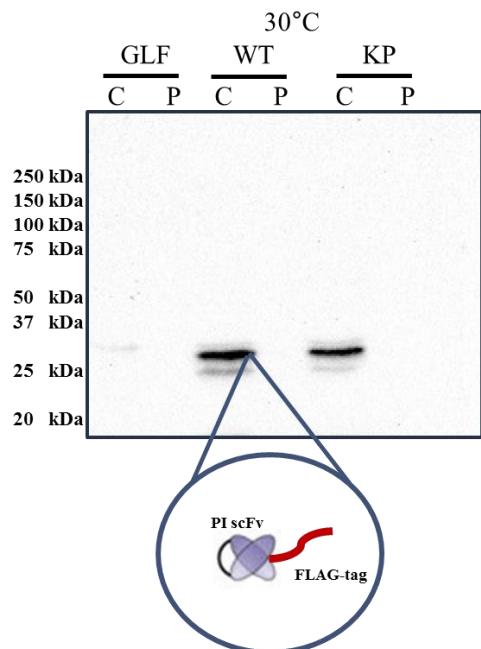


Figure 10 Western blot analysis of scFv expression. Detection of level of expression of various scFvs was performed using anti-FLAG antibody. The expected size is 28 kDa. Lane 2-7 are cytoplasmic (C) and periplasmic (P) fractions expressed at 30°C of GLF+scFvssTorAp17p24Bla (negative control), scFvp17+ssTorAp17p24Bla and scFvp17+ssTorAp17p24(YPKP)Bla (positive control), respectively.

Finally, this technique confirmed that 30°C was the appropriate 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

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

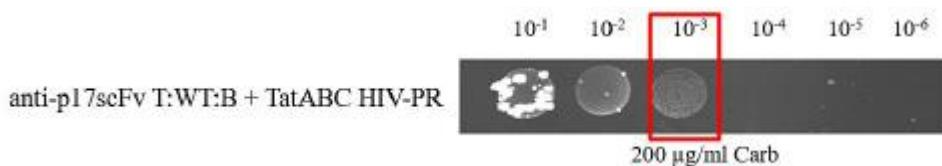


Figure 11 Identification of culture cell dilution for library selection condition. The rectangle box highlights the last dilution that the wild type anti-p17 scFv can grow which was used to identify selection condition of the enhanced mutant scFvs from a library.

Nonetheless, the condition which was selected to isolated the mutant library was 0.5% arabinose, Carb concentrations between 200 - 400 μ g/ml and 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 μ g/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 μ g/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.

2537352 libr	GTCCGGAGGTGGCGGGTCCGGCGGTGGAGGGTCGGATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTTGAACAAAC
scFvp17 WTT.....
2537353 libr	TTAGGTAGTGAATGGGAAGACATTTTGAAATTGGTTGTTACGGAGGCCAGGCCAGTCTCAAAGGCCCTAATTATCTGATGTCATAA
scFvp17 WTA.....A.....
2537354 libr	CTCCATTTATTGTAAGTCAGTCAGAGCCCTTAGGTAGTGATGGAAAGACATTTGAAATTGATTGTTACAGAGGCCAGGCCAGT
scFvp17 WTC.....G.....

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 μ g/ml Carb, 10^{-3} dilution and 0.5% arabinose. The colonies number 10, 12, 15, 18, 25, 27 and 28 were isolated from 300 μ g/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.

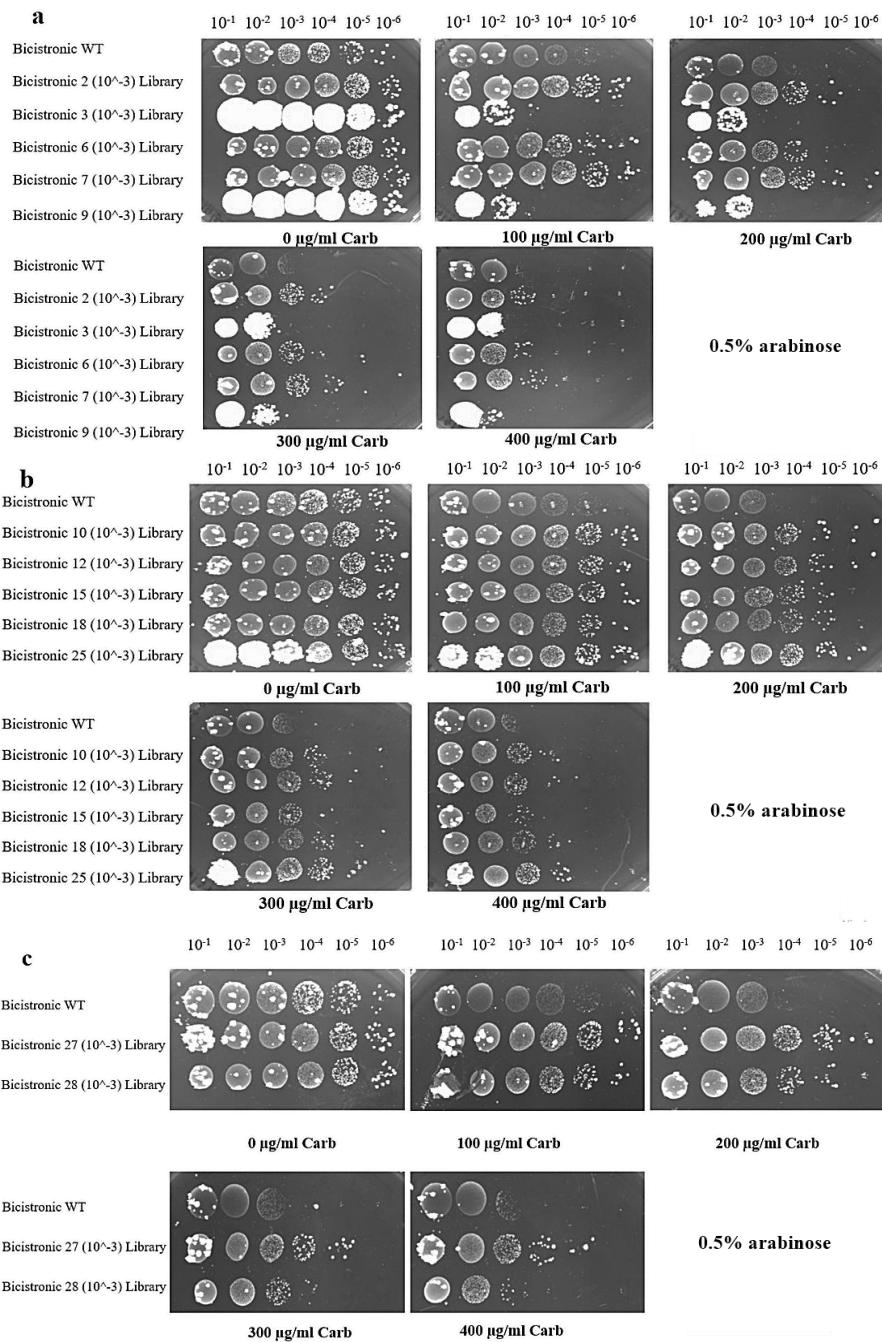


Figure 13 Selective plating of serially diluted cells expressing isolated scFv mutants on LB agar plates containing 0.5% Arabinose and various Carb concentrations and incubated at 30 °C. Each spot corresponds to 5 μL of serially diluted cells. The mutants were isolated from error prone scFv library by spreading 100 μL of 10^{-3} fold dilution of overnight culture normalized to $\text{OD}600 = 2.5$ 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.

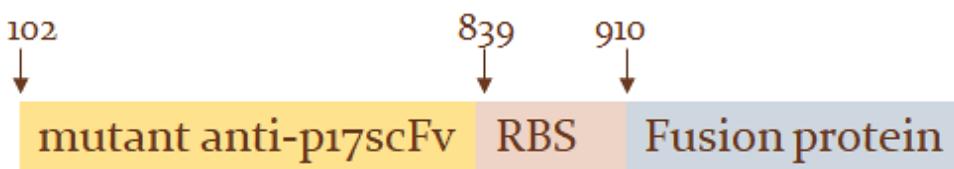


Figure 14 The expected sequences of the plasmid from error prone PCR by GeneMorph® II EZClone Domain Mutagenesis Kit.

a

```

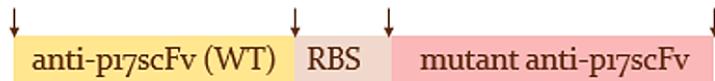
2695184 Lib AAGGTCATATGCAGATCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAGAGATCTCCTGCAAGGCCTCT
scFvP17 (doub
. .....
2695184 Lib ACAAGGACGATGACGACAAGGGATAAGGTACCTAACTAATTAAAGAGGGAGAAAGGTCAATACGATCCAGTGGTGCAGTCTGGAA
scFvP17 (doub
. .....
2695184 Lib AGAAGSCTGGAGAGCAGTCAGATCTCCTGCCAAGGCCCTCTGGATATACCTTCACAGACTATGGAACTGGATGAAACAGGCT
scFvP17 (doub
. .....

```

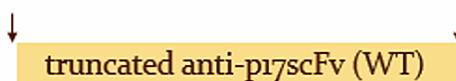


b

2695182 Lib scFvp17 (douk) AAGGTCAATGCAGATCCAGTTGGTCAGCTGGACCTGAGCTGAAGAACGCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCGTCAAGGCCCTC
2695182 Lib scFvp17 (douk) TACAAGGACGATGACGACAAGGGATAAGGTACCTAACTAATTAAAGAGGGAAAAGGTCAATATGCCAGATCCAGTTGGTCAGCTGG
2695182 Lib scFvp17 (douk) AGGAAAGAGTTAAAGTGGATGGGATAAACACCTACACCGGAAAGCCAAACATAATGCTGATGAATTCAAGGGACGGTTGCCTC



6



d

```

2695186 Lib          AAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAACGCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCT
scFvp17 (doubt)    .....
2695186 Lib          ACCTTCACAGACTATGGAATGAACTGGATGAAAACAGGCTCCTGGAAAGAGTTAAAGTGGATGGGTTGGATAAACACCTACACTGG
scFvp17 (doubt)    .....
2695186 Lib          GGTCACGTCTCTGCAGGTGGCGGAGGGTCTGGAGGTGGGGTCGGCGGTGGAGGGTCGGATGTTGTGATGACCCAGACTCCAC
scFvp17 (doubt)    .....
2695186 Lib          GGACGATGACGACAAGGGATAAAGTACCTAACTAATTAAAGAGGGAAAGGTCAATACAGATCCAGTTGGTCAGTCTGGACCTG
scFvp17 (doubt)    .....
2695186 Lib          AAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCTCTGGATAAACCTCACAGACTATGGATGAACTGGATGAAAACAGGG
scFvp17 (doubt)    .....

```

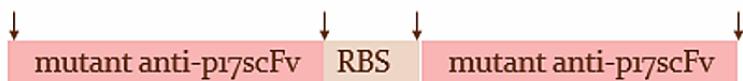


e

```

2695189 Lib          AAGGTCATATGCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCGAGATCTCCTGCAAGGCCCTCT
scFvp17 (doubt)    .....
2695189 Lib          GAATTCAAGGGACGGTTGCCTTTCTTGGAAACCTATGCCAGCACTGCCTATTGCGAGATCAACAACTCAAAAGTGAGGACAT
scFvp17 (doubt)    .....
2695189 Lib          TTCTGTTCAAGATCTATGAAAGGTTCTATTGGAGGCCAAGGGACTCTGGTCACGTGTCCTGCAAGGTGGCGGGAGGGTCTGGAGGTTGG
scFvp17 (doubt)    .....
2695189 Lib          CAAGGACGATGACGCAAGGGATAAAGGTACCTAATTAAGAGGAGAAAGGTCAATATGCGAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGAC
scFvp17 (doubt)    .....
2695189 Lib          CCTGAGCTGAAGAAGCCGGAGAGACAGTCGAGATCTCCAGCAAGGCCCTCTGGATATACCTTCACAGACTATGAACTGGAAT
scFvp17 (doubt)    .....

```



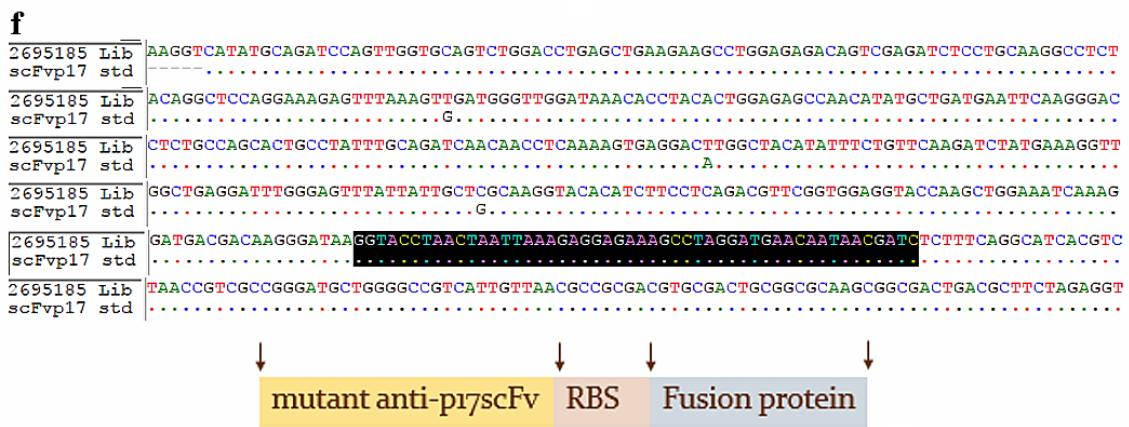
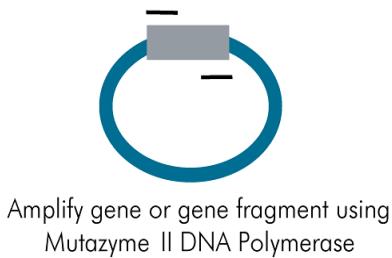


Figure 15 Sequencing analysis of the isolated anti-p17 scFv mutants. The sequencing results were analyzed by BioEdit program. (A) colonies number 6, 7, 15 and 28 showing 2 copies of wild type scFvp17, (B) colonies number 2 showing 1 copy of WT scFvp17 and 1 copy of mutant scFvp17, (C) colonies number 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 μ 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

Mutant Megaprimer Synthesis



Amplify gene or gene fragment using
Mutazyme II DNA Polymerase

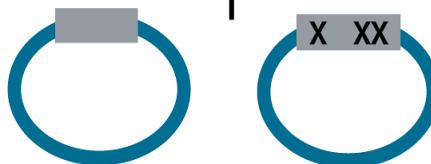
X XX

Purify target fragment containing mutations (X)

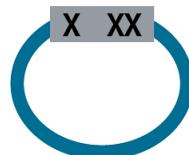
EZClone Reaction



Mutated PCR products serve as megaprimer
that are denatured and annealed to the original
donor plasmid and extended in the EZClone reaction
using a specialized high fidelity enzyme mix



EZClone restriction enzyme *Dpn* I digests
unmutated donor plasmid DNA



Plasmids with mutations in targeted gene or gene fragment
are transformed into competent *E. coli* cells

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.

aWT 10^{-2} dilution at 1% Ara100 $\mu\text{g/ml}$ Carb150 $\mu\text{g/ml}$ Carb200 $\mu\text{g/ml}$ CarbWT 10^{-3} dilution at 1% Ara**b**Library 10^{-2} dilution, 100 $\mu\text{g/ml}$ Carb and 1% Ara (1-4)Library 10^{-3} dilution, 100 $\mu\text{g/ml}$ Carb and 1% Ara (1-4)

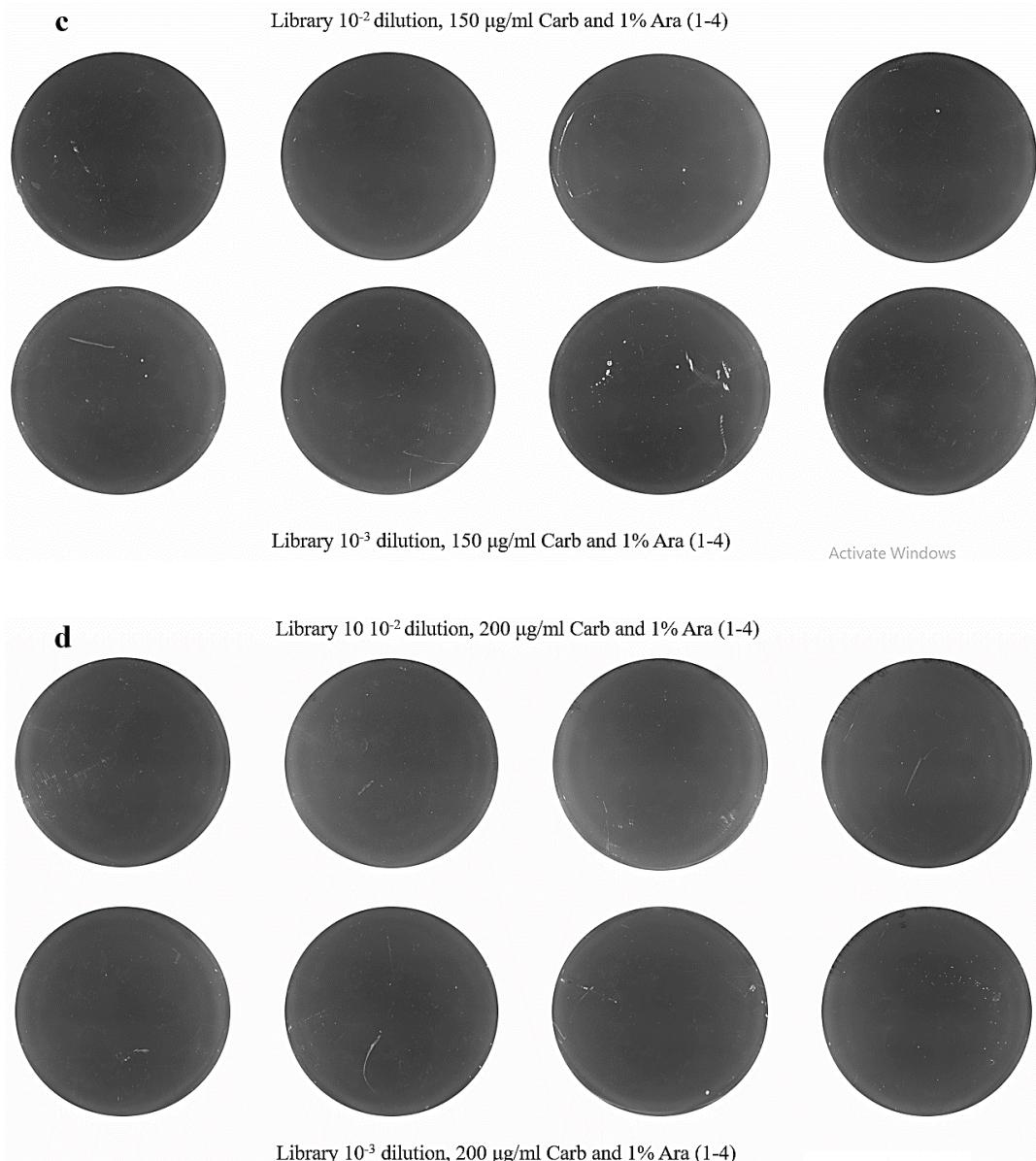


Figure 17 The selection plates for library selection. Cells carrying plasmid library were spread onto 100-mm petri dish. The conditions used for library selection were 10^{-2} and 10^{-3} dilutions, 100, 150 and 200 $\mu\text{g/ml}$ Carb and 1% arabinose (A) the results of WT scFvp17 in each condition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

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 องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีอสอินยิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการ
ขนส่งโปรตีนทวินอาร์เจนีนทรานส์โลเคชันพาราเวร์

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]. DeLis 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; dujuan.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

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

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 *Kpn*I-*Xma*I 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; Abcam) 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.

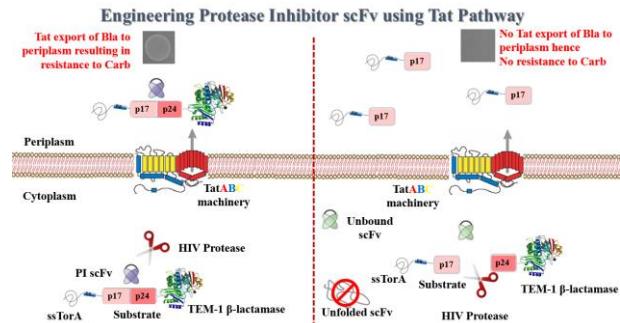


Figure 1 Exploiting the Tat pathway for selecting protease inhibiting intrabody

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.

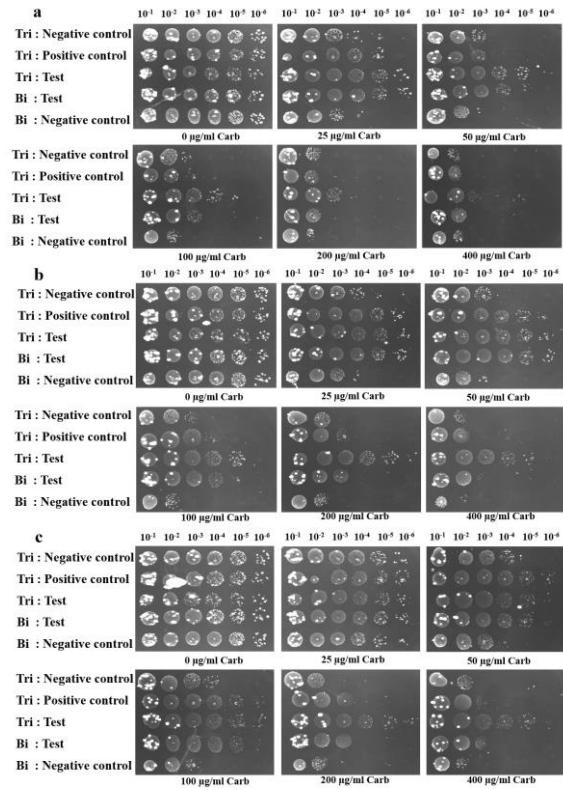


Figure 2 spot plate result use 10^{-1} - 10^{-6} dilution samples vary concentration of antibiotic (carbenicillin) and arabinose with 0 - 400 μ g/mL and (a) 0.1%, (b) 0.2% and (c) 0.5% , respectively. The result have 5 conditions as negative control; pDD18 scFvGLF ssTorAp17 Δ p24Bla HIV-PR+pDD322 TatABC,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

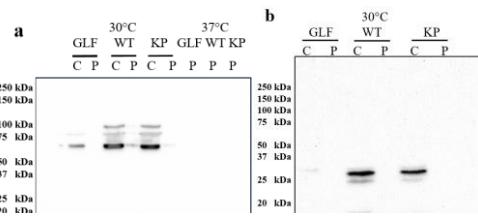


Figure 3 Western blot result, use primary antibody a) an anti-Bla for detect ssTorA:: p17 Δ p24WT::Bla that size of this part is 58.5 kDa. Lane 2-7 are cytoplasm and periplasm at 30°C of negative control, scFvp17::ssTorA:: p17 Δ p24::Bla and positive control, respectively. Lane 8-10 are periplasm of 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 translocalization 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. DeLisa, "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. 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, pp. 3692-3697.
- [5] D. Tewari, S.L Goldstein, A.L Notkins, and P. Zhou, "Cdna 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-Vitinanen *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-Zhmayev, B. Meksiriporn, A.D. Portnoff, and M.P. DeLisa, "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

สำเนา



แบบ สป/สพ/อสป/003-ก

สำหรับเจ้าหน้าที่

คำขอที่
รับวันที่

- 3 ก.พ. 2561

คำขอแก้ไขเพิ่มเติมคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร เลขที่ 1701003852

วันที่ยื่นคำขอ 7 กุมภาพันธ์ 2560

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรดิโอดิสโินอิบิเตอร์ฯ
ชื่อผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ข้อ 1. ข้าพเจ้า นางสาวผ่องศรี เวสารัช

บุคคลธรรมด้า นิติบุคคล หน่วยงานรัฐ หน่วยงานส่วนท้องถิ่น
ที่อยู่ สำนักงานวิจัย นวัตกรรมและพันธมิตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ตำบล/แขวง นางมด อำเภอ/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพฯ
รหัสไปรษณีย์ 10140 โทรศัพท์ 02-2470-9662, 9688 ยกเว้นค่าธรรมเนียม
 เลขประจำตัวประชาชน เลขทะเบียนบัตรประชาชน เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 3 1 0 2 4 0 0 4 5 2 8 3 4
ซึ่งเป็นผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรหรือตัวแทนของผู้รับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรที่ระบุข้างต้น ขอยแก้ไขเพิ่มเติมคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ดังกล่าว ดังมีรายละเอียดตามที่แนบมาพร้อมนี้

ข้อ 2. ข้าพเจ้าขอยืนยันว่าการแก้ไขเพิ่มเติมนี้เป็นไปตามมาตรา 20 แห่งพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522 กล่าวคือ¹
ไม่เป็นการเพิ่มเติมสาระสำคัญของการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์

วันที่ 26 มิถุนายน 2561

ลายมือชื่อ

dw (นางสาวผ่องศรี เวสารัช)



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

การประดิษฐ์
 การออกแบบผลิตภัณฑ์
 อนุสิทธิบัตร

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

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันที่รับคำขอ
 วันที่ยื่นคำขอ

เลขที่คำขอ

สัญลักษณ์/จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้แบบฟอร์มที่
 ประmath ผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา
 เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
 เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
 ... องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้ตัดเลือกไปประดิษฐ์อื่นๆ โดยอาศัยกระบวนการนั้นส่งเสริมห่วงโซ่อุปทานสู่เชิงพาณิชย์

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบฟอร์มที่ยื่นและเป็นคำขอลำดับที่
 ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร บุคคลธรรมดา นิติบุคคล หน่วยงานรัฐ มูลนิธิ อื่นๆ
 ชื่อ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 ที่อยู่ เลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ

3.1 สัญชาติ ไทย

3.2 โทรศัพท์ 0-2470-9663, 9688

3.3 โทรสาร 0-2872-9083

ที่อยู่ บ้านเลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวง/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10140 ประเทศไทย ไทย

อีเมล ip@kmutt.ac.th

เลขประจำตัวประชาชน เลขทะเบียนบัตรบุคคล เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 0 9 9 4 0 0 0 1 6 0 0 9 7 เพิ่มเติม (ดังแนบ)
 ในกรณีที่กรอก สำหรับกับท่าน ท่านสะดวกเข้าทาง อีเมลผู้ขอ อีเมลตัวแทน

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ผู้รับโอน ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)

ชื่อ นางสาวม่องคลี เวลาสีรี
 ที่อยู่ สำนักงานวิจัย นวัตกรรมและพันธมิตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

5.1 ตัวแทนเลขที่ 1745

5.2 โทรศัพท์ 0-2470-9688

5.3 โทรสาร 0-2872-9083

ที่อยู่ บ้านเลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวง/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10140 ประเทศไทย 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 นางสาวม่องคลี ธนาโรจน์

ที่อยู่ หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ

ที่อยู่ บ้านเลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวง/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10140 ประเทศไทย 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 วันที่ เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพรา

คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ถูกคัดค้านเมื่อจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่มีเอกสารรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์ที่ด้วยบุญญาเล็กกับข้อที่แสดงรายละเอียด เพิ่มเติมตั้งกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จัดทำแบบฟอร์มสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	<input type="checkbox"/> กฎหมาย	<input type="checkbox"/> กฎหมาย	<input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการออกแบบ	<input type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)	<input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เหมืองทราย)	<input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)	<input type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)	
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)	<input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี)	<input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)	<input type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร (ไฟฟ้า)	
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ศิลปะ)	<input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เหมืองอิฐชิ้วภาพ)	<input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)	<input type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร (ศิลปะ)	

8. การยื่นคำขอกราจากอาณาจักร <input type="checkbox"/> PCT					<input type="checkbox"/> เพิ่มเติม (ตั้งแนบ)
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ		สถานะคำขอ
8.1					
8.2					
8.3					
8.4 <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย <input type="checkbox"/> เดียวกับเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ <input type="checkbox"/> ขอรับเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้					
9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด					
วันแสดง	วันเปิดงานแสดง	ผู้จัด			
10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ					
10.1 เลขทะเบียนฝาเก็บ	10.2 วันที่ฝาเก็บ	10.3 สถาบันฝาเก็บ/ประเทศ			
11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอรับเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจดยื่นคำขอรับสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ 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/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเที่ยงหมายเลข					
13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย			14. เอกสารประกอบคำขอ		
ก. แบบพิมพ์คำขอ 3	หน้า	<input checked="" type="checkbox"/> เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร		
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์			<input type="checkbox"/> หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์		
หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 34	หน้า	<input checked="" type="checkbox"/> หนังสือมอบอำนาจ		
ค. ข้อถือสิทธิ 2	หน้า	<input type="checkbox"/> เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ		
ง. รูปเขียน 7	รูป 7	<input type="checkbox"/> เอกสารการขอันบันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย		
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์			<input type="checkbox"/> เอกสารขอเบลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ		
<input type="checkbox"/> รูปเขียน	รูป	<input checked="" type="checkbox"/> เอกสารอื่นๆ		
<input type="checkbox"/> ภาพถ่าย	รูป			
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1	หน้า			
15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า					
<input checked="" type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน					
<input type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก					
16. ลายมือชื่อ					
<input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input checked="" type="checkbox"/> ตัวแทน					
(นางสาวผ่องศรี เวสวัช) และ/หรือ (นายพิเชษฐ์ รุนพงศ์วงศ์)					

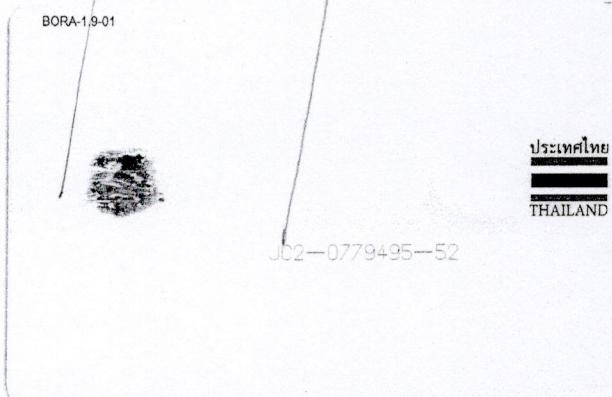
หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่หน้าที่ เพื่อให้ได้ใบสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระหว่างโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจําทั้งปรับ

ใบแนบท้าย แบบ สป/สพ/อสป/001-ก

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input type="checkbox"/> บุคคลธรรมด้า <input type="checkbox"/> นิติบุคคล <input checked="" type="checkbox"/> หน่วยงานรัฐ <input type="checkbox"/> บุลนิธิ <input type="checkbox"/> อื่นๆ	3.1 สัญชาติ ไทย
3.2 ชื่อ ..สํานักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่อยู่ ..ชั้น 14 อาคารอเนกประสงค์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเมือง เลขที่ 979 ถนนพหลโยธิน	3.2 โทรศัพท์ 0-2278-8200
สำบก/แขวง สามเสนใน อำเภอ/เขต พญาไท จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10400 ประเทศ ไทย อีเมล ..	3.3 โทรศัพท์ 0-2298-0476
<input type="checkbox"/> เลขประจำตัวประชาชน <input type="checkbox"/> เลขทะเบียนนิติบุคคล <input checked="" type="checkbox"/> เลขประจำตัวผู้เดีบภาษีอากร ในกรณีที่กรอก สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง <input type="checkbox"/> อีเมลผู้ขอ <input checked="" type="checkbox"/> อีเมลตัวแทน	0 9 9 4 0 0 0 1 6 5 6 9 2
5. ตัวแทน	5.1 ตัวแทนเลขที่ 2272
5.2 ชื่อ ..นายพิเชษฐ์ ธนาพงศ์จงรวย ที่อยู่ ..สํานักงานวิจัย นวัตกรรมและพันธมิตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	5.2 โทรศัพท์ 0-2470-9663
สำบก/แขวง บางมด อำเภอ/เขต ทุ่งครุ จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10140 ประเทศ ไทย อีเมล ..ip@kmutt.ac.th	5.3 โทรศัพท์ 0-2872-9083
เลขประจำตัวประชาชน 3 7 3 0 2 0 0 0 0 9 5 4 9	
6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ <input type="checkbox"/> ชื่อและที่อยู่ดียกับผู้ขอ	
6.2 ชื่อ ..นางสาวเพญบุญญา บุณยเดชา ที่อยู่ ..หลักสูตรชีวศึกษาและพัฒนา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เลขที่ 126 ถนนประชานุกิศ	
สำบก/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 ..นายชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	
ที่อยู่ ..ภาควิชาชีวเคมีและการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถนนอินทนิลวิรารส	
สำบก/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	
สำบก/แขวง อำเภอ/เขต จังหวัด รหัสไปรษณีย์ ประเทศ อีเมล ..	
เลขประจำตัวประชาชน	



Dujduan Waraho
บัตรประจำตัวประชาชน





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

สถานที่

ที่อยู่ 369/73 ช.วัดจันทร์ใน แขวงบางคลอง

เขตบางคลอง กรุงเทพมหานคร

27 พ.ย. 2558 วันออกบัตร

27 Nov. 2015 (กรุงเทพมหานคร)

Date of Issue เจ้าหน้าที่ออกบัตร



20 มี.ค. 2567

วันหมดอายุบัตร

20 Mar. 2024

Date of Expiry

1021-03-11271206

บัตรประจำตัวประชาชน

BORA-8.3-05



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



ประจำตัวประชาชน



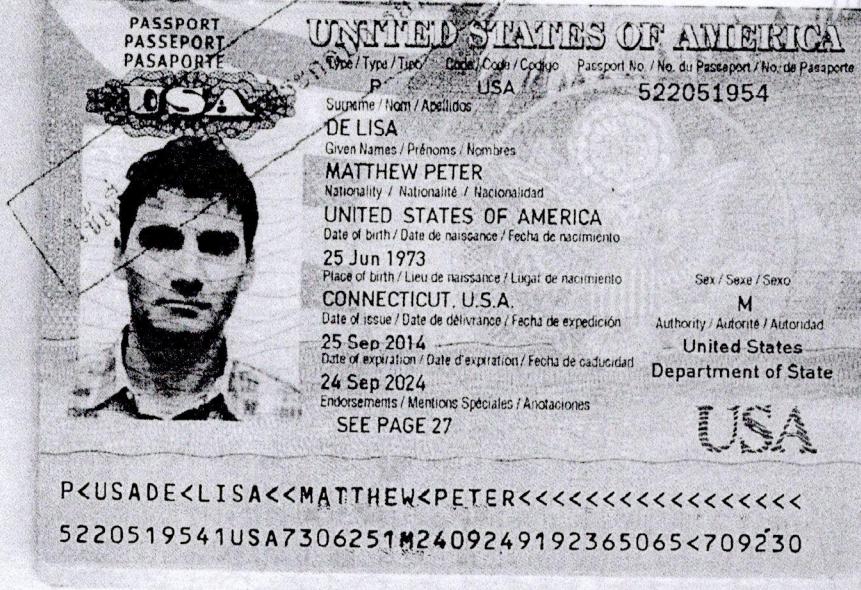
ประจำตัวประชาชน



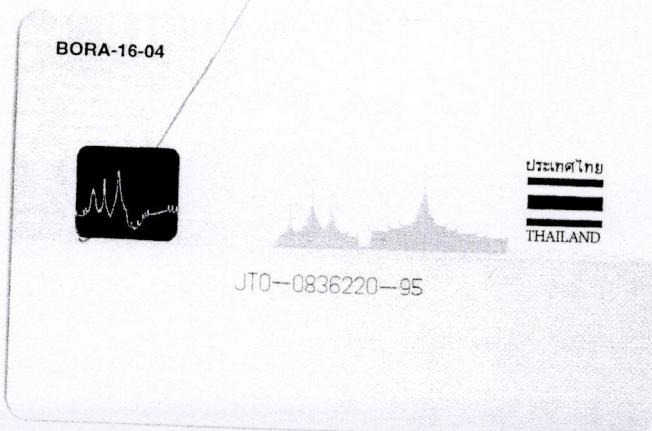
ประจำตัวประชาชน



JT2-0947001-11



Matthew P. Peter



หนังสือสัญญาโอนสิทธิขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เจียนที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

วันที่

26 มิ.ย. 2561

สัญญาฉบับนี้ทำขึ้นระหว่าง

1. นางสาวคุณเดือน วรา荷 2. นางสาวเพ็ญบุญญา บุณยเลขา อายุที่ หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะ
วิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ
10140

3. นายชัชชัย ตะยากิวัฒนา อายุที่ ภาควิชาเทคโนโลยีการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่
110 ถนนอินทนิล ตำบลศรีภูมิ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

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

ซึ่งต่อไปนี้เรียกว่า “ผู้โอน” ฝ่ายหนึ่ง

กับ

- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดย นายศักดิ์ธนกร ภูมิรัตน ตำแหน่ง อธิการบดี
ตั้งอยู่เลขที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดย นายนฤทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ
ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตั้งอยู่ที่ชั้น 14 อาคารอสสอเมืองทาวเวอร์
คอนโดมิเนียม เลขที่ 979 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400

ซึ่งต่อไปนี้เรียกว่า “ผู้รับโอน” ฝ่ายหนึ่ง

โดยสัญญานี้ ผู้โอนซึ่งเป็นผู้ประดิษฐ์ผลงาน “องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีโอนอินซิปิเตอร์โดย
อาศัยกระบวนการทวินอาร์เจนิเนทรานส์โลเคชั่นพาราเบอร์” ขอโอนสิทธิในการประดิษฐ์ดังกล่าว ซึ่งรวมถึงสิทธิขอรับสิทธิบัตร/
อนุสิทธิบัตร รวมถึงสิทธิต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องให้แก่ ผู้รับโอน หากมีผลประโยชน์ใด ๆ ในเชิงพาณิชย์จะดำเนินการตกลงกันเป็น
ลายลักษณ์อักษรในภายหลัง

สัญญานี้ได้ทำขึ้นเป็นสื่อบันทึกข้อความถูกต้องตรงกันซึ่งผู้สัญญาได้อ่านและเข้าใจข้อความของสัญญานี้
โดยตลอดแล้วจึงลงลายมือชื่อไว้เพื่อเป็นหลักฐาน

(ลงชื่อ) ผู้โอน
(นางสาวคุณเดือน วรา荷)

(ลงชื่อ) ผู้โอน
(นายชัชชัย ตะยากิวัฒนา)

(ลงชื่อ) ผู้โอน
(Mr. Matthew DeLisa)

(ลงชื่อ) ผู้โอน
(นางสาวเพ็ญบุญญา บุณยเลขา)

(ลงชื่อ) ผู้รับโอน
(นายศักดิ์ธนกร ภูมิรัตน)

(ลงชื่อ) ผู้รับโอน
(นายนฤทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ)

(ลงชื่อ) พยาน
(นายบัณฑิต พึงธรรมสาร)

(ลงชื่อ) พยาน
(นางวรรณี เต็งสุวรรณ)

เล่ม ๑๓๑ ตอนพิเศษ ๒๖๕ ง

หน้า ๙
ราชกิจจานุเบกษา

๒๕ รัชนาคม ๒๕๕๗

ประกาศสำนักนายกรัฐมนตรี
เรื่อง แต่งตั้งอธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ตามที่ได้มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้ง นายศักวินทร์ ภูมิรัตน์ ให้ดำรงตำแหน่ง
อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ตั้งแต่วันที่ ๒๕ รัชนาคม ๒๕๕๗ ถึง ๒๕ รัชนาคม ๒๕๖๐
ตามประกาศสำนักนายกรัฐมนตรี ลงวันที่ ๑๘ มีนาคม ๒๕๕๓ นั้น ให้ดำรงตำแหน่งจาก นายศักวินทร์ ภูมิรัตน์
ได้ดำรงตำแหน่งมาครบกำหนดตามวาระแล้ว และที่ประชุมสภามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ครั้งที่ ๑๗ เมื่อวันที่ ๑๘ มีนาคม ๒๕๕๗ ได้แต่งตั้งให้เป็นอธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
แต่งตั้ง นายศักวินทร์ ภูมิรัตน์ ดำรงตำแหน่ง อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ต่อไปอีกวาระหนึ่ง ตั้งแต่วันที่ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งเป็นต้นไป และได้นำความกราบบังคมทูล
พระกรุณาโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งดังนี้ไปแล้ว

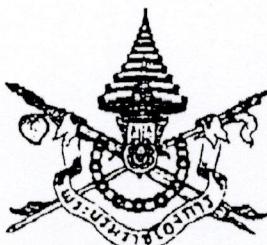
บัดนี้ ได้มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งบุคคลดังกล่าว ให้ดำรงตำแหน่ง^{อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี} ตั้งแต่วันที่ ๒๕ รัชนาคม ๒๕๕๗

ประกาศ ณ วันที่ ๒๕ รัชนาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

ผู้รับสนองพระบรมราชโองการ
ยงยุทธ ยุทธวงศ์
รองนายกรัฐมนตรี

รับรองสำเนาถูกต้อง

(นายศักวินทร์ ภูมิรัตน์)



พระราชບัญญຸດ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

พ.ศ. ២៥៥១

กฎົມພລອດຄຸລຍເທິ. ປ.ຮ.

ໃຫ້ໄວ້ ວັນທີ ១២ ກຸມພັນທີ ພ.ສ. ២៥៥១

ເປັນປີທີ ៥៣ ໃນຮັບກາລນັ້ນຈຸບັນ

พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช ມີพระบรมราชโองการໂປຣເກລ້າ ១ ໃຫ້
ປະກາສວ່າ

ໂຄຍທີ່ເປັນການສົມຄວາໃຫ້ມີກຸ່ມໝາຍວ່າດ້ວຍນາມຫາວິທາລັບເທິ. ປ.ຮ. ໂດຍພຣະຈອນເກລ້າທີ່
ຈຶ່ງທຽງພຣະກຸ່ມາໄປປຣເກລ້າ ១ ໃຫ້ຕາພຣະຈານບັນຍຸດື່ນໄວ້ໂດຍຄໍາແນະນຳແລະຍືນຍອນຂອງຮູ້ສົກາ
ດັ່ງຕໍ່ໄປນີ້

ມາຕາຮ ១ ພຣະຈານບັນຍຸດື່ນເຮັດວຽກວ່າ “ພຣະຈານບັນຍຸດື່ນຫາວິທາລັບເທິ. ປ.ຮ. ໂດຍພຣະຈອນເກລ້າທີ່
ພ.ສ. ២៥៥១”

ມາຕາຮ ២ ພຣະຈານບັນຍຸດື່ນໃຫ້ໃຫ້ນັ້ນກັບຕັ້ງແຕ່ວັນດັດຈາກວັນປະກາສໃນຮາຍກິຈຈານແນກໝາ
ເປັນຕັ້ນໄປ

ມາຕາຮ ៣ ໃຫ້ຍົກເລີກພຣະຈານບັນຍຸດື່ນສັບຕັ້ງແຕ່ວັນດັດຈາກວັນປະກາສໃນຮາຍກິຈຈານແນກໝາ
ສັບຕັ້ງແຕ່ວັນດັດຈາກວັນປະກາສໃນຮາຍກິຈຈານແນກໝາ ແລະສັບຕັ້ງແຕ່ວັນດັດຈາກວັນປະກາສໃນຮາຍກິຈຈານແນກໝາ
ເພາະທີ່ເກີ່ມກັບສັບຕັ້ງແຕ່ວັນດັດຈາກວັນປະກາສໃນຮາຍກິຈຈານແນກໝາ ພ.ສ. ២៥៥៨
ເພາະທີ່ເກີ່ມກັບສັບຕັ້ງແຕ່ວັນດັດຈາກວັນປະກາສໃນຮາຍກິຈຈານແນກໝາ

ນຽມດາບທກ່າວ່າ ກຸ່ມ ແລະຂ້ອນນັ້ນມີບັນຍຸດື່ນໄວ້ແລ້ວໃນພຣະຈານບັນຍຸດື່ນ ທີ່ກີ່ມີ
ຫັດຫຼືກີ່ມີແບ່ງກັບນັກແໜ່ງພຣະຈານບັນຍຸດື່ນ ໃຫ້ໃຫ້ພຣະຈານບັນຍຸດື່ນແກ່ ວິ່ນຍອງສຳເນາຖິກຕ້ອງ

clm v

ທິນສ. ອົງ

(ນາງສາວຜ່ອງສົງເວສາວັນ) ແລະ/ຫຼື (ນາຍນັ້ນທິດ ຄຳກຸ່ມາ)

มาตรา ๔ ให้สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีตามพระราชบัญญัติสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ พ.ศ. ๒๕๒๙ เป็นมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีตามพระราชบัญญัตินี้ มีฐานะเป็นมหาวิทยาลัยของรัฐที่ไม่เป็นส่วนราชการ แต่อยู่ในกำกับคุณແลงของรัฐบาล และเป็นนิติบุคคล

มาตรา ๕ ในพระราชบัญญัตินี้

“มหาวิทยาลัย” หมายความว่า มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

“สภามหาวิทยาลัย” หมายความว่า สภามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

“สภาวิชาการ” หมายความว่า สภาวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

“สภากณาจารย์และพนักงาน” หมายความว่า สภากณาจารย์และพนักงานมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

“รัฐมนตรี” หมายความว่า รัฐมนตรีรัฐสภาฯ ตามพระราชบัญญัตินี้

มาตรา ๖ ให้รัฐมนตรีว่าการทบทวนมหาวิทยาลัยรัฐฯ ตามพระราชบัญญัตินี้

หมวด ๑

บททั่วไป

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

มาตรา ๘ มหาวิทยาลัยอาจแบ่งส่วนงาน ดังนี้

(๑) สำนักงานอธิการบดี

(๒) คณบดี

(๓) สถาบัน

(๔) สำนัก

มหาวิทยาลัยอาจให้มีส่วนงานที่เรียกชื่ออย่างอื่นที่มีฐานะเทียบเท่าคณบดี เพื่อดำเนินการตามวัตถุประสงค์ในมาตรา ๙ เป็นส่วนงานในมหาวิทยาลัยอีกด้วย

สำนักงานอธิการบดีอาจแบ่งส่วนงานเป็นกอง หรือส่วนงานที่เรียกชื่ออย่างอื่นที่มีฐานะเทียบเท่ากอง รับรองสำเนาถูกต้อง

.....

.....

(นางสาวผ่องศรี เวสารัช) และ/หรือ (นายบันทิต คำภูษา)



ອុប្បត្តិប្រវត្តិទេរទា
ការណ៍លើកប្រព័ន្ធស
ប្រព័ន្ធរិនទានទា
សំណាក់កំពង់
(ការទរាវារយោបុរាណ ិទិពិនិមាត)
រូបាយការណ៍សារការងារកុំស្នូលការិង

(ศาสตราจารย์สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ)
ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย



ประกาศคณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เรื่อง แต่งตั้งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ตามที่ ศาสตราจารย์ นิรันดร์ พธุธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย จึงสำเร็จให้เงินงบประมาณดำเนินการในวันที่ ๙ พฤษภาคม ๒๕๖๐ นั้น

สำหรับ ออกตามความในมาตรา ๑๔(๓) แห่งพระราชบัญญัติของทุนสนับสนุนการวิจัย
พศ ๒๕๓๕ คณะกรรมการนี้ยกกองทุนสนับสนุนการวิจัยได้พิจารณาผลการสรรหาผู้สมควรดำรง
ตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในวาระต่อไปเป็นการประชุมนัดพิเศษเมื่อวันที่ ๒๘
มิถุนายน ๒๕๖๐ และได้มีมติให้แต่งตั้ง ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ดำรงตำแหน่ง^{ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ต่ออีกภาระหนึ่ง โดยให้อยู่ในตำแหน่งเป็นเวลาสี่ปี}
นับตั้งแต่วันที่ ๙ พฤษภาคม ๒๕๖๐ เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๕ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๐

(ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นายแพทย์ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์)

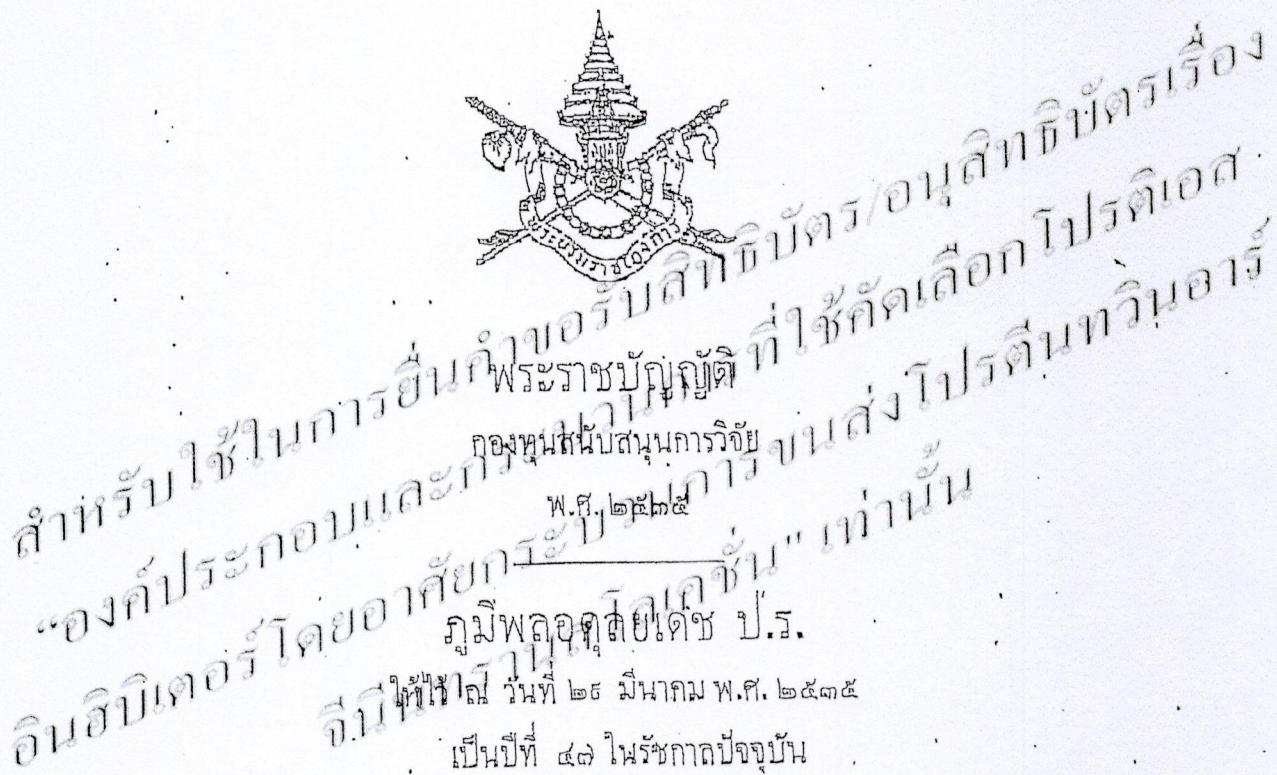
ประชานกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำเนาถูกต้อง

1

(ศาสตราจารย์สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ)

ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย



นายวรรณี เดชสุวรรณ
เจ้าหน้าที่ทรัพย์สินทางปัญญา

“ កណ្ឌករនករាលីបាយ ” អនុម័តការណ៍វា កណ្ឌករមករាលីបាយកន្លែងទុនដែន្ម

“สำนักงาน” หมายความว่า สำนักงานของหน่วยนั้นบังคับบัญชา ไว้ ไว้ ไว้

“ຜູ້ອໍານວຍການ” ມາຍຄວາມໜ້າ ຜູ້ອໍານວຍການສໍາເໜີສາມາດອ່ານໄດ້ ແລ້ວນ້າເສັນຄວາມຝັ້ງ

มาตรา ๔ ให้ขัดตั้งกองทุนนักเรียนทุนนั้นเรียกว่า “กองทุนสนับสนุนคุณวิชา” ประกอบด้วยเงินและทรัพย์ดุจตามมาตรา ๕ เพื่อเป็นทุนหมุนเวียนและช่วยในการสนับสนุนการวิจัยอย่างต่อเนื่อง กรรมมีประสีทธิภาพในด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี ศิลปกรรมศาสตร์ มนุษยศาสตร์ การจัดการ นโยบายและภารกิจชุดที่ต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเศรษฐกิจ สังคม และวิชาการของประเทศไทย

ให้กองทัพเป็นนิติบุคคล มีอัตลักษณ์ที่เพื่อดำเนินกิจการสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยตาม
พระราชบัญญัตินี้ และให้มีอำนาจกระทำการใด ๆ ที่จำเป็นหรือต้องเนื่องเพื่อบรรดูวัตถุประสงค์ทั้งกล่าว
นี้ได้ แต่จะต้องไม่ดำเนินการวิจัยของ

ให้กองทุนมีสำนักงานใหญ่ในกรุงเทพมหานครเรียกว่า “สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย” โดยที่เป็นหน่วยงานในกำกับของสำนักนายกรัฐมนตรี มีระบบการบริหารงานที่แตกต่างจากระบบราชการเพื่อให้เกิดความคล่องตัวภายใต้แนวโน้มของคณะกรรมการนโยบาย

มาตรา ๕ เมื่อได้ทราบพยานยื่นของกองทุนประกันด้วย

(๑) เมืองที่รับน้ำจากแม่น้ำแม่กลอง

(๖). เมื่อนัดหมายนัดจากต่างประเทศคราวที่สองคงกระชับหัวใจประเทศ

(๑) เนินหรือทรายดินที่มีผืนอบให้เพื่อสมทานก่อทำ

(๔) ดอกผลหรือรายได้ของกองทุน รวมทั้งผลประโยชน์จากทรัพย์สินทางปัญญาและผลประโยชน์อื่น ๆ ที่เกิดจากการวิจัย

ให้โอนเงินงบประมาณกองทุนสนับสนุนการวิจัยตามมาตรา ๒๖ (๒) แห่งพระราชบัญญัติ
งบประมาณรายจ่ายประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๓๕ จำนวนหนึ่งพันสองร้อยล้านบาทมาเป็นเงิน
ของกองทุนสนับสนุนการวิจัย

มาตรา ๖ การใช้ป้ายเงินคองทุนให้เป็นไปตามที่คณะกรรมการการนโยบายและแผนโดยใช้เพื่อกิจการดังต่อไปนี้

Mr. Longfellow

หนังสือมอบอำนาจ

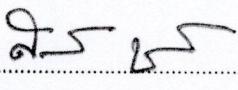
เขียนที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
วันที่ 4 เมษายน 2561

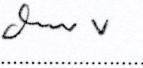
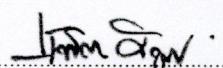
โดยหนังสือฉบับนี้ ข้าพเจ้า

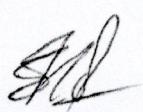
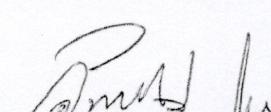
- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยนายศักกินทร์ ภูมิรัตน ตำแหน่ง อธิการบดี อยู่ที่ 126 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดยนายสุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตั้งอยู่ที่ชั้น 14 อาคารอโศกเมืองทาวเรอร์ เลขที่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

ขอแต่งตั้งและมอบอำนาจให้ นางสาวผ่องศรี เวสารัช ตัวแทนสิทธิบัตรเลขที่ 1745 และ/หรือ นายบันพิติ คำภูษา ตัวแทนสิทธิบัตรเลขที่ 2523 เป็นตัวแทนยื่นเที่ยวเรื่อง โดยร่วมกันและแยกกันในนามของข้าพเจ้าที่จะยื่นคำขอรับสิทธิบัตร หรือ อนุสิทธิบัตรภายใต้ข้อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ว่า “องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรดิเอสอินชิปเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขั้นส่งโปรดีนทิวินอาร์จีนีนทรานสโลเดชั่น” จดทะเบียน แก้ไข เปลี่ยนแปลงในส่วนที่เกี่ยวข้อง ถอนคำขอรับสิทธิบัตรยื่นคำตัดค้านจดทะเบียนสิทธิบัตร หรือยื่นคำขอให้มีการพิจารณาสิทธิบัตรใดที่คล้ายหรือขัดกับคำขอดังกล่าว ให้มีอำนาจลงนาม และยื่นเอกสารหรือข้อความใดๆ ในนามของผู้มอบอำนาจ ซึ่งตัวแทนในฐานะดังกล่าวข้างต้น เห็นว่าจำเป็น หรือเหมาะสมเปลี่ยนแปลงและแก้ไขเอกสารดังกล่าว

เพื่อเป็นหลักฐานแห่งการนี้ข้าพเจ้าได้ลงลายมือชื่อ และประทับตราไว้เป็นสำคัญ (ถ้ามี)

ลงชื่อ  ผู้มอบอำนาจ ลงชื่อ  ผู้มอบอำนาจ
(นายศักกินทร์ ภูมิรัตน) (นายสุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ)

ลงชื่อ  ผู้รับมอบอำนาจ ลงชื่อ  ผู้รับมอบอำนาจ
(นางสาวผ่องศรี เวสารัช) (นายบันพิติ คำภูษา)

ลงชื่อ  พยาน ลงชื่อ  พยาน
(นายสุวิทย์ แซ่เตีย) (นางสาวจันทร์สม โภมเวียน)

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

องค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีอสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขยับโปรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชันพาราเวย์

5 สาขาวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีอสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขยับโปรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชันพาราเวย์ (twin-arginine translocation pathway หรือ Tat pathway) ในการตัดแต่งพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพในการคัดเลือกโปรตีอสอินอิบิเตอร์ที่ใช้ยับยั้งโปรตีอสที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ

10 ภูมิหลังของศิลปะหรือวิชาการที่เกี่ยวข้อง

โปรตีอสคือเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์และถูกนับว่าเป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับการพัฒนารักษาโรคชนิดหนึ่ง สำหรับมนุษย์นั้น มีการค้นพบแล้วว่ามีจำนวนโปรตีอสอย่างน้อย 679 เอนไซม์ (Drag, M. and Salvesen, G.S., 2010) และนอกจากโปรตีอสของมนุษย์แล้ว โปรตีอสของเชื้อโรคต่างๆ ก็นับเป็นเป้าหมายของการผลิตยาอีกด้วย โปรตีอสอินอิบิเตอร์เป็นโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่ปัจจุบันถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในทางการรักษา ยกตัวอย่างเช่น โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension), โรคเอดส์ (HIV/AIDS), โรคมะเร็ง (Cancer) และโรคเบาหวาน (Diabetes) เป็นต้น (Drag, M. and Salvesen, G.S., 2010) โปรตีอสอินอิบิเตอร์ที่เคยถูกผลิตและได้รับการจดสิทธิบัตรแล้วคือ โปรตีอสอินอิบิเตอร์ของไวรัสเอชไอวีในประเทศไทยนั้นก็มีเช่นเดียวกัน เช่น การผลิตโปรตีอสอินอิบิเตอร์ที่จำเพาะกับเมทริกซ์โปรตีน p17 ของไวรัสเอชไอวี (Kitidee, K., Nangola, S., Gonzalez, G., Boulanger, P., Tayapiwatana, C., & Hong, S. S., 2010) ซึ่งในงานวิจัยของผู้ประดิษฐ์นี้ได้นำโปรตีอสอินอิบิเตอร์ตัวดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัยอีกด้วย

วิธีการดังเดิมที่ใช้ในการคัดเลือกโปรตีอสอินอิบิเตอร์อาศัยการโคลนนิ่งและผลิตโปรตีนที่สันใจทั้งด้วยวิธีใช้เซลล์และนำมาทำให้บริสุทธิ์ก่อนหรือวิธีไม่ใช้เซลล์ (cell-free expression) แล้วจึงนำโปรตีนที่ได้มาคัดเลือกด้วยระบบการทดสอบทางอินวิทอเรียล (in vitro assay system) เพื่อวัดค่าแยกตัวตัวของเอนไซม์ เทคนิคส่วนใหญ่ที่ได้รับการพัฒนานั้น อาศัยการใช้เปปไทด์หรือสารเคมีสับสเตรทที่เมื่อถูกตัดด้วยโปรตีอสแล้วสามารถปลดปล่อยตัวรายงานผล (reporter) ที่เป็นสารที่เกิดสี (chromogenic) สารเรืองแสง (fluorogenic) หรือสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immunological activity) อย่างไรก็ได้ การทดสอบแบบ *E. coli* ก็มีข้อจำกัด เช่น ไม่สามารถทำการคัดเลือกได้ครั้งละจำนวนมาก ต้องมีขั้นตอนการผลิตและทำ

โปรตีนให้บริสุทธิ์ คุณสมบัติของโปรตีนอาจเปลี่ยนไปเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์เมื่อเทียบกับเมื่ออยู่ในเซลล์ สิ่งมีชีวิตจริงๆ ดังนั้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกโปรตีอีสอินชิบิเตอร์โดยเทคนิคทางอินวีโว (in vivo) หรือในสิ่งมีชีวิตขึ้นมา ตัวอย่างของเทคนิคทางอินวีโวที่ใช้ในการคัดเลือกโปรตีอีสอินชิบิเตอร์ที่ได้ยื่นขอ

จดสิทธิบัตรแล้วได้แก่ 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 คณผู้ประดิษฐ์ใช้โปรตีนแสดงผลหรือวิพาร์ตเตอร์โปรตีน (reporter protein) เป็นอะพอพอทิกโปรตีน (apoptotic protein) ที่มีโปรตีอีสคลีเวจไซต์ใส่ (insert) อยู่ภายในอะพอพอทิกโปรตีนคือ โปรตีนที่มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ดังนั้น จึงสามารถประเมินประสิทธิภาพของโปรตีอีสอินชิบิเตอร์ได้จากการเปรียบเทียบความอยู่รอดของเซลล์

10 เมื่อมีหรือไม่มีโปรตีอีสอินชิบิเตอร์อยู่ ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้อะพอพอทิกโปรตีนซึ่งคือโปรตีนที่เมื่อถูกผลิตในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) จะระตุนให้เซลล์ตาย เช่น Bax โปรตีน เมื่อไม่มีโปรตีอีสอินชิบิเตอร์ โปรตีอีสสามารถตัดได้ก็จะทำให้ Bax โปรตีนแยกออกเป็นสองส่วน ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ตามปกติ แต่เมื่อโปรตีอีสอินชิบิเตอร์ไปขัดขวางการตัด Bax โปรตีนก็จะไม่ถูกตัดทำให้สามารถระตุนให้เซลล์ตายได้ หรืออีกตัวอย่างคือ FADD (Fas associated via death domain) ซึ่งคือ อะเดปเตอร์โปรตีนซึ่งประกอบไปด้วย

15 ส่องโถเมน คือ DED และ DD โดยที่เซลล์ *E. coli* จะตายก็ต่อเมื่อ DD โดเมนถูกตัดและปลดปล่อยออกจาก FADD เมื่อโถนตัดออกเป็นสองส่วน ดังนั้น คลีเวจไซต์จึงถูกใส่ไปในบริเวณรอยเชื่อมต่อระหว่างส่องโถเมนนี้ เมื่อ FADD ถูกผลิตในเซลล์ *E. coli* ในขณะที่มีโปรตีอีสอินชิบิเตอร์อยู่ ก็จะทำให้ FADD ไม่โถนตัด ทำให้เซลล์อยู่รอดได้ ในขณะที่เมื่อไม่มีโปรตีอีสอินชิบิเตอร์ FADD โถนตัด ก็จะทำให้เซลล์ *E. coli* ตาย

สำหรับ WIPO Patent Application WO/2005/097818 นั้น คณผู้ประดิษฐ์ใช้วิธีผลิตรีคอม

20 บิแวนท์เอชไอวีโปรตีอีสและเอนจิเนียร์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่มีคลีเวจไซต์ใส่อยู่ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 131 ซึ่งเป็นบริเวณลุปของโปรตีนที่เมื่อมีโปรตีนสายสัมๆ จึงทำหน้าที่เป็นสับสเตรทของเอชไอวีโปรตีอีส เมื่อโปรตีอีสตัดโปรตีอีสสับสเตรทคือ เอนจิเนียร์เบต้ากาแลคโตซิเดสออก ณ ตำแหน่งที่โปรตีอีสคลีเวจไซต์อยู่ เอนจิเนียร์เบต้ากาแลคโตซิเดสก็จะไม่สามารถทำงานได้ คือไม่สามารถย่อยสาร *ortho*-nitrophenyl-D-galactopyranoside (ONPG) ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ เทคนิคการตรวจวัดแอคติวิตีของเบต้ากาแลคโตซิเดสอาศัยการย่อยสาร ONPG คือทำให้สับสเตรทเปลี่ยนจากที่ไม่มีสีเป็นมีสีฟ้า และสามารถตรวจวัดได้โดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยการทดลองนี้ถูกกระทำในไมโครเพลท 96 หลุมและแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสามารถถูกตรวจวัดได้โดยใช้เครื่องไมโครเพลทหรีดเดอร์

สำหรับ United States Patent Application 20080089862 นั้น คณผู้ประดิษฐ์ใช้เอนจิเนียร์เบต้ากาแลคโตซิเดสคล้ายกับ WIPO Patent Application WO/2005/097818 แต่ได้มีการใส่คลีเวจไซต์

30 ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 279-280 แทน รวมถึงเทคนิคนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับโรคไวรัสตับอักเสบซีแทน อย่างไรก็ตาม การประดิษฐ์ชิ้นนี้ได้กล่าวถึงว่า มีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มกระบวนการใบโอแพนนิ่ง

(biopanning) อย่างได้อย่างนึงก่อนการคัดเลือกจากไลบรารี (library) เพื่อทำให้จำนวนโคโนนีที่ต้องนำมาคัดเลือกมีจำนวนน้อยลงจนสามารถคัดเลือกได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเทคนิคนี้อาศัยเบต้ากาแลคโตซิเดสเป็นรีพอร์ตเตอร์โปรตีนซึ่งเป็นการใช้เทคนิคสกรีนนิ่ง (screening) ไม่ใช้เทคนิคเซเลคชัน (selection) ทำให้มีสามารถทำการคัดเลือกเป็นจำนวนมากๆ ได้ในคราวเดียว อนึ่งในทางจุลชีววิทยาเทคนิคการสกรีนนิ่งคือ การที่ต้องวิเคราะห์จำนวนโคโนนีทั้งหมดเพื่อค้นหาโคโนนีที่มีฟีโนไทป์ที่ต้องการ เช่น มีสีฟ้าเมื่อมีการผลิตเบต้ากาแลคโตซิเดสและถูกเพลทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ONPG ดังนั้น เมื่อเพลทเซลล์เป็นจำนวนมากๆ ในคราวเดียวกันก็จะทำให้สามารถมองเห็นโคโนนีเดียวที่มีสีฟ้าได้ยากขึ้น ในขณะที่เทคนิคเซเลคชันคือ การคัดเลือกโดยอาศัยความดื้อยาของโคโนนี ทำให้เป็นการคัดเลือกโดยอาศัยความอยู่รอดของโคโนนีเฉพาะเซลล์ที่ดื้อยาได้ทำให้สามารถทำการคัดเลือกเป็นจำนวนมากๆ ในคราวเดียวกันได้

10 โดยที่เทคนิคต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้น ก็มีความแตกต่างกันทั้งความไวต่อการตรวจวัด (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ (assay time) ค่าใช้จ่าย (cost) และความจำเป็นในการใช้อุปกรณ์ที่อาจมีราคาแพง ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ที่อาจลดค่าใช้จ่าย ที่ง่ายกว่า รวดเร็วกว่า รวมถึงสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากในแต่ละครั้งได้ (High Throughput Screening, HTS)

15 15 การประดิษฐ์นี้ คณะผู้ประดิษฐ์ ได้นำกระบวนการขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย *E. coli* ที่เรียกว่า แทฟพาราเวีย (Twin-arginine translocation (Tat) pathway) มาเป็นเครื่องมือทางชีวภาพเพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีอสอินซิบิเตอร์ กระบวนการแทฟพาราเวียนี้ได้มีคุณสมบัติที่มีลักษณะพิเศษ 3 อย่างคือ 1) กระบวนการควบคุมคุณภาพ (quality control mechanism) คือความสามารถของแทฟพาราเวียที่เลือกขนส่งเฉพาะโปรตีนที่สามารถละลายน้ำ (soluble protein) ได้จากไซโตพลาสซึมไปสู่เพอริพลาสซึมของ *E. coli* และจะไม่ขนส่งโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ 2) กระบวนการพิสูจน์อักขระ (proofreading mechanism) คือกระบวนการที่แทฟพาราเวียสามารถตรวจจับว่าโคแฟกเตอร์ได้ถูกใส่เข้าไปในโปรตีนคอมเพล็กซ์ก่อนที่จะขนส่งโปรตีนคอมเพล็กซ์นั้นออกไป 3) กระบวนการคนโนบกรถ (hitchhiker's mechanism) คือความสามารถในการขนส่งโปรตีนสองตัวขึ้นไปที่จับกันอยู่เป็นคอมเพล็กซ์ได้ โดยที่มีโปรตีนเพียงตัวเดียวเท่านั้นที่มีเปปไทด์สั้งสัญญาณ (signal peptide หรือ signal sequence) ที่จำเพาะกับแทฟพาราเวีย (Tat signal sequence, ssTat) ซึ่งเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่ทำหน้าที่สั่งสัญญาณให้แทฟพาราเวียทำการขนส่งโปรตีนนั้นๆ ไปสู่เพอริพลาสซึม จึงเปรียบได้ว่าโปรตีนที่ไม่มีเปปไทด์สั่งสัญญาณคนโนบกรถของโปรตีนที่มีเปปไทด์สั่งสัญญาณเพื่อการขนส่งออกไปนั้นเอง ลักษณะพิเศษของแทฟพาราเวียนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในงานหลากหลายประเภทที่ได้รับการจดสิทธิบัตรแล้วเช่นกัน เช่น จาก United States Patent Application 20080287315 หรือ US8987173B2 ลักษณะพิเศษในข้อที่ 1 ได้ถูกนำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีนที่ถูกพัฒนาให้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ตีขึ้น หรือที่เรียกว่า เทคนิค ISELATE (Intrabody Selection after Iat Export) โดยกระบวนการนี้จากสิทธิบัตรเดิมใช้ในการตรวจสอบและคัดเลือกแอนติบอดีที่ผลิตภายในไซโตพลาสซึม

20 25 30

(cytoplasm) ว่าถูกผลิตในรูปที่ทำงานได้และส่งออกไปยังเพอริพลาสซีม (periplasm) ของแบคทีเรีย *E. coli* ได้หรือไม่ เทคนิคนี้ทำการคัดเลือกโปรตีนที่ละลายน้ำได้โดยการให้แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตพิวชั่นโปรตีน (fusion protein) ที่ประกอบไปด้วย โปรตีนที่สนใจ (protein of interest, POI) อยู่ต่ำงกลางและมีเปปไทด์ ส่งสัญญาณของแทบทพารเวย์อยู่ที่ปลายเอ็น (N-terminus) และมีรีพอร์ตเตอร์โปรตีนเป็นเอนไซม์เบต้า-แลค 5 แรมเมส (β -lactamase) อยู่ที่ปลายซี (C-terminus) ไปพร้อมๆ กัน รีพอร์ตเตอร์โปรตีนจะทำให้เซลล์ สามารถทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้า-แลคแรมเมริงค์ (β -lactamase ring) ได้ เมื่อรีพอร์ตเตอร์โปรตีนถูกส่งไปยัง เพอริพลาสซีมท่านั้น และเนื่องจาก Quality control mechanism ของแทบทพารเวย์จะ อนุญาตให้โปรตีนที่ละลายน้ำได้เท่านั้นถูกส่งออกมาสู่เพอริพลาสซีมได้ ก็จะทำให้เซลล์ที่มีโปรตีนที่สนใจเป็น โปรตีนที่ละลายน้ำได้ถูกส่งออกไปยังเพอริพลาสซีมซึ่งเป็นบริเวณที่รีพอร์ตเตอร์โปรตีนสามารถทำให้เซลล์ทัน 10 ยาปฏิชีวนะชนิดที่ใช้ในการคัดเลือกได้ (อธิบายได้ดังรูปที่ 1) และจาก United States Patent 9150850 หรือ WO 2007024877A3 ลักษณะพิเศษในข้อที่ 3 ได้ถูกนำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีนสองตัวที่ จับกัน เช่น แอนติเจนและชิ้นส่วนของแอนติบอดีที่สามารถถูกผลิตไม่เพียงแต่ในรูปที่ละลายน้ำได้แต่ยัง สามารถทำงานได้อย่างถูกต้องอีกด้วย คือจับกับแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจงได้ หรือที่เรียกว่า เทคนิค FLI- 15 TRAP, Functional Ligand-binding Identification by Tat-based Recognition of Associating Proteins เทคนิคนี้อาศัยรีพอร์ตเตอร์คือ เบต้า-แลคแรมเมสอีกเช่นกัน ในเทคนิคนี้ มีการผลิตพิวชั่นโปรตีน สองชิ้น ชิ้นแรกประกอบไปด้วยเปปไทด์ส่งสัญญาณของแทบทพารเวย์อยู่ที่ปลายเอ็น และตามด้วยโปรตีนที่ สนใจตัวที่หนึ่งที่ปลายซี อีกชิ้นประกอบไปด้วยโปรตีนที่สนใจตัวที่สองที่ปลายเอ็นและรีพอร์ตเตอร์ที่ปลายซี 20 เมื่อโปรตีนตัวที่หนึ่งและตัวที่สองจับกัน จะเกิดการรวมตัวเป็นคอมเพล็กซ์ ทำให้โปรตีนทั้งก้อนถูกส่งออกไปยัง เพอริพลาสซีม ทำให้เซลล์ทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้า-แลคแรมเมริงค์ได้ (อธิบายได้ดังรูปที่ 2)

20 ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอการออกแบบระบบอันประกอบไปด้วย องค์ประกอบและ กระบวนการที่ใช้สำหรับคัดเลือกโปรตีโนสินธิบิเตอร์ เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีโนสที่เป็น สาเหตุของโรคบางชนิดหรือที่เป็นส่วนสำคัญต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยใช้การทดสอบแบบอินวิโวใน เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยองค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้ความสามารถนำไปคัดเลือกและวิเคราะห์ 25 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโปรตีโนสินธิบิเตอร์ได้ นำไปคัดเลือกและวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพ การตัดของสับสเตรทที่ถูกทำให้เกิดการกลایพันธุ์ต่างๆ โดยโปรตีโนส หรือการตัดสับสเตรทตั้งแบบโดยโปรตี โนสที่ถูกทำให้กลایพันธุ์ รวมถึงการนำไปใช้ในการคัดเลือกยาใหม่ๆ (drug screening) ได้ด้วยเช่นกัน เทคนิค นี้มีชื่อว่า Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering หรือ เรียกสั้นๆ ได้ว่า PROTECT

30 เทคนิคนี้สามารถทำได้โดยการให้แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตโปรตีโนส โปรตีโนสินธิบิเตอร์ และพิวชั่น โปรตีน (fusion protein) ที่ประกอบไปด้วย สับสเตรทอยู่ต่ำงกลางและมีเปปไทด์ส่งสัญญาณของแทบทพารเวย์ อยู่ที่ปลายเอ็น (N-terminus) และมีรีพอร์ตเตอร์โปรตีนเป็นเอนไซม์เบต้า-แลคแรมเมส (β -lactamase) อยู่ที่

ปลายซี (C-terminus) ไปพร้อมๆ กัน รีพอร์ตเตอร์โปรตีนจะทำให้เซลล์สามารถทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์ (β -lactamase ring) ได้เมื่อรีพอร์ตเตอร์โปรตีนถูกขนส่งไปยังเพอริพลาสซีมเท่านั้น เพราะยาปฏิชีวนะชนิดนี้ สามารถผ่านเข้าเซลล์และไปอยู่ในเพอริพลาสซีมได้เท่านั้น ไม่สามารถผ่านไปยังส่วนไซโตพลาสซีมได้ ดังนั้นเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมสเจ็งไม่สามารถทำให้เซลล์ทนยาได้ขณะที่อยู่ในไซโตพลาสซีม

5 ในขณะที่เปปไทด์ส่งสัญญาณของแทบทพารเวย์คือ ตัวส่งสัญญาณให้แทบทพารเวย์ทำหน้าที่ขันส่งพิวชั่นโปรตีนออกไปยังเพอริพลาสซีม ดังนั้นการออกแบบพิวชั่นโปรตีนในลักษณะนี้ ก่อให้เกิดความเชื่อมโยงทางกายภาพระหว่างการตัดของโปรตีอีสหรืออีกนัยหนึ่งคือการยับยั้งการตัดของโปรตีอีสอินซิบิเตอร์กับความสามารถในการทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์นั้นเอง (อธิบายได้ดังรูปที่ 3) โดยที่ตัวอย่างของยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์คือ แอมพิซิลลิน และ คาร์เบนซิลลิน

10

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

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

รูปที่ 2 แสดงภาพการจับกันของโปรตีนที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณและไม่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณกับกระบวนการขันส่งโปรตีนในแบคทีเรีย *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.

รูปที่ 3 แสดงหลักการการทำงานของโปรตีอีสอินซิบิเตอร์ของสิ่งประดิษฐ์ทางชั้ยมือคือสามารถทำงานได้และทางขาวมือคือไม่สามารถทำงานเพื่อป้องคุกไว้ใช้ตัวของพิวชั่นโปรตีนได้

20 รูปที่ 4 แสดงองค์ประกอบของพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวขันส่งยืนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* a. พลาสมิด pDD18 แสดงองค์ประกอบสำคัญทั้ง 3 ของสิ่งประดิษฐ์, b. พลาสมิด pDD322 แสดงโปรตีน TatABC ที่ช่วยในการขันส่งโปรตีนจากไซโตพลาสซีมไปยังเพอริพลาสซีม

รูปที่ 5 แสดงการออกแบบพลาสมิดในงานประดิษฐ์ซึ่งมี 2 รูปแบบ a คือ ไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Tricistronic vector) และ b คือ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Bicistronic vector) ทั้งสองแบบอาศัยการ

25 แสดงออกร่วมกับ พลาสมิด pDD322 เช่นกัน

รูปที่ 6 แสดงผลการทดลองด้วยวิธีเวสเทรนบล็อทเพื่อตรวจสอบการผลิตและการทำงานขององค์ประกอบทั้ง 3 ส่วนของระบบงานประดิษฐ์ โดย a คือผลการทดลองที่ตรวจสอบหาพิวชั่นโปรตีน (ssTorA::p17 Δ p24:: β -lactamase), b คือ ผลการทดลองที่ตรวจสอบหาโปรตีอีสอินซิบิเตอร์ (scFvp17 WT)

รูปที่ 7 แสดงผลการทดลองด้วยวิธีสปอตเพลทของ 1.) ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ของระบบไตรซิสทรอนิก 2.) ชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ของระบบไตรซิสทรอนิก 3.) ระบบไตรซิสทรอนิก (WT) 4.) ระบบไบซิสทรอนิก (WT) และ 5.) ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ของระบบไบซิสทรอนิก ที่ อุณหภูมิ 30°C ที่ความเข้มข้นของคาร์เบนิซิลิน 0, 25, 50, 100, 200 และ 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ โดยรูป a คือ 0.1% อะราบิโนส, b คือ 0.2% อะราบิโนส, c คือ 0.5% อะราบิโนส และ d และ e คือตัวแทนกราฟที่แสดงผลการเจริญของหั้ง 5 ชุดทดลองด้วยวิธีสปอตเพลทโดยคัดเลือกมาจากคอนดิชั่นที่ดีที่สุดซึ่งก็คือเมื่อมีการกระตุนด้วย 0.5% อะราบิโนส (7c) จะแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองที่สนใจและชุดควบคุมเชิงลบได้มากที่สุด โดยเป็นการแสดงผลของระบบไตรซิสทรอนิก

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้ได้เปิดเผย ก. องค์ประกอบ ซึ่งในการประดิษฐ์นี้ได้ออกแบบและตัดแต่งพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) ให้ผลิตโปรตีนที่องค์ประกอบสำคัญ 3 ประการ เพื่อให้ทำงานในไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีสภาวะรีดิวซ์ โดยที่โปรตีนทั้ง 3 จะถูกผลิตออกมายอกกันเป็นส่วนๆ เพื่อทำงานที่ของตัวเอง ซึ่งคือ (1) โปรตีอีสอินซิบิเตอร์ (protease inhibitor) ซึ่งทำงานที่ในการปกป้องคลิเวจไซต์ของสับสเตรทจากการตัดของโปรตีอีส ส่วนที่ (2) หรือ พิวชั่นโปรตีน (fusion protein) ซึ่งมีองค์ประกอบย่อยอีก 3 ส่วนคือ โปรตีนหรือเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal sequence) ที่จำเพาะกับแทพพาธเวย (ssTat), สับสเตรท และโปรตีนบ่งชี้หรือรีพอร์ตเตอร์โปรตีน (reporter protein) ในตัวอย่างนี้ รีพอร์ตเตอร์โปรตีนที่ถูกเลือกใช้คือ β -lactamase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดยาปฏิชีวนะจำพวก β -lactam ring ทำให้เซลล์สามารถทนยาปฏิชีวนะที่มีเบต้าแลคแทมริงค์ (β -lactam ring) เช่น แอมพิซิลลิน หรือคาร์เบนิซิลลินได้ สาเหตุที่เลือกเบต้าแลคแทมเมสเพาะเป็นโปรตีนโมเลกุลเดียวที่มีขนาดค่อนข้างเล็กและยังสามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติ เมื่อนำไปเข้ามต่อกับโปรตีนอื่นๆ (Moore et al., *Anal Biochem* 247, 203-209, 1997) และสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้เมื่อยูในเพอริพลาสซึมเท่านั้น องค์ประกอบย่อยในพิวชั่นโปรตีนทั้งสาม จะถูกแสดงออกโดยการเข้ามต่อกันเป็นโมเลกุลเดียวเป็นพิวชั่นโปรตีนดังต่อไปนี้ ssTat::substrate:: β -lactamase และ (3) โปรตีอีส ทำงานที่คล้ายกรรไกร ทำงานที่ในการตัดบริเวณคลิเวจไซต์ของพิวชั่นโปรตีนบนสับสเตรท และ ข. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโปรตีอีสอินซิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโปรตีนทวินอาร์จีนีน ทรานส์โลเคชั่น (twin-arginine translocation หรือ Tat) พาธเวย เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพในการคัดเลือกโปรตีอีสอินซิบิเตอร์ที่ใช้ปกป้องการตัดของโปรตีอีส ไม่ว่าจะด้วยวิธีการปกป้องที่บริเวณบริเวณคลิเวจไซต์ของสับสเตรททำให้โปรตีอีสไม่สามารถเข้าถึงได้ หรือที่ทำการจับกับโปรตีอีสและยับยั้งการทำงานของโปรตีอีส โดยที่กระบวนการนี้ประกอบไปด้วยขั้นตอนหลัก 3 ประการดังนี้ (1) การออกแบบการใส่ยีนที่จำเป็นในระบบเข้าพลาสมิดเพื่อให้ได้องค์ประกอบดังกล่าวข้างต้น (2) การวิเคราะห์คอนดิชั่นเพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือกโปรตีอีสอินซิบิเตอร์ และ (3) การคัดเลือกโปรตีอีสอินซิบิเตอร์จากไลบรารี ซึ่งรายละเอียดของกระบวนการจะถูกอธิบายเพิ่มเติมในส่วนของการทดลอง

งานประดิษฐ์ชิ้นนี้มีการนำกระบวนการแพทยาระบบทามาประยุกต์ใช้ กล่าวได้คือ ในทางธรรมชาติภายในเซลล์แบคทีเรียจะมีกระบวนการขนส่งและเป้าหมายจำเพาะสำหรับการขนส่งโปรตีนที่ผลิตได้ในไซโตพลาสซึมไปยังจุดหมายต่างๆ หลักหล่ายกระบวนการ ซึ่งหนึ่งกระบวนการที่จะกล่าวถึงและเกี่ยวข้องกับงานประดิษฐ์ คือ กระบวนการขนส่งโปรตีน Twin-arginine translocation (Tat) pathway ซึ่งเคยกล่าวมาแล้ว 5 ข้างต้น กระบวนการขนส่งแพทยาระบทยังมีความสามารถในการขนส่งโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยกระบวนการขนส่งแพทยาระบทยังคงประกอบขึ้นด้วยโปรตีนในกลุ่ม TatABC (Berks, Mol Microbiol 22, 393-404,1996; Settles et al., Science 278, 1467-1470,1997; Weiner et al., Cell 93, 93-101,1998) และในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้แพทยาระบย โดยนำความสามารถเฉพาะตัวของแพทยาระบยที่แสดงให้เห็นถึงกระบวนการควบคุมคุณภาพของกระบวนการขนส่งโปรตีนในแบคทีเรีย 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 งานวิจัยที่คิดค้นเพื่อใช้แพทยาระบยเป็น แพลตฟอร์มพื้นฐานในการศึกษาและคัดเลือกความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction) ของโรคต่างๆ ดังต่อไปนี้ อัลไซเมอร์, พาร์กินสัน, โรคอัณฑิตตัน และโรคทางสมองอื่นๆ ที่เกี่ยวเนื่องกับโปรตีนที่ 15 ไม่พับม้วน หรือในบางงานวิจัยที่ใช้แพทยาระบย เพื่อเป็นเครื่องมือที่ส่งเสริม และ/หรือ ยับยั้งความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของหัวใจโปรตีนที่พับม้วนและโปรตีนที่ไม่พับม้วนในเซลล์สิ่งมีชีวิต นอกจากนั้นยังมีการประยุกต์ใช้แพทยาระบยเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในหลักหล่ายด้าน เช่น ใช้แพทยาระบยเป็นวิธีในการช่วย วิเคราะห์และปรับปรุงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเพื่อให้เกิดการส่งเสริมหรือยับยั้งซึ่งกันและกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มงานวิจัยที่ใช้เพื่อคัดเลือกยา หรือ สามารถใช้แพทยาระบยในการตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่าง 20 โปรตีนในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้โดยตรง ซึ่งคือใช้เป็นวิธีในการค้นหายาและเป้าหมายของยา (drug target) ได้โดยตรง และภายใต้การประดิษฐ์นี้จะกล่าวถึงการนำแพทยาระบยมาประยุกต์ใช้เป็นเทคโนโลยีเพื่อใช้หา ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการตัดของโปรตีอีสต์ด้วยโปรตีอีสอินซิบิเตอร์ ในปัจจุบันมีรายงานว่ามีโปรตีอีสอินซิบิเตอร์กว่า 150 ชนิดที่อยู่ในระหว่างการพัฒนาทางคลินิกหรือถูกนำมาใช้ในทางคลินิกหรือการรักษา แล้ว โดยหนึ่งในสามของโปรตีอีสอินซิบิเตอร์นั้นนำมาใช้สำหรับโรคหัวใจและหลอดเลือด ส่วนที่เหลือมีการพัฒนาเพื่อนำไปใช้กับโรคอื่นๆ ได้อย่างหลักหล่าย อันได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง, โรคเบาหวาน, โรคอัลไซเมอร์, การติดเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV/AIDS), โรคมะเร็ง, โรคที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวผิดปกติของเลือด (coagulation) และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี (Insight Pharma Reports Protease inhibitors: Innovations drive drug pipeline; Drag, M. and Salvesen, G.S., 2010)

นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับงานประดิษฐ์ของผู้ประดิษฐ์ คือ การใช้แพทยาระบยของ 30 แบคทีเรีย *E. coli* ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนภายในเซลล์ (*in vivo* testing) ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีนที่สนใจ (ตัวอย่างเช่น โปรตีน หรือเปปไทด์สายสั้นจำพวกแอนติเจน) ที่มีเปปไทด์สั่งสัญญาณ จำเพาะของแพทยาระบย (เช่น ssTorA) และโปรตีนบังชี้ (โปรตีนบังชี้จำพวกต่อต้านยาปฏิชีวนะ เช่น β -

lactamase อันเนื่องมาจากโปรตีนนี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้โดยเชื่อมโยงกับการเจริญของแบคทีเรียบนจานอาหารที่มีปีบปฏิชีวนะจำพวก คาร์บениซิลลิน และ แอมพิซิลลิน) และในบางงานวิจัยสามารถใช้แทบทพารเวย์ในการขันส่งโปรตีนที่อยู่ในรูปการจับกันของสองโมเลกุล (heterodimeric complex) จากไซโตพลาสซึมไปยังเพอริพลาสซึมในเซลล์เจ้าบ้าน ในการคัดเลือกหรือระบุหาลักษณะจำเพาะของโปรตีนที่สนใจ (เช่น ลำดับทางชีวภาพ) ซึ่งการคัดเลือกดังกล่าวจะสังเกตได้จากการเจริญของเซลล์เจ้าบ้านในสภาพแวดล้อมที่กำหนด (เช่น จำนวนอาหารที่บรรจุยาปฏิชีวนะ)

ในส่วนของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการประดิษฐ์นี้ คือ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และ MC4100 แต่การประดิษฐ์นี้ไม่ได้จำกัดเฉพาะเพียงแต่สองสายพันธุ์ที่กล่าวมาแล้วเท่านั้น แต่ยังครอบคลุมถึงแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีระบบแทบทพารเวย์ด้วย เพราะในความเป็นจริงแล้วแบคทีเรียชนิดใดหรือสายพันธุ์ใดก็ตามที่มีระบบการขันส่งแทบทพารเวย์ถือว่าสามารถใช้ในการคัดเลือกได้ แบคทีเรียเจ้าบ้านเหล่านี้สามารถนำมาใช้งานแทนที่ *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ที่กล่าวไว้ข้างต้นได้ เช่น *E. coli* K12 และอนุพันธ์, *E. coli* B และอนุพันธ์, *E. coli* X 1776 หรือ W3110 (เช่น F-, λ-, หรือ prototrophic), *E. coli* MC4100 และอนุพันธ์ (ตัวอย่างเช่น BOD, B1LK0, DADE, JARV16, *E. coli* LE392 และ RR1); แบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส (bacilli) ตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis*, กลุ่มเอ็นเทอโรแบคทีเรีย (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* จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้ทราบได้ว่า เนื่องจาก สิ่งประดิษฐ์ที่ผู้ประดิษฐ์ได้พัฒนาขึ้นอาศัยแทบทพารเวย์ที่มีระบบช่วยควบคุมและตรวจสอบคุณภาพของโปรตีน ดังที่กล่าวไว้แล้วในส่วนของภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง ทำให้มั่นใจได้ว่าโปรตีโอดีอินซิบิเตอร์ที่คัดเลือกได้จะต้องสามารถเป็นรูปแบบที่คล้ายนี้ได้และสามารถทำงานได้คือ ยับยั้งการทำงานของโปรตีโอดีอินซิบิเตอร์ได้อีกด้วย

ผู้ประดิษฐ์ได้ใช้ระบบที่เกี่ยวข้องกับ เอชไอวี-1 โปรตีโอดีอินซิบิเตอร์เป็นหลักฐานของแนวคิด (proof of concept) นี้ ดังนั้นจะใช้ตัวอย่างนี้สำหรับอธิบายรายละเอียดในส่วนของการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์ในที่นี้

สิ่งประดิษฐ์นี้เป็นสิ่งประดิษฐ์ที่เกิดจากการตัดแต่งพันธุกรรมของแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพในการคัดเลือกโปรตีโอดีอินซิบิเตอร์ (ในที่นี้ใช้อินทร่าเซลลูลาร์แอนติบอดี) ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันไวรัส ดังที่กล่าวไว้ใน section 2.2.2 ของรายงานนี้ จึงสามารถตัดขาด

เอนไซม์เอนไซวี-1 โปรตีอีส เนื่องด้วยในทางธรรมชาติของกระบวนการจำลองตัวของไวรัสจะมีช่วงของการตัดโปรตีนสายยาวของไวรัสและประกอบขึ้นเป็นไวรัสตัวใหม่ ช่วงกระบวนการดังกล่าววนไอนไซม์โปรตีอีสจะทำหน้าที่ในการตัดซับสเตรทเพื่อให้แบ่งออกเป็นสองโปรตีนย่อย ซึ่งคือ โปรตีนเมทริกซ์ (p17) และโปรตีนแคปซิด (p24) จากนั้นโปรตีนทั้งสองจะประกอบขึ้นเป็นไวรัสตัวใหม่ โดยแต่เดิมยาที่ใช้รักษาโรคเอดส์หรือยาต้าน

5 ไวรัสเอชไอวีที่วางขายอยู่ตามห้องตลาดนั้น จะมีจุดประสงค์ในการยับยั้งการทำงานของไวรัสคล้ายคลึงกันคือ ผลิตสารหนึ่งๆ ที่จำเพาะกับบริเวณร่องของเอนไซม์ที่มีความสำคัญกับไวรัสทั้งในกระบวนการการจำลองตัวหรือกระบวนการการเข้ามายึดเชลล์เจ้าบ้าน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านั้นถ้าเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วยจากจะจับอย่างจำเพาะกับเอนไซม์ของไวรัสแล้ว เออนไซม์หรือโปรตีนบางตัวของผู้ป่วยถ้ามีลักษณะของบริเวณร่องใกล้เคียงกับเอนไซม์ของไวรัส สารนั้นจะเข้าจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือโปรตีนเหล่านั้นซึ่งเกิดผลเสียต่อ

10 ร่างกายผู้ป่วยโดยตรง เรียกว่า off-target effect จากข้อเสียนี้ทางผู้ประดิษฐ์จึงมีแนวความคิดที่จะลดปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น โดยการปรับเปลี่ยนบริเวณที่จะยับยั้งจากบริเวณร่องของเอนไซม์มาเป็นบริเวณที่จะถูกตัดบนโปรตีนสายยาวของไวรัส (คลีเวจไซต์) แทน

รายละเอียดของหลักฐานของแนวคิดนี้สามารถขึ้นได้ดังนี้ งานประดิษฐ์ชิ้นนี้มีการออกแบบ 3 องค์ประกอบที่สำคัญ คือ

15 1) โปรตีอีสอินทริบอเดอร์ หรือ อินทราราเซลลูลาร์แอนติบอดี (intracellular antibody) โดยในงานประดิษฐ์นี้ใช้อินทราราเซลลูลาร์แอนติบอดีในรูปแบบของซิงเกิลเชนแวริเอเบิลแฟร์กเมนต์ (single-chain variable fragment, scFv) ที่จำเพาะต่อโปรตีนเอนไซวี-1 ชื่อ scFvp17

20 2) พิชั่นโปรตีนที่ใช้รายงานผลอันประกอบไปด้วย ชิ้นส่วนของโปรตีนของเอนไซวี-1 ในสิ่งประดิษฐ์นี้ได้เลือกบริเวณที่มีจุดตัดของเอนไซม์โปรตีอีสของเอนไซวี-1 หรือบริเวณโปรตีอีสคลีเวจไซต์รวมอยู่ในชิ้นส่วนด้วย และชิ้นส่วนโปรตีนที่เลือกมา คือ ส่วนของโปรตีนเมทริกซ์ (p17) และแคปซิด (p24) โดยที่ส่วนของแคปซิดได้คัดเลือกส่วนที่มีขนาดสั้นลง แต่มีรายงานก่อนหน้านี้แจ้งว่าสามารถถูกตัดได้เช่นกันเมื่อเทียบกับชิ้นส่วนที่สมบูรณ์เพื่อให้สามารถถูกผลิตได้ชิ้นไม่ใหญ่นักและง่ายต่อการผลิตใน *E. Coli* ชิ้นส่วนนี้จึงถูกเรียกว่า p17 Δ p24 และมีบริเวณจุดจำของกระบวนการขั้นส่งโปรตีนหรือเปลปีทีดส่งสัญญาณที่มาจากการตัดที่เป็นสับสเตรทของแทพพารเวย์ตามธรรมชาติชื่อ trimethylamine-N-oxide reductase (TorA signal sequence, ssTorA) ซึ่งถ้ากล่าวถึงเปลปีทีดส่งสัญญาณที่นำมาใช้ในงานประดิษฐ์ที่ต้องการตรวจสอบลักษณะจำเพาะหรือสังเกตความสามารถในการละลายน้ำหรือการพับม้วนตัวของโปรตีนที่สนใจหรือใช้ทดสอบความสามารถของสารหรือปัจจัยอื่นโดยใช้แทพพารเวย์ ไม่จำเป็นจะต้องใช้เปลปีทีดส่งสัญญาณเฉพาะตัว ssTorA ดังเช่นในงานประดิษฐ์นี้เท่านั้น ดังนั้น การประดิษฐ์นี้จึงยังครอบคลุมถึงการใช้เปลปีทีดจำเพาะของแทพพารเวย์ตัวอื่น เช่น CueO, DmsA, FdnG, FdoG, HyA, NapA, SufI, WcaM, YagT, YcbK, YcdB, 25 YdhX, and YnfE อีกด้วย และในด้านปลายเอ็น (N-terminus) และด้านปลายซี (C-terminus) เติมเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (Beta/β-lactamase) เพื่อใช้ในการย่อยยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเบต้า-แลคแทม เอียนอย่างย่อได้ว่า ssTorA::p17 Δ p24::β-lactamase ซึ่งในกรณีโปรตีนปัจจัยที่เช่นกัน การประดิษฐ์นี้ไม่มีการจำกัดการ

30

ใช้เพียงแต่ β -lactamase ดังในงานประดิษฐ์นี้เท่านั้น แต่ยังครอบคลุมถึงการใช้โปรตีนบ่งชี้ตัวอื่น 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 จะไม่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้เมื่อยูนิไซโตพลาสซีม ซึ่งก่อให้คือสามารถทำงานได้ก็ต่อเมื่อยูนิไซโตพลาสซีมเท่านั้น จึงหมายความว่ากับงานประดิษฐ์นี้เป็นอย่างมาก เนื่องจากผู้คิดค้นต้องการคัดเลือกโปรตีอีสอินซิบิเตอร์ที่สนใจ โดยอาศัยเครื่องมือช่วยคัดเลือกแทพพาระเวนในการขนส่งโปรตีนที่ถูกปกป้องโดยโปรตีอีสอินซิบิเตอร์จากไซโตพลาสซีมไปยังเพอริพลาสซีม และสังเกตการเจริญบนจานอาหารที่บรรจุยาปฏิชีวนะได้จากการทำงานของ β -lactamase นั้นเอง และ 3) โปรตีอีสของเอชไอวี-1 (HIV-1 protease) มีหน้าที่ตัดบริเวณคลิเวจไซต์ของชิ้นส่วนเมทริกซ์ (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) ที่ต้องการและส่งเข้าสู่ไซโตพลาสซีมของแบคทีเรีย *E. coli* ทำให้กล่าวได้ว่าผู้ประดิษฐ์มีการออกแบบ *E. coli* สังเคราะห์ (synthetic *E. coli*) เพื่อให้แบคทีเรีย *E. coli* สามารถผลิตโปรตีนทั้ง 3 ส่วนเพิ่มเติมจากการผลิตโปรตีนของแบคทีเรียในช่วงเวลาปกติ งานประดิษฐ์นี้มีการประยุกต์ใช้กระบวนการขนส่งโปรตีน (Tat-pathway) ที่มีอยู่ตามธรรมชาติเพื่อใช้ในการคัดเลือกโปรตีอีสอินซิบิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการยับยั้งการทำงาน (การตัด) ของโปรตีอีส โดยในตัวอย่างนี้ อินทราราเซลลูลาร์แอนติบอดี้ scFvp17 ได้ถูกพิสูจน์แล้วว่าสามารถจับได้กับส่วน

ปลายของ p17 และจากการทดลองของผู้ประดิษฐ์พบว่าสามารถไปขัดขวางการจับของโปรตีอสต์บริเวณคลีเวจไซต์ (ปักป้องคลีเวจไซต์) ของโปรตีนไวรัสເອົ້ວ-1 (p17Δp24) ได้

เมื่อมีการผลิตทั้ง 3 ชิ้นส่วนโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของสิ่งประดิษฐ์เกิดขึ้น ชิ้นส่วนทั้งสามจะต้องทำงานที่ของตนเองในรูปแบบที่แตกต่างกันออกไปทั้งการปักป้องและการตัด ขณะเกิดการปักป้องโปรตีอสอินซิบิเตอร์หรือ scFvp17 จะต้องเข้าจับอย่างจำเพาะกับบริเวณคลีเวจไซต์ของพิวชั่นโปรตีน เพื่อทำการปักป้องไม่ให้ถูกตัดจากกระบวนการของເອົ້ວโปรตีอส ซึ่งสิ่งที่เกิดขึ้นคือ โปรตีอสอินซิบิเตอร์จะเข้าจับอยู่บนพิวชั่นโปรตีนหมื่นกับการขอเดินทางไปด้วยกันหรือกระบวนการกรุนโบกรุณ (hitchhiker mechanism) อันเนื่องมาจากโปรตีอสอินซิบิเตอร์ไม่มีบริเวณจับจำเพาะกับกระบวนการส่งโปรตีน แต่พิวชั่นโปรตีนมีบริเวณดังกล่าวทำให้โปรตีนคอมเพล็กซ์นี้สามารถส่งออกไปยังบริเวณเพอริพลาสซึมของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ ซึ่งก็คือ งานประดิษฐ์นี้อาศัยหลักการการจับกันของโปรตีนสองชนิดที่มีและไม่มีบริเวณจำเพาะและเกิดการส่งออก หรือ FLI-TRAP (Functional Ligand-binding Identification by Tat-based Recognition of Associating Proteins) แต่ความต่างของงานประดิษฐ์นี้คือนำเทคโนโลยี PROTECT (Protease inhibitor Recognition based On Tat Export after Cleavage Tampering) นี้มาใช้ในการรายงานผลของการตัดของโปรตีอสและไม่ได้ใช้เพื่อหาโปรตีนสองชนิดที่สามารถจับกันได้ หลักการคือ ถ้าโปรตีอสอินซิบิเตอร์สามารถจับอย่างจำเพาะและปักป้องบริเวณคลีเวจไซต์ได้ พิวชั่นโปรตีนก็จะไม่ถูกตัดโดยເອົ້ວโปรตีอส ทำให้เบต้า-แลคแทคແທມເມສซิงเป็นรีพอร์ตเตอร์โปรตีนถูกส่งออกไปสู่เพอริพลาสซึมและทำให้เซลล์ทนยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลคแทคແທມได้ ถ้าโปรตีอสอินซิบิเตอร์ไม่สามารถปักป้องบริเวณคลีเวจไซต์ได้ พิวชั่นโปรตีนก็จะไม่ถูกตัดโดยເອົ້ວโปรตีอส ทำให้เบต้า-แลคแทคແທມເມສซิงเป็นรีพอร์ตเตอร์โปรตีนยังคงค้างอยู่ในไซโตพลาสซึมและทำให้เซลล์ทนยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลคแทคແທມไม่ได้ เซลล์จึงตายและไม่เกิดเป็นโคโนเนี้ยน ส่วนการผลิตพิวชั่นโปรตีนนั้น มีความคล้ายคลึงกับการออกแบบของ ISELATE technique (ISELATE: Intrabody Selection after Tat Export) ซึ่งมาจากอิกหนึ่งสิทธิบัตรที่ได้กล่าวถึงไปแล้ว แต่ข้อแตกต่างก็คือ ISELATE ใช้เพื่อคัดเลือกหรือพัฒนาให้โปรตีนที่ไม่สามารถพับม้วนให้อยู่ในรูปะลายน้ำได้ให้ถูกต้องเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้โดยการสร้างการกลายพันธุ์แล้วใช้เทคนิค ISELATE คัดเลือก ในขณะที่เทคนิค PROTECT นี้ใช้พิวชั่นโปรตีนเพื่อเป็นตัวรายงานการทำงาน (การตัด) ของโปรตีอส

เมื่อกล่าวถึงวิธีที่ใช้ตรวจสอบและยืนยันว่าระบบของสิ่งประดิษฐ์ที่สร้างขึ้นนี้สามารถทำงานได้หรือไม่ จะกล่าวถึง การแสดงผลการทดลองการทำงานของระบบที่ออกแบบเพื่อให้เกิดความเชื่อมโยงระหว่างการไม่ตัดของโปรตีอสกับการทนยาปฏิชีวนะของเซลล์โดยวิธีการทดลองแบบ *in vivo* ซึ่งคือสปอตเพลท (spot plate technique) และการยืนยันผลว่าการที่เซลล์ทนยาปฏิชีวนะได้นั้นเกิดจากการขันส่งพิวชั่นโปรตีนให้ไปอยู่ในเพอริพลาสซึมจริง ด้วยเทคนิคการติดตามโปรตีนเวสเทอร์นบล็อท (western blot) ซึ่งเป็นวิธีแบบ *in vitro*

วิธีสปอตเพลทสามารถยืนยันได้ว่าพิวชั่นโปรตีนถูกตัดหรือไม่ เพราะถ้าพิวชั่นโปรตีนไม่ถูกตัดก็จะถูกส่องออกทั้งโมเลกุลซึ่งจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าปลายเอ็นมีบริเวณจับจำเพาะของกระบวนการส่งโปรตีนจึงทำให้พิวชั่นโปรตีนที่ไม่ถูกตัดสามารถส่องออกไปยังเพอริพลาสซีมได้ทั้งโมเลกุล และทางปลายซีของพิวชั่นโปรตีนมีเอ็นไซม์เบต้า-แลคแทมเมสอยู่ เมื่อถูกขนส่องออกไปยังเพอริพลาสซีมเอ็นไซม์นี้ก็จะทำงานโดยการย่อย

5 5) ยานภัยชีวนะบริเวณโดยรอบและทำให้มีการเจริญของโคโลนี *E. coli* ได้ ฉะนั้นวิธีนี้จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าพิวชั่นโปรตีนถูกตัดหรือไม่ ซึ่งเป็นผลมาจากการปกป้องของโปรตีอีสอินยีบิเตอร์ ส่วนอีกวิธีคือเวสเทรนบล็อท วิธีนี้ เป็นวิธีการติดตามผลในระดับโปรตีนว่าโปรตีนที่สำคัญทั้งสามชนิดถูกผลิตและทำงานหรือไม่ โดยวิธีการเวสเทรนบล็อทนี้จะใช้การจับของแอนติบอดีกับเอปิโทปแท็กที่เชื่อมอยู่กับโปรตีน เช่น FLAG-tag ที่ใช้ในระบบนี้ ซึ่งเชื่อมอยู่กับโปรตีอีสอินยีบิเตอร์ His-tag ที่เชื่อมอยู่กับเอชไอวีโปรตีอีส และ Bla หรือเบต้า-แลคแทมเมสที่เชื่อมอยู่ในพิวชั่นโปรตีน เพราะฉะนั้นสามารถตรวจสอบได้ว่าพิวชั่นโปรตีนและโปรตีอีสอินยีบิเตอร์สามารถผลิตและถูกส่องออกไปยังเพอริพลาสซีมหรือไม่จากการเตรียมทั้งไซโตพลาสซีมและเพอริพลาสซีมแยกกันจากตัวอย่างหนึ่งๆ ถ้าพิวชั่นโปรตีนไม่ถูกตัดซึ่งเกิดจากการปกป้องโดยโปรตีอีสอินยีบิเตอร์จะสามารถติดตามพิวชั่นโปรตีนได้ทั้งในไซโตพลาสซีมและเพอริพลาสซีม ซึ่งโปรตีอีสอินบิเตอร์ก็เช่นเดียวกัน แต่ถ้าพิวชั่นโปรตีนถูกตัดผลที่ควรสังเกตได้ คือ พบรพิวชั่นโปรตีนในเลนของไซโตพลาสซีมเท่านั้นและไม่พบในเพอริพลาสซีม การติดตามผลโดยวิธีเวสเทรนบล็อทนั้นจำเป็นต้องรู้ขนาดโปรตีนที่สนใจเพื่อเทียบว่าขนาดของโปรตีนที่ตรวจสอบได้ตรงกับขนาดโปรตีนที่ต้องการศึกษาหรือไม่

10 10) ต่อไปจะกล่าวถึงภาพรวมของสิ่งประดิษฐ์ ในขั้นของการออกแบบระบบของสิ่งประดิษฐ์ได้ทำการออกแบบเป็น 3 องค์ประกอบหลักดังต่อไปนี้

15 15) 1.) โปรตีอีสอินยีบิเตอร์ หรือ อินทราเซลลูลาร์แอนติบอดี (intracellular antibody) : “scFv_{p17}”

20 2.) ชิ้นส่วนของโปรตีนของเอชไอวี-1 ในสิ่งประดิษฐ์นี้ได้เลือกบริเวณที่มีจุดตัดของเอ็นไซม์โปรตีอีสของเอชไอวี-1 หรือบริเวณโปรตีอีสคลีเวจไซต์รวมอยู่ในชิ้นส่วน สามารถเรียกชิ้นส่วนนี้ได้ว่า พิวชั่นโปรตีน (fusion proteins) : “ssTorA::p17Δp24::Bla”

25 3.) โปรตีอีสของเอชไอวี-1 : “HIV-1 protease”

สำหรับหลักการของเทคนิค PROTECT ภาพรวมที่เกิดจากการออกแบบนี้จะแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งคือความน่าจะเป็นที่อาจเกิดขึ้นในสิ่งประดิษฐ์ที่สองประการคือ

25 25) ประการที่หนึ่ง (จากภาพ 3a) คือ ความน่าจะเป็นที่เกิดขึ้นเมื่อโปรตีอีสอินยีบิเตอร์สามารถจับอย่างจำเพาะหรือเกิดปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (interaction) และปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ และยังสามารถส่งโปรตีนคอมเพล็กซ์ออกไปยังเพอริพลาสซีมของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ สิ่งที่สังเกตได้จากเหตุการณ์นี้ คือ จะสามารถเห็นโคโลนีของ *E. coli* บนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะประเภทเบต้าแลคแทม เช่น แอมพิซิลลิน (ampicillin) และ 30 30) คาร์เบนิซิลลิน (carbenicillin) เนื่องจากโปรตีนคอมเพล็กซ์ที่ถูกส่องออกไปยังเพอริพลาสซีมมีเอ็นไซม์เบต้า-

แลคแทมเมสที่ใช้ย่อยยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดที่ได้ก่อร้าวมาข้างตันเป็นองค์ประกอบอยู่ในพิวชั่นโปรตีน จึงสามารถเรียกได้ว่า เปต้า-แลคแทมเมสเป็นตัวรายงานการยับยั้งหรือไม่ยับยั้งการทำงานของโปรตีอส โดยโปรตีอสอินซิบิเตอร์ที่อยู่ในระบบของสิ่งประดิษฐ์นี้ได้ เปต้า-แลคแทมเมสเป็นตัวรายงานผลที่ทำให้ระบบนี้สามารถถูกนำมาใช้เป็นเทคนิคแบบชีเลคชันได้ เพราะเป็นการคัดเลือกด้วยความมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ ทำให้สามารถ

5 นำมาใช้ในการคัดเลือกครัวลงมากๆ ได้ และ

ประการที่สอง (จากภาพ 3b) แสดงให้เห็นถึงโปรตีอสอินซิบิเตอร์ไม่มีคุณสมบัติในการปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการอินซิบิเตอร์ที่ไม่สามารถจับจำเพาะกับบริเวณคลีเวจไซต์ได้ หรือโปรตีอสไม่สามารถม้วนพับให้อยู่ในรูปลายน้ำได้ จึงไม่สามารถทำงานได้เช่นกัน ถ้าผลของการออกแบบระบบของสิ่งประดิษฐ์ออกแบบมาในแบบภาพทางขวามือจะไม่สามารถเห็นการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหาร

10 แข็งที่มียาปฏิชีวนะได้

ในลำดับต่อไปผู้ประดิษฐ์จะอกล่าวยังคงดำเนินยามต่างๆ ที่ผู้ประดิษฐ์ได้ใช้อิบายเกี่ยวกับสิ่งประดิษฐ์นี้

“โปรตีน” ใช้อังถึงสายโซ่ของกรดอะมิโนที่เชื่อมกันไว้ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) ซึ่งจะสามารถเรียกว่าสายโซ่กรดอะมิโนก็ต่อเมื่อกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบอย่างน้อยสองโมเลกุลขึ้นไป จนกระทั่งสามารถประกอบเป็นโปรตีนสายยาวได้ และยังนิยามคำว่าโปรตีนได้ไปจนถึงโปรตีนที่ประกอบขึ้นจากโมเลกุลโปรตีน และโมเลกุลอื่น เช่น น้ำตาลหรือคาร์บอไฮเดรตจะเรียกว่าไกลโคโปรตีน (glycoprotein; glycosylated form), โปรตีนในรูปฟอตเฟต (phosphorylated form) เป็นต้น

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

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

“พิวชั่นโปรตีน” (fusion protein) หมายถึง สายโพลีเปปไทด์ หรือกรดนิวคลีอิกที่แสดงถึงสายโพลีเปปไทด์ดังกล่าว พิวชั่นโปรตีนประกอบไปด้วย เปปไทด์ที่จำเพาะกับกระบวนการขนส่งโปรตีน (tat pathway), โปรตีนเป้าหมาย และ โปรตีนที่ใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ (marker protein) ซึ่งเปปไทด์ที่จำเพาะกับ

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

“โปรตีนเครื่องหมายคัดเลือกหรือยีนรายงานผลหรือโปรตีนบ่งชี้” (selectable marker หรือ reporter gene) อธิบายถึงลำดับของกรดนิวคลีอิก (ยีน) ที่แสดงออกถึงกิจกรรม (activity) ของโปรตีนหรือเอนไซม์ และแสดงถึงความสามารถในการเจริญในอาหารที่ขาดสารอาหารสำคัญต่อการเจริญ หรืออีกประการ หนึ่งความสามารถแสดงถึงการต่อต้านตัวยาปฏิชีวนะหรือยาอื่นๆ ที่เกิดขึ้น เมื่อโปรตีนเครื่องหมายคัดเลือกหรือยีนรายงานผลนี้เกิดการแสดงออก โดยในสิ่งประดิษฐ์นี้จะใช้โปรตีนเครื่องหมายคัดเลือกหรือยีนรายงานผลต่อเชื่อมอยู่กับพิวชั่นโปรตีน ยกตัวอย่างเช่น เซลล์เจ้าบ้านมีลำดับของกรดนิวคลีอิกที่ผลิตพิวชั่นโปรตีนซึ่งสามารถเจริญในสภาพแวดล้อมที่มียาปฏิชีวนะ เนื่องจากกรดนิวคลีอิก 10 เหล่าที่ผลิตพิวชั่นโปรตีนนั้นสามารถแสดงออกได้ถึงกิจกรรม (เช่น กิจกรรมของเบต้า-แลคแทมเมส, β -lactamase activity) ในการต่อต้านยาปฏิชีวนะได้

“คุณสมบัติการละลายน้ำ” (solubility profile) อธิบายถึงคุณสมบัติการละลาย และ/หรือ การพับม้วนตัวของโปรตีนเป้าหมาย โดยสามารถสังเกตคุณสมบัติเหล่านี้ได้จากการความสามารถของเซลล์เจ้าบ้านที่มีพิวชั่นโปรตีนหรือโปรตีนเป้าหมายอยู่ในตัวและแสดงออกโดยการเจริญบนยา, ยาปฏิชีวนะ หรือตัวคัดเลือก 15 อื่นๆ (เช่น การแสดงออกของยาแอมพิซิลลิน) ฉะนั้นเซลล์เจ้าบ้านที่เจริญได้ในสภาพที่มียา, ยาปฏิชีวนะ หรือตัวคัดเลือกอื่น บ่งบอกได้ถึงความสามารถในการละลายของโปรตีนเป้าหมายได้ ในขณะเดียวกันถ้าโปรตีนเป้าหมายไม่มีความสามารถในละลายเซลล์เจ้าบ้านจะไม่สามารถเจริญในสภาพแวดล้อมที่มีการ 20 แสดงออกของยา, ยาปฏิชีวนะ หรือตัวคัดเลือกอื่น กับการแสดงออกของพิวชั่นโปรตีนที่เพอริพลาสซีม เช่นความสามารถในการละลายของพิวชั่นโปรตีนที่มีโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนเครื่องหมายคัดเลือกเป็นองค์ประกอบอยู่)

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

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

“กรดนิวคลีอิก” (nucleic acid) อธิบายได้ว่าการรวมตัวของกรดนิวคลีอิกเพื่อกลายเป็นโมเลกุลหนึ่งๆ ไม่จำกัดว่าจะเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ แต่ยังครอบคลุมทุกลำดับอื่นด้วย เช่น 4-acetylcytosine, 8-5 hydroxy-N6-methyladenosine, aziridinylcytosine, pseudouracil, 5-(carboxyhydroxyl methyl)uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxymethylamino-nomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methyl adenine, 1-methyl pseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyl adenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, 10 7-me thylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxy-aminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonylmethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-iso pentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutoxosine, 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, 15 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 ในทาง 20 กายภาพจะเกิดการตัดส่วนของ intron ออกซึ่งเรียกว่ากระบวนการ spliced out ในขั้นตอนการถอดรหัสซึ่ง ตั้น ซึ่งยังในความหมายนี้ยังรวมไปถึง ซีดีเอ็นเอ (cDNA) อีกด้วย

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

“เอนไซม์ตัดจำเพาะ” (restriction enzyme) หมายถึง เอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยที่แต่ละชนิดนั้นจะ 30 สามารถตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใดก็ได้ จึงสามารถจับจดของลำดับบนนิวคลีโอไทด์ได้แตกต่างกันไป

“การคัดแยก” (isolated) แสดงถึงลำดับของกรดนิวคลีอิกที่ถูกระบุและแยกออกจากองค์ประกอบหนึ่งๆ หรือแยกออกจาก การปนเปื้อนโดยปกติจะเกี่ยวข้องกับแหล่งรวมชาติของสิ่งนั้น การคัดแยกโดยปกติจะใช้วิธีคัดจากรูปร่างที่ปราภูมิหรือการตั้งค่าหาความแตกต่างที่เคยพบจากธรรมชาติ ในทางตรงกันข้ามลำดับของกรดนิวคลีอิกที่ไม่ถูกคัดแยกคือ ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอที่พบได้อย่างปกติในธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น ดีเอ็นเอที่พบได้ปกติในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน หรืออาร์เอ็นเอ ที่ในแต่ละเอ็นอาร์เอ็นจะผลิตโปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ซึ่งจะพบได้จำนวนมากโดยอาจอยู่ร่วมกันแต่ผลิตโปรตีนเฉพาะตัวของแต่ละลำดับอกมา

“การทำให้บริสุทธิ์” (purified/to purify) อธิบายถึงการแยกองค์ประกอบที่ต้องการออกจากตัวอย่างตั้งต้น ตัวอย่างเช่น การแยกแอนติบอดีออกจาก การปนเปื้อนของโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนอิมมูโนโกลบูลิน โดยการ 10 ทำให้บริสุทธิ์เช่นนี้ คือ การแยกอิมมูโนโกลบูลินที่ไม่สามารถจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมายได้ โดยการกราฟทำหั้งหมดนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตอบสนองต่อเป้าหมายให้มากขึ้น ในอีกตัวอย่าง คือสายโพลีเปปไทด์สังเคราะห์ที่ใส่เข้าเซลล์เจ้าบ้านเกิดการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านนั้นจะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านออกไป ซึ่งทำให้สายโพลีเปปไทด์สังเคราะห์มีปริมาณมากขึ้นในตัวอย่าง

“เเวสเทอร์นบล็อท” (western blot) คือวิธีการวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกตรึงอยู่บนตัวรองรับ เช่น ไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) หรือเยื่อหุ้มอื่นๆ โปรตีนจะวิ่งในเจลอะคริลามีเด็เพื่อแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกัน และจากนั้นกีด้วยโปรตีนจากเจลไปยังตัวรองรับอื่นที่เป็นของแข็ง เช่น ไนโตรเซลลูโลส หรือเยื่อไนล่อน โปรตีนที่สนใจจะถูกตรึงไว้บนกระดาษจะถูกจับโดยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อกัน และสุดท้ายการตรวจจับการจับกันของแอนติเจนและโปรตีนที่สนใจมีหลากหลายวิธี ตัวอย่างเช่น การติดแท็กด้วยสารรังสี

“เซลล์เจ้าบ้าน” (host cell) อธิบายถึงเซลล์ทั้งในหลอดทดลองหรือในสิ่งมีชีวิตที่ได้รับยืนจากภายนอก (เช่น เวกเตอร์ที่มียีนผลิตพิวชั่นโปรตีนประกอบอยู่), โพลินิวคลีโอไทด์ และ/หรือ โปรตีนที่ปราภูมิอยู่ในสิ่งประดิษฐ์นี้เข้าสู่เซลล์ เซลล์เหล่านี้อาจเป็นเซลล์ยูเคราริโอตหรือโพคราริโอต ซึ่งไม่จำกัดว่าจะเป็นเซลล์ประเภทใดหรือกลุ่มใด ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านได้ตั้งแต่เซลล์แบคทีเรียไปจนถึงเซลล์สัตว์ชั้นสูง (เช่น *E. coli*, เซลล์ยีสต์, เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม, เซลล์สัตว์ปีก, เซลล์สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ, เซลล์พีช, เซลล์ปลา และเซลล์แมลง)

25 “แอนติบอดี” (antibody/immunoglobulin) คือโปรตีนที่จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน รวมไปถึงโพลีโคลนอล (polyclonal), โมโนโคลนอล (monoclonal), แอนติบอดีที่มีการตัดต่อพันธุกรรมจากของหนูและคน (chimeric) และแอนติบอดีที่มีสัดส่วนจากพันธุกรรมมนุษย์ (humanized antibodies), ส่วนของ Fab, ส่วนของ $F(ab')_2$ และรวมไปถึงอิมมูโนโกลบูลินคลาสต่างๆ เช่น IgG, IgA, IgM, IgD, IgE และ อิมมูโนโกลบูลินที่หลังออกมา (secretion immunoglobulin; Ig) ซึ่งโดยปกติแอนติบอดีจะมีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วนคือ 2 เส้นใยโปรตีนชนิดหนัก (heavy chain) และ 2 เส้นใยโปรตีนชนิดเบา (light chain) อย่างไรก็ตาม

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

“อปิโทป” (epitope) คือตำแหน่งบนแอนติเจนที่เป็นบริเวณจำเพาะกับส่วนหนึ่งของแอนติเจน หรืออีมูโนโกลบูลิน

5 “การจับกันอย่างจำเพาะเฉพาะเจาะจง” (specific/specifically binding) ถ้าอ้างอิงจากปฏิสัมพันธ์ของ แอนติบอดีและโปรตีนหรือเปปไทด์ ซึ่งปฏิสัมพันธ์นี้ขึ้นอยู่กับการประกูณ์ส่วนของโครงสร้าง (เช่น อปิโทป) เนพะบนโปรตีนนั้นๆ หรือในอีกนัยหนึ่ง คือ แอนติบอดีสามารถจดจำและเข้าจับอย่างจำเพาะเฉพาะเจาะจงกับ โปรตีน ยกตัวอย่างเช่น ถ้าแอนติบอดีมีความจำเพาะกับเอปิโทป A ถ้ามีโปรตีนที่มีเอปิโทป A ประกูณ์ขึ้นโดยที่ ในปฏิกิริยามีตัวเลベルอื่นที่จับกับเอปิโทป A แอนติบอดีจะเข้าไปเยี่ยงจับกับเอปิโทป A ทำให้ปริมาณของเลベル 10 อื่นที่จับกับเอปิโทป A ลดลง

จากทั้งหมดที่ได้กล่าวมาข้างต้น ผู้ประดิษฐ์ได้ดำเนินการตามลำดับของวิธีการทดลองและสามารถแสดงผลการ ทดลองได้ดังนี้

การทดลอง

15 ขณะทำการทดลองสิ่งประดิษฐ์นี้มีขั้นตอนหลากหลายและแต่ละขั้นตอนอาจใช้อักษรย่อที่แตกต่างกัน ออกไป ผู้ประดิษฐ์จึงได้รวบรวมอักษรย่อต่างๆ ไว้ในตารางด้านล่างนี้

อักษรย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ชื่อเต็ม (ภาษาไทย)	ชื่อเต็ม (ภาษาอังกฤษ)
hr	ชั่วโมง	hours
g	กรัม	grams
l, L	ลิตร	liters
μl	ไมโครลิตร	microliters
μM	ไมโครโมลาร์	micromolar
μmol	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

5 **ขั้นที่ 1 การออกแบบการสีเย็นที่จำเป็นในระบบเข้าพลาสมิด โดยการออกแบบตัวนำส่งยีนหรือเวกเตอร์ หรือ พลาสมิดนี้ได้อธิบายส่วนประกอบสำคัญหลัก 3 ประการไว้แล้วในข้างต้นและแสดงองค์ประกอบตามคำอธิบาย ไว้ในรูปที่ 4a และ 4b ในส่วนรายละเอียดการออกแบบพลาสมิด, เวกเตอร์ หรือตัวนำส่งยีนนั้น สามารถ 5 อธิบายได้ดังนี้**

10 ในขั้นตอนการออกแบบพลาสมิดของสิ่งประดิษฐ์นี้ใช้พลาสมิดชื่อ pDD18 และ pDD322 (Waraho, D. and DeLisa, M.P., (2009) Proc Natl Acad Sci U S A. 106(10):3692-7) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถูกดัดแปลง มาจากพลาสมิดต้นแบบคือ pBAD18-Cm และ pBR322 เนื่องจาก pBAD18-Cm และ pBR322 มีชิ้นส่วน ของเบต้า-แแลคแทมเมสเป็นค้างอยู่จากการตัดต่อพลาสมิดต้นแบบของพลาสมิดเหล่านั้น และทำให้เกิดความ 15 ผิดพลาดของระบบได้ดังที่กล่าวไว้ในงานวิจัยที่อ้างถึงนี้ โดยที่พลาสมิดทั้งสองชนิดนี้ ได้ถูกนำมาใช้ในระบบ FLI-TRAP ด้วยเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ เนื่องจาก pDD322 มียีนที่ทำให้เซลล์ทนยาเตตราไซคลีนซึ่งเป็นยาที่ยัง มีการใช้ในมนุษย์เป็นยืนเครื่องหมายในการคัดเลือก (selectable marker) ทำให้ผู้ประดิษฐ์ตัดต่อยีนนั้นออก และเปลี่ยนเป็นยีนที่ทำให้เซลล์ทนยากราน่ามัยซินแทนและเรียกเวกเตอร์ใหม่ที่ว่า pDD322-Kan จากนั้นจึงทำการตัดต่อพันธุกรรมของยีนต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 องค์ประกอบในระบบ PROTECT ลงใน pDD18 15 ได้แก่

20 1) โพรตีอีสอินซิบิเตอร์ (protease inhibitor) หรือในตัวอย่างที่ใช้นี้คือ อินทราเซลลูลาร์แอนติบอดี (intracellular antibody) ที่อยู่ในรูปแบบ scFv (single chain variable fragment) โดยโพรตีอีสอินซิบิเตอร์ที่เลือกใช้ในงานประดิษฐ์นี้คือ scFvp17 เนื่องจาก scFvp17 สามารถจับอย่างจำเพาะกับบริเวณปลายชี ของโปรตีน p17 ซึ่งบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน p17 คือ $^{121}\text{DTGHSSQVSQNY}^{132}$ โดยผู้ประดิษฐ์เชื่อว่าโปรตี เอสอินซิบิเตอร์นี้จะสามารถปกป่องบริเวณคลีเวจไซต์ของโปรตีนเป้าหมายและยับยั้งการทำงานของโปรตีอีส ได้ และบริเวณที่ใช้ในการตัดต่อ คือ ระหว่างเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ SacI และ SalI ในขณะเดียวกันที่ปลายชีของ โปรตีอีสอินซิบิเตอร์ผู้ประดิษฐ์ได้ทำการตัดต่อ FLAG-tag เพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ (purification) หรือใช้ เพื่อติดตามผลการทดลองด้วยวิธีอิเวสเทอร์นบล็อท

2) พิวชั่นโปรตีน ซึ่งในตัวอย่างนี้มีสับสเตรทหรือโปรตีนเป้าหมายเชื้อไวรัสไอวี-1 โดยสิ่งประดิษฐ์นี้เลือกโปรตีนเป้าหมายที่มีบริเวณจุดจำหรือบริเวณโปรตีโอดีสคลีเวจไซต์ของเอนไซม์โปรตีโอดีสเชื้อไวรัส-1 เพื่อให้เอนไซม์ดังกล่าวทำงานโดยการตัดโปรตีนเป้าหมายได้ โดยบริเวณที่ใช้ในการตัดต่อ คือ ระหว่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ XbaI ดังนั้นโปรตีนเป้าหมายที่เลือกมาใช้ในสิ่งประดิษฐ์นี้คือ เมทริกซ์โปรตีน (matrix protein : p17) และแคปซิดโปรตีน (capsid protein : p24) นอกจากนั้นผู้ประดิษฐ์ยังได้ออกแบบเพิ่มเติมให้โปรตีนเป้าหมายนี้อยู่ในสภาพพิวชั่นโปรตีน โดยเติม ssTorA (signal sequence TorA) ที่ปลายเอ็น (N-terminus) และเติมเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (Beta/β-lactamase) ที่ปลายซี (C-terminus) ของโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมสมีคุณสมบัติการย่อยสลายยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเบต้า-แลคแทม ซึ่งในที่นี้เปรียบเสมือนตัวรายงานผลการทดลองหรือโปรตีนติดตามผลซึ่งใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบด้วยวิธีสปอตเพลท และเวสเทอเรนบล็อก

5 3) เอนไซม์โปรตีโอดีส ซึ่งในตัวอย่างนี้คือโปรตีโอดีสของเชื้อไวรัสเชื้อไวรัสไอวี-1 (HIV-1 protease) มีหน้าที่จับอย่างจำเพาะและตัดบริเวณคลีเวจไซต์ของโปรตีนเป้าหมาย บริเวณที่ใช้ในการตัดต่อ คือ ระหว่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ Apal และ Xhol ในขณะเดียวกันที่ปลายซีของเอนไซม์โปรตีโอดีสผู้ประดิษฐ์ได้ทำการตัดต่อ Histidine-tag เพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ (purification) หรือใช้เพื่อติดตามผลการทดลองด้วยวิธีเวสเทอเรนบล็อก

10 15 กระบวนการในขั้นตอนนี้ การประดิษฐ์จะครอบคลุมถึงการโคลนยินที่เป็นองค์ประกอบทั้งสามอย่าง เข้าสู่พลาสมิดเท่านั้น ไม่ว่าจะเป็นการใช้พลาสมิดใดๆ ก็ตาม ไม่เพียงแต่ pDD18 และ pDD322 หรือมีการแยกองค์ประกอบออกจากพลาสมิดเดียวกัน เช่นในระบบไตรซิสทรอนิก หรือไบซิสทรอนิกที่มีอยู่ในตัวอย่างที่ 1 ทราบได้ที่องค์ประกอบ ทราบได้ที่มีการโคลนองค์ประกอบทั้งสามนี้ได้แก่ โปรตีโอดีส พิวชั่นโปรตีน และโปรตีโอดีสอินซิบิเตอร์และนำไปผลิตในเซลล์พร้อมกันเพื่อคัดเลือกโปรตีโอดีสอินซิบิเตอร์

20 25 30 ลำดับต่อไปจะกล่าวถึงตัวอย่างขั้นตอนการทดลอง โดยสายพันธุ์ของแบคทีเรียและสภาพการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ใช้ในการประดิษฐ์นี้คือ สายพันธุ์ต้นแบบ (wild-type) MC4100 ซึ่งใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกและการทดสอบทั้งหมด และ DH5α ซึ่งใช้ในขั้นตอนการตัดต่อและโคลนนิ่ง โดยปกติแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเจริญได้ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) และอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส (°C) โดยในการประดิษฐ์นี้จะใช้แบคทีเรีย *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการรับพลาสมิดที่เกิดจากการตัดต่อพันธุกรรมให้มีองค์ประกอบหลัก 3 องค์ประกอบดังที่กล่าวไปแล้ว เพราะฉะนั้นจึงต้องเตรียมเซลล์ *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์ให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน (competent cell) ซึ่งทำได้โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C อัตราการหมุน 200 rpm เป็นเวลาอย่างต่ำ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงใน 50 มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ใหม่ โดยใส่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในอัตราส่วน 1:50 และเลี้ยงในสภาพเดิมประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งค่า OD₆₀₀ (optical density) ที่วัดได้จะอยู่ในช่วง 0.4-0.6 (วัดที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) หลังจากได้ความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการแล้ว จึงทำการขั้นตอนเพื่อให้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* อยู่ในสภาพพร้อมรับพลาสมิดซึ่งเตรียมได้ 2 รูปแบบ คือ เซลล์

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

หลังจากนั้นจึงส่งผ่านพลาสมิดทุกแบบข้างต้นเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ที่พร้อมใช้งานด้วยวิธีส่งผ่านโดยใช้ไฟฟ้าหรือความร้อนกระตุ้นอย่างโดยย่างหนึ่ง พร้อมทั้งคัดเลือกเชลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดทั้งสองโดยอาศัยการใส่ยาปฏิชีวนะอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแรก ซึ่งคือ คลอราเมฟนิคอล (chloramphenicol) และ กานามัยซิน (kanamycin) เพราะ pDD18 สามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะคลอราเมฟนิคอลและ pDD322 สามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน หลังจากนั้นจึงนำเชลล์ *E. coli* ที่บรรจุด้วยสองพลาสมิดนี้ไปทำการศึกษาประสิทธิภาพของปฏิอิสอินอิบิเตอร์ต่อไป

เพราะฉะนั้นผลสรุปของการออกแบบดังกล่าว呢 คือ scFvp17, ssTorA::p17Δp24::β-lactamase และ HIV-1 protease นอกจากร่องน้ำที่มีการโคลนยืนที่ผลิตองค์ประกอบของแทพพาราเรย์ได้แก่ TatA TatB และ TatC (TatABC) ไว้ใน pDD322-Kan อีกด้วยเพื่อให้ถูกผลิตพร้อมกับองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค PROTECT ยิ่งขึ้น เวกเตอร์ใหม่นี้เรียกว่า pDD322-Kan TatABC ระบบที่กล่าวไปแล้วนั้น เรียกว่าเป็นระบบที่เป็นแบบไตรซิสทรอนิก (ดังรูปที่ 4a และ 4b) เนื่องจากยืนองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT นั้นอยู่ใน pDD18-Cm ทั้งหมดและอยู่ภายใต้การควบคุมของпромोเตอร์ตัวเดียวกันคือ AraBAD โปรโมเตอร์ ในขณะที่โปรตีน TatABC นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ TatABC native ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยืนตลอดเวลา ยิ่งไปกว่านั้นในสิ่งประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ได้ออกแบบการแสดงออกของพลาสมิดไว้ใน 2 รูปแบบคือ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Bicistronic vector) และไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Tricistronic vector) สำหรับระบบที่เป็นแบบไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ คือการออกแบบให้มีเพียง 2 องค์ประกอบหลักซึ่งคือ ปฏิอิสอินอิบิเตอร์ (scFvp17) และ พิวชั่นโปรตีนหรือโปรตีนเป้าหมาย (ssTorA::p17Δp24::β-lactamase) เท่านั้นที่อยู่ในพลาสมิด pDD18-Cm ส่วนเอนไซม์ปฏิอิสอินจะเปลี่ยนไปบรรจุในพลาสมิด pDD322 แทน (pDD322-Kan TatABC HIV-1 PR) ดังรูปที่ 5a และ 5b ทำให้ปฏิอิสอินอยู่ในระบบนี้จะถูกผลิตตลอดเวลาไปพร้อมๆ กับโปรตีน TatABC

นอกจากร่องน้ำที่มีการโคลนยืนที่ผลิตองค์ประกอบหลักของแทพพาราเรย์ได้แก่ TatA TatB และ TatC (TatABC) ไว้ใน pDD322-Kan อีกด้วยเพื่อให้ถูกผลิตพร้อมกับองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค PROTECT ยิ่งขึ้น เวกเตอร์ใหม่นี้เรียกว่า pDD322-Kan TatABC ระบบที่กล่าวไปแล้วนั้น เรียกว่าเป็นระบบที่เป็นแบบไตรซิสทรอนิก (ดังรูปที่ 4a และ 4b) เนื่องจากยืนองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT นั้นอยู่ใน pDD18-Cm ทั้งหมดและอยู่ภายใต้การควบคุมของпромोเตอร์ตัวเดียวกันคือ AraBAD โปรโมเตอร์ ในขณะที่โปรตีน TatABC นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ TatABC native ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยืนตลอดเวลา ยิ่งไปกว่านั้นในสิ่งประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ได้ออกแบบการแสดงออกของพลาสมิดไว้ใน 2 รูปแบบคือ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Bicistronic vector) และไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Tricistronic vector) สำหรับระบบที่เป็นแบบไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ คือการออกแบบให้มีเพียง 2 องค์ประกอบหลักซึ่งคือ ปฏิอิสอินอิบิเตอร์ (scFvp17) และ พิวชั่นโปรตีนหรือโปรตีนเป้าหมาย (ssTorA::p17Δp24::β-lactamase) เท่านั้นที่อยู่ในพลาสมิด pDD18-Cm ส่วนเอนไซม์ปฏิอิสอินจะเปลี่ยนไปบรรจุในพลาสมิด pDD322 แทน (pDD322-Kan TatABC HIV-1 PR) ดังรูปที่ 5a และ 5b ทำให้ปฏิอิสอินอยู่ในระบบนี้จะถูกผลิตตลอดเวลาไปพร้อมๆ กับโปรตีน TatABC

นอกจากร่องน้ำที่มีการโคลนยืนที่ผลิตองค์ประกอบหลักของแทพพาราเรย์ได้แก่ TatA TatB และ TatC (TatABC) ไว้ใน pDD322-Kan อีกด้วยเพื่อให้ถูกผลิตพร้อมกับองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค PROTECT ยิ่งขึ้น เวกเตอร์ใหม่นี้เรียกว่า pDD322-Kan TatABC ระบบที่กล่าวไปแล้วนั้น เรียกว่าเป็นระบบที่เป็นแบบไตรซิสทรอนิก (ดังรูปที่ 4a และ 4b) เนื่องจากยืนองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT นั้นอยู่ใน pDD18-Cm ทั้งหมดและอยู่ภายใต้การควบคุมของпромोเตอร์ตัวเดียวกันคือ AraBAD โปรโมเตอร์ ในขณะที่โปรตีน TatABC นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ TatABC native ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยืนตลอดเวลา ยิ่งไปกว่านั้นในสิ่งประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ได้ออกแบบการแสดงออกของพลาสมิดไว้ใน 2 รูปแบบคือ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Bicistronic vector) และไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Tricistronic vector) สำหรับระบบที่เป็นแบบไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ คือการออกแบบให้มีเพียง 2 องค์ประกอบหลักซึ่งคือ ปฏิอิสอินอิบิเตอร์ (scFvp17) และ พิวชั่นโปรตีนหรือโปรตีนเป้าหมาย (ssTorA::p17Δp24::β-lactamase) เท่านั้นที่อยู่ในพลาสมิด pDD18-Cm ส่วนเอนไซม์ปฏิอิสอินจะเปลี่ยนไปบรรจุในพลาสมิด pDD322 แทน (pDD322-Kan TatABC HIV-1 PR) ดังรูปที่ 5a และ 5b ทำให้ปฏิอิสอินอยู่ในระบบนี้จะถูกผลิตตลอดเวลาไปพร้อมๆ กับโปรตีน TatABC

นอกจากร่องน้ำที่มีการโคลนยืนที่ผลิตองค์ประกอบหลักของแทพพาราเรย์ได้แก่ TatA TatB และ TatC (TatABC) ไว้ใน pDD322-Kan อีกด้วยเพื่อให้ถูกผลิตพร้อมกับองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค PROTECT ยิ่งขึ้น เวกเตอร์ใหม่นี้เรียกว่า pDD322-Kan TatABC ระบบที่กล่าวไปแล้วนั้น เรียกว่าเป็นระบบที่เป็นแบบไตรซิสทรอนิก (ดังรูปที่ 4a และ 4b) เนื่องจากยืนองค์ประกอบหลักของเทคนิค PROTECT นั้นอยู่ใน pDD18-Cm ทั้งหมดและอยู่ภายใต้การควบคุมของпромोเตอร์ตัวเดียวกันคือ AraBAD โปรโมเตอร์ ในขณะที่โปรตีน TatABC นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ TatABC native ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยืนตลอดเวลา ยิ่งไปกว่านั้นในสิ่งประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ได้ออกแบบการแสดงออกของพลาสมิดไว้ใน 2 รูปแบบคือ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Bicistronic vector) และไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (Tricistronic vector) สำหรับระบบที่เป็นแบบไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ คือการออกแบบให้มีเพียง 2 องค์ประกอบหลักซึ่งคือ ปฏิอิสอินอิบิเตอร์ (scFvp17) และ พิวชั่นโปรตีนหรือโปรตีนเป้าหมาย (ssTorA::p17Δp24::β-lactamase) เท่านั้นที่อยู่ในพลาสมิด pDD18-Cm ส่วนเอนไซม์ปฏิอิสอินจะเปลี่ยนไปบรรจุในพลาสมิด pDD322 แทน (pDD322-Kan TatABC HIV-1 PR) ดังรูปที่ 5a และ 5b ทำให้ปฏิอิสอินอยู่ในระบบนี้จะถูกผลิตตลอดเวลาไปพร้อมๆ กับโปรตีน TatABC

25 **ขั้นที่ 2** การวิเคราะห์ค่อนดิชั่นเพื่อเลือกสภาพที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือกปฏิอิสอินอิบิเตอร์ การวิเคราะห์ผลการปกป้องการตัดสับสเตตโดยปฏิอิสอินนี้ จำเป็นต้องมีการคัดเลือกสภาพที่เหมาะสมที่สุด การวิเคราะห์ผลสามารถทำได้จากตัวอย่างดังนี้ นำพลาสมิดที่ได้ออกแบบไว้นั้นทำการส่งผ่าน (transtion) เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* และวิจัยนำศึกษาการแสดงผลการยับยั้งการทำงานของปฏิอิสโดยการใช้ปฏิอิสอินอิบิเตอร์จากระบบของสิ่งประดิษฐ์โดยจะแสดงผลการทดลองในส่วนนี้ในรูปแบบของวิธีสปอตเพลทเพื่อสังเกตการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* บนจานอาหารที่มีความเข้มข้นของปริมาณยาปฏิชีวนะคาร์เบนิซิลลิน

และตัวกระตุ้น (น้ำตาลอะราบิโนส) ในการทดลองครั้งที่ 1 เป็นการทดลองเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตของระบบที่ได้สร้างขึ้น โดยใช้อุณหภูมิที่ 30°C และ 37°C ที่ความเข้มข้นอะราบิโนส 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลปรากฏว่าที่ 30°C ระบบที่สร้างขึ้นนี้ทำงานได้ดีกว่า หรือในอีกทางสามารถตอบอีกด้วยว่าที่อุณหภูมิ 30°C scFvp17 หรือ โปรตีอีสอินซิบิเตอร์ สามารถถูกผลิตในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ดีกว่าจึง 5 ทำงานปกป้องบริเวณคลีเวจไซต์ของสับสเตรทของไวรัส HIV-1 ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 37°C อันเนื่องมาจากการที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* เป็นอย่างมาก เพราะฉะนั้นที่ อุณหภูมิดังกล่าวแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวออกได้เป็นจำนวนมากซึ่งทำให้มีเหมาะสม กับการผลิตโปรตีนที่มาจากการสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น scFvp17 ซึ่งขึ้นส่วนของแอนติบอดี เนื่องจากกระบวนการ ทำงานที่ได้ออกแบบและส่งผ่านเข้าสู่แบคทีเรียถูกสร้างและผลิตในอัตราเร็วที่สูงตามการเจริญและการแบ่งตัว 10 ของแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเป็นเหตุผลให้ scFvp17 ถูกผลิตเร็วและมีจำนวนมากพร้อมๆ กันจนเกินไป เมื่อเทียบ กับอัตราส่วนเวลาเดียวกันที่อุณหภูมิ 30°C จึงส่งผลให้บริเวณไม่ชอบน้ำ (hydrophobic patch) ของโปรตีน จำนวนมากที่ยังไม่ได้มีมวนพับนั้นเกิดการจับกันเองและเกิดการบดบังกันของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และ ไม่ชอบน้ำจนส่งผลให้โปรตีนหรือเอนไซม์ดังกล่าวเกิดการจับตัวกันเองและตกตะกอนไปอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (aggregation/inclusion body) และไม่สามารถอยู่ในรูปที่ทำงานได้หรือพับมวนและทำงานได้น้อยกว่าที่ควร 15 จะเป็น และนอกจากนั้นพื้นที่ที่ใช้ผลิตในแบคทีเรีย *E. coli* ก็มีจำกัด เมื่อโปรตีนถูกผลิตออกมากจนเกินไป ในพื้นที่จำกัดก็ยิ่งส่งผลให้โปรตีนตกตะกอนมากขึ้น จากการทดลองครั้งที่ 1 ทำให้ทราบได้ว่าระบบของงาน ประดิษฐ์นี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C

เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมแล้วลำดับต่อมาคือศึกษาประสิทธิภาพของระบบที่สร้างขึ้นด้วยวิธีสปอต เพลท โดยมีลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้ เลี้ยงเซลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดทั้งสองบรรจุอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี 20 ยาปฏิชีวนะคลอแรมเพนิคอล (ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และการน้ำมันยชิน (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C อัตราการเรี่ยง 200 rpm เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาบ่มจะทำการปรับความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นให้เท่ากันคือ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.5 แล้วจากนั้น จึงเลือจางเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้ง 5 ระบบ ดังต่อไปนี้ 1) ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ของระบบ ไตรซิสทรอนิก 2) ชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ของระบบไตรซิสทรอนิก 3) เวกเตอร์แบบไตรซิส 25 ทรอนิก (Tricistronic vector) (WT หรือสับสเตรทที่มีคลีเวจไซต์แบบโปรตีนดังเดิมของไวรัส HIV-1) 4) เวกเตอร์แบบไบซิสทรอนิก (Bicistronic vector) (WT) และ 5) ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ของระบบไบซิสทรอนิก ตั้งแต่ความเข้มข้น 2.5×10^{-1} - 10^{-6} cfu/ml ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งนั้นจะมี ส่วนประกอบคือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ความเข้มข้นของอะราบิโนสเท่ากับ 0.1%, 0.2% และ 0.5% โดย น้ำหนักต่อปริมาตร (เป็นอินดิวเซอร์ของพลาสมิด pDD18 ใส่เพื่อให้ปะโมเตอร์ของพลาสมิดเริ่มการผลิต 30 โปรตีน) และยาปฏิชีวนะประเภทเบต้า-แคลคแทม (คาร์เบนิชิลลิน) ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากเจือจางเชื้อ *E. coli* และเตรียมอาหารแข็งแล้ว ลำดับต่อไปจะเป็นการสปอต เชื้อ *E. coli* ที่ได้เจือจางไว้ลงอาหารแข็ง โดยหยดเชื้ออีโตไลเจือจางตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6} cfu/ml

(colony-forming unit/ml) โดยความเข้มข้นละ 5 ไมโครลิตรเป็นแคลต์อกันไป จากนั้นนำไปบนที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อสังเกตผลการทดลองที่เกิดขึ้นว่าระบบของสิ่งประดิษฐ์ที่สร้างขึ้นสามารถผลิตทำงานและตรวจสอบได้โดยใช้ระบบการขนส่งโปรตีนของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ตามวัตถุประสงค์หรือไม่ ถ้าปฏิโภสตินอินซิบิเตอร์ (scFvp17) มีประสิทธิภาพในการป้องคุ้มกันไว้ แต่ถ้าปฏิโภสตินอินซิบิเตอร์ไม่มีประสิทธิภาพ (GLF) หรือไม่สามารถพับม้วนเพื่อยูในรูปที่ละลายน้ำได้จะไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารแข็ง

ซึ่งผลการทดลองที่ออกมานั้นสามารถระบุได้ว่าองค์ประกอบทั้ง 3 ส่วนซึ่งคือ ปฏิโภสตินอินซิบิเตอร์ (scFvp17 หรือ GLF), ฟิวชันโปรตีน (ssTorA::p17Δp24::β-lactamase) และ เอนไซม์ปฏิโภสติน HIV-1 สามารถถูกผลิตและมีประสิทธิภาพในการทำงานป้องปริเวณคลีเวจไซต์ของฟิวชันโปรตีนจากการตัดของเอนไซม์ปฏิโภสติน HIV-1 ได้ (ดังตัวอย่างที่ 1)

หลังจากทดสอบประสิทธิภาพของระบบสิ่งประดิษฐ์แล้วว่าสามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะด้วยวิธี สปอตเพลทตามที่ได้ออกแบบระบบไว้ เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคแบบ *in vivo* จึงควรมีการยืนยันผลด้วยวิธีเสเทอร์นบล็อทซึ่งเป็นเทคนิคแบบ *in vitro* อีกด้วย วิธีเสเทอร์นบล็อทจะช่วยในการพิสูจน์ว่าการที่ 15 เชลล์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะเป็นเพาะะเบต้า-แลคแทมเมสถูกส่งออกไปยังเพอริพลาสซีมจริง ซึ่งแปลว่าองค์ประกอบต่างๆ นั้นถูกผลิตให้อยูในรูปที่สามารถละลายน้ำได้และอยูในรูปที่ทำงานได้จริง ซึ่งมีลำดับขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงเชลล์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดทั้งสองบรรจุอยูในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอเรมเพนิคอล (25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และการน้ำมายชิน (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C อัตราการเรย่า 200 rpm เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะทำการลงเชื้อ *E. coli* (subculture) ใน 50 มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ใหม่ (โดยใส่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในอัตราส่วน 1:50) และใส่ยาปฏิชีวนะเช่นเดิม จากนั้นนำไปบนที่อุณหภูมิ 37°C อัตราการเรย่า 200 rpm ประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั้งค่า OD₆₀₀ ที่วัดได้จะอยูในช่วง 0.4-0.5 (วัดที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) หลังจากนั้นใส่ สารละลายอะราบิโนสเข้มข้น 0.2% โดยนำหนักต่อปริมาตรเพื่อเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของพลาสมิด pDD18 และนำไปบนที่อุณหภูมิ 30°C อัตราการเรย่า 200 rpm เพื่อให้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ผลิตโปรตีนทั้งสามส่วนที่บรรจุอยูในพลาสมิด เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะใช้ทำการแยกส่วนของไซโตพลาสซีมและเพอริพลาสซีมของแบคทีเรียออกจากกันเป็นสองส่วน โดยเริ่มจากการจะทำการปรับความเข้มข้นเชื้อตั้งต้นให้เท่ากันคือ OD₆₀₀ เท่ากับ 2.5 วิธีการคือวัด OD₆₀₀ ของเชลล์คัลเลอร์ของแต่ละตัวอย่างแล้วปั่นให้วายังเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ปริมาตรตั้งต้นที่เมื่อทำการละลายด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 5 mM MgSO₄ ในขั้นตอนหลังแล้วจะทำให้ได้ OD₆₀₀ = 75 สามารถคำนวณได้โดยใช้สมการดังนี้

โดยที่ OD₆₀₀ (x) หมายถึง ค่าของ OD₆₀₀ ที่วัดได้มื่อถังเวลาเก็บเชลล์มาทำการสกัดแยกส่วนหลังจากนั้นจึงละลายเชื้อแบคทีเรียด้วย 1 มิลลิลิตร subcellular fractionation buffer (ประกอบด้วย 30

mM Tris-HCl, 1 mM กรดเออทีลีนไดอะมีนเตตราอะเซติก (EDTA), 0.6 M โซโครส) จากนั้นบ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ลำดับต่อไปใส่ 250 ไมโครลิตร ของ 5 mM MgSO₄ (เป็นการปรับความเข้มข้น เชือแบคทีเรียให้เป็น OD₆₀₀ = 75) และแข็งน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่งด้วยความเร็ว 16,000 rcf เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และเก็บส่วนไส้ด้านบนตะกอน (supernatant) เป็นส่วนของ

5 เพอริพลาสซีม และละลายนตะกอนที่เหลือด้วย 250 μ L phosphate buffered saline (PBS) และทำให้เซลล์ แตกโดยการใช้คลีนเสียงกระแทก (sonication) ซึ่งจะทำในน้ำแข็งเพื่อลดความร้อนที่เกิดจากการใช้คลีนเสียง ที่อาจทำลายโปรตีนได้ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่งเพื่อให้ตกรตะกอนที่ความเร็ว 16,000 rcf เป็นเวลา 20 นาที ที่ อุณหภูมิ 4°C และเก็บส่วนไสของรอบนี้เป็นส่วนของไชโตพลาสซีม และตะกอนที่เหลืออยู่ด้านล่างเปรียบได้กับ ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble fraction) จากนั้นทำการแยกโปรตีนต่างๆ ที่มีอยู่ในส่วนของไชโตพลาสซีมและ 10 เพอริพลาสซีมด้วยวิธี SDS/PAGE และจากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลเข้าสู่ส่วนรองรับชนิดแข็ง (polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes) โดยวิธีเวสเทรนบล็อกตามมาตรฐาน หลังจากนั้นจะเป็นการตรวจสอบหา โปรตีนองค์ประกอบหลักทั้ง 3 ส่วน คือ 1) พิวชั่นโปรตีนจะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับเบต้า-แลคแทมเมส (mouse anti-Bla 1:150; Abcam) เป็นตัวตรวจสอบชีงขนาดที่ถูกต้องควรจะเป็น 58.5 kDa, 2) โปรตีอีสอิน ชิบิเตอร์จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ FLAG-tag (mouse anti-FLAG M2-HRP 1:3,000; Sigma-Aldrich) เป็นตัวตรวจสอบชีงขนาดที่ถูกต้องควรจะเป็น 27.6 kDa และ 3) ถ้าต้องการตรวจสอบเอนไซม์โปรตีอีสของ ไวรัสเอชไอวี-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 เป็น อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผลิตโปรตีนมากกว่า 37°C และยังแสดงให้เห็นว่าระบบสิ่งประดิษฐ์สามารถผลิตและ 20 ส่งออกพิวชั่นโปรตีนได้จริงที่แสดงในเลนของ WT สับสเตรท และ KP สับสเตรท (ชุดควบคุมเชิงบวก) เพราะ สามารถตรวจสอบพิวชั่นโปรตีนได้ทั้งส่วนของไชโตพลาสซีมและเพอริพลาสซีม ซึ่งตรงข้ามกับเลนที่ 1-2 ที่ แสดงผลของชุดควบคุมเชิงลบ เพราะผลการทดลองดังกล่าว สามารถตอบพิวชั่นโปรตีนแค่ในส่วนของไช โตพลาสซีมเท่านั้น ซึ่งเน้นย้ำผลที่ว่า GLF scFv ไม่มีความสามารถในการปักป้องคลีเวจไซต์ และ scFvp17 มี ความสามารถในการปักป้องคลีเวจไซต์ของพิวชั่นโปรตีนได้จริง 2) โปรตีอีสอินชิบิเตอร์จะใช้แอนติบอดีที่ 25 จำเพาะกับ FLAG-tag (mouse anti-FLAG M2-HRP 1:3,000; Sigma-Aldrich) เป็นตัวตรวจสอบชีงขนาดที่ ถูกต้องควรจะเป็น 27.6 kDa และแสดงในรูปที่ 6b ซึ่งขนาดแบบ (band) ที่พบใกล้เคียงกับสิ่งที่คาดหวังแสดงว่า เป็นแบบของ scFvp17 จริง อย่างไรก็ตาม ในสิ่งที่คาดหวังไว้นั้นคือจะพบ scFvp17 ทั้งส่วนของไชโตพลาสซีม และเพอริพลาสซีมเช่นเดียวกับพิวชั่นโปรตีน แต่จากรูปพบแค่ในไชโตพลาสซีมเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นผลจาก scFvp17 สามารถทำงานได้จริงแต่การจับกับพิวชั่นโปรตีนอาจไม่แข็งแรงเท่าที่ควร ดังนั้นขณะทำการส่งออก 30 ไปยังเพอริพลาสซีมทำให้ scFvp17 หลุดออกจากการจับกับพิวชั่นโปรตีนอาจไม่แข็งแรงเท่าที่ควร ดังนั้นขณะทำการส่งออกได้ ในปริมาณที่น้อยเกินกว่าปริมาณขั้นต่ำที่เทคนิคเวสเทรนบล็อกจะสามารถตรวจสอบจับได้ และลำดับที่ 3) ซึ่งเป็น

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

ขั้นที่ 3 การคัดเลือกโปรตีอสในยีบเตอร์จากไลบรารีโดยวิธีการตรวจคัดกรองไลบรารี

5 การประดิษฐ์นี้ไม่มีการจำกัดชนิดของไลบรารีที่เลือกใช้ อาจมาจาก naïve library เมื่อไม่มีโปรตีอสในยีบเตอร์ที่จำเพาะกับตัวสับสเตรทที่ต้องการอยู่แล้ว หรืออาจเป็นไลบรารีของ mutant ที่มาจากการปรับเปลี่ยนโปรตีอสในยีบเตอร์ต้นแบบที่จำเพาะกับตัวสับสเตรทที่ต้องการอยู่แล้ว แต่จะครอบคลุมถึงการคัดเลือกโปรตีอสในยีบเตอร์ที่ต้องการด้วยการทำการคัดเลือกในรูปแบบของไลบรารีโดยการโคลนไลบรารีลงในตำแหน่งของโปรตีอสในยีบเตอร์ ในขั้นต้นนั้น การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโปรตีอสในยีบเตอร์แต่ละตัวที่ถูกคัดเลือกมาจากไลบรารีสามารถทำได้โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกอยู่ ทำให้สามารถคัดเลือกโปรตีอสในยีบเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้ในขั้นต้นจำนวนหนึ่ง แล้วจึงนำมายิเคราะห์ต่อด้วยวิธีทาง *in vitro* เช่น เวสเทอร์นบล็อก ELISA หรือ Surface Plasmon Resonance (SPR) ต่อไป

10 ในตัวอย่างนี้คือการสร้างไลบรารีของโปรตีอสในยีบเตอร์ในระบบของการประดิษฐ์ข้างต้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error-Prone PCR (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit: Agilent technologies) โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเวคเตอร์ที่บรรจุโปรตีอสในยีบเตอร์เป็น 4 นาโนกรัม หลังจากนั้นนำส่งพลาสมิดหรือเวคเตอร์ของไลบรารีดังกล่าวเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ NEB® 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) (ต้องทำการการคำนวณขนาดของไลบรารีเพื่อให้ครอบคลุมพลาสมิดของไลบรารีทั้งหมด) จึงเตรียม *E. coli* สายพันธุ์ NEB® 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) ปริมาณหลอดละ 50 ไมโครลิตร และทำการนำส่งพลาสมิดจากไลบรารีโดยต้องทำการจัดเกลือออกจากตัวอย่างไลบรารีโดยการหยดบนกระดาษป่านโตรเชลลูโลสที่มีรูพรุนขนาด 0.025 ไมโครเมตร จากนั้นจึงทำการนำส่งพลาสมิดจากไลบรารี 5 ไมโครลิตร/50 ไมโครลิตร electro competent *E. coli* โดยใช้กระแสงไฟฟ้าและใช้อาหาร SOC ในการเลี้ยงและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการสเปรดเพลท (spread plate) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเจือจางตัวอย่างจากไลบรารีให้อยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6}

15 20 และใช้จานอาหารที่บรรจุยาปฏิชีวนะคลอ雷มฟenencol เพื่อใช้ระบุและประมาณขนาดของไลบรารี ส่วนของไลบรารีที่เหลือให้เติม LB ให้ครบ 100 มิลลิลิตรและเติมยาปฏิชีวนะคลอ雷มฟenencolให้ได้ความเข้มข้นตามอัตราส่วนและนำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน เข้าวันรุ่งขึ้นเก็บเชื้อเพื่อทำ freezer stock (1:1 30% glycerol) นอกจากนั้นต้องนับจำนวนโคโลนีบนเพลทและประมาณขนาดของไลบรารีดังสูตรต่อไปนี้

25

ในตัวอย่างนี้คือการสร้างไลบรารีของโปรตีอสในยีบเตอร์ในระบบของการประดิษฐ์ข้างต้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Error-Prone PCR (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit: Agilent technologies) โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเวคเตอร์ที่บรรจุโปรตีอสในยีบเตอร์เป็น 4 นาโนกรัม หลังจากนั้นนำส่งพลาสมิดหรือเวคเตอร์ของไลบรารีดังกล่าวเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ NEB® 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) (ต้องทำการการคำนวณขนาดของไลบรารีเพื่อให้ครอบคลุมพลาสมิดของไลบรารีทั้งหมด) จึงเตรียม *E. coli* สายพันธุ์ NEB® 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) ปริมาณหลอดละ 50 ไมโครลิตร และทำการนำส่งพลาสมิดจากไลบรารีโดยต้องทำการจัดเกลือออกจากตัวอย่างไลบรารีโดยการหยดบนกระดาษป่านโตรเชลลูโลสที่มีรูพรุนขนาด 0.025 ไมโครเมตร จากนั้นจึงทำการนำส่งพลาสมิดจากไลบรารี 5 ไมโครลิตร/50 ไมโครลิตร electro competent *E. coli* โดยใช้กระแสงไฟฟ้าและใช้อาหาร SOC ในการเลี้ยงและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการสเปรดเพลท (spread plate) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเจือจางตัวอย่างจากไลบรารีให้อยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6} และใช้จานอาหารที่บรรจุยาปฏิชีวนะคลอ雷มฟenencol เพื่อใช้ระบุและประมาณขนาดของไลบรารี ส่วนของไลบรารีที่เหลือให้เติม LB ให้ครบ 100 มิลลิลิตรและเติมยาปฏิชีวนะคลอ雷มฟenencolให้ได้ความเข้มข้นตามอัตราส่วนและนำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน เข้าวันรุ่งขึ้นเก็บเชื้อเพื่อทำ freezer stock (1:1 30% glycerol) นอกจากนั้นต้องนับจำนวนโคโลนีบนเพลทและประมาณขนาดของไลบรารีดังสูตรต่อไปนี้

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

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

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

5 จากนั้นจะทำการสกัดพลาสมิดซึ่งต้องคำนึงถึงความครอบคลุมขนาดของไอลิบรารีที่สร้างขึ้นด้วย โดยใช้หลักการที่ว่า $OD_{600} = 1$ ของเชื้อ 1 มิลลิลิตร จะมีเชื้อยู่ 10^9 cfu/ml เพราะฉะนั้นตัวเลขนี้ครอบคลุมขนาดของไอลิบรารี จึงทำการสกัดพลาสมิดให้ครอบคลุมขนาดของไอลิบรารีดังที่กล่าวไว้ จากนั้นนำส่วนพลาสมิดของไอลิบรารีเหล่านั้นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ MC4100 ที่มีพลาสมิด pdd322 TatABC บรรจุอยู่ด้วยวิธีทางไฟฟ้า และทำการสเปรดเพลทที่การเจือจางเดียวกับการสเปรดเพลทข้างต้น บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ

10 10 คลอเรมเฟนคอลและการน้ำมันยชิน เชื้อที่เหลือจากการสเปรดเพลทจะใส่ LB ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมยาปฏิชีวนะคลอเรมเฟนคอลและการน้ำมันยชินให้ได้ความเข้มข้นตามอัตราส่วนและนำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน วันรุ่งขึ้นเก็บเชื้อเพื่อทำ freezer stock (1:1 30% glycerol) นอกจากนั้นจึงนับจำนวนโคโลนีบนเพลทและประมาณขนาดของไอลิบรารีดังสูตรข้างต้น

15 จากนั้นจะทำการคัดเลือก *E. coli* ที่บรรจุพลาสมิดไอลิบรารีการกลایพันธุ์ของปรติอีสอินยีบิเตอร์ ด้วยกระบวนการสเปรดเพลทโดยทำการเจือจางตัวอย่างให้อยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-3} และความเข้มข้นของคราร์เบนิชิลินที่ 200-300 มิโครกรัม/มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของตัวอย่างและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะเป็นผลมาจากการทดลองสปอทเพลทก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (WT) สามารถโตได้ที่ 10^{-2} ที่ความเข้มข้นของยา 200 มิโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้น ดังนั้นข้อกำหนดข้างต้นจะสามารถใช้คัดเลือกพลาสมิดที่กลایพันธุ์แล้วว่ามีปรสิทธิภาพในการปักป้องคลีเวจไซต์มากกว่า WT จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C

20 20 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สุดท้ายจะคัดเลือกโคโลนีที่สามารถโตบนจานอาหารที่มียาคราร์เบนิชิลินที่เวลา 48 ชั่วโมง ไปใช้ในการทดลองหาปรสิทธิภาพของปรติอีสอินยีบิเตอร์ด้วยวิธีทาง *in vitro* เช่น ELISA, western blot และ SPR ต่อไป

ตัวอย่างที่ 1 การทดสอบความแตกต่างของชุดควบคุมเชิงลบและชุดควบคุมเชิงบวกกับระบบไตรซิสทรอนิก และไบซิสทรอนิก

25 25 ตัวอย่างนี้เป็นการนำระบบมาใช้งานโดยมีการทดสอบว่าเมื่อองค์ประกอบทั้งสามมีการผลิตมาจากพลาสมิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน จะส่งผลให้เห็นถึงปรสิทธิภาพในการแสดงออกที่แตกต่างกันหรือไม่

อย่างไร ในการประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ออกแบบ, ตัดต่อและนำส่งโปรตีนทั้ง 3 ส่วนใน 2 รูปแบบด้วยกัน คือ รูปแบบที่ 1 เรียกว่า Tricistronic version ซึ่งรูปแบบนี้โปรตีนทั้ง 3 ส่วนจะบรรจุอยู่ในพลาสมิดที่ชื่อว่า pDD18 โดยแสดงออกร่วมกันกับพลาสมิด pDD322 ที่บรรจุโปรตีน TatA, TatB และ TatC ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขนส่งของแทพพารเวอร์ แต่ในการทดลองโปรตีอีสของเชื้อไวรัส-1 มีข้อดีที่ค่อนข้างใหญ่ทำ 5 ให้ใช้เวลาในการพับม้วนเพื่อทำงาน อาจทำให้โปรตีนอีก 2 ส่วนถูกผลิตและทำงานก่อนที่ โปรตีอีสของเชื้อไวรัส-1 จะทำงาน เนื่องจากทั้ง 3 ส่วนถูกผลิตพร้อมกัน ผู้ประดิษฐ์จึงออกแบบรูปแบบที่ 2 เรียกว่า Bicistronic version โดยรูปแบบนี้โปรตีนส่วนที่ (1) และ (2) เท่านั้นที่อยู่ใน พลาสมิด pDD18 ส่วนโปรตีนส่วนที่ (3) จะบรรจุอยู่ในพลาสมิด pDD322 แทน ซึ่งคาดว่าจะเป็นผลดีกว่า เพราะถูกผลิตและทำงานได้พร้อมกับโปรตีนอีก 2 ส่วนได้ทันที ในการประดิษฐ์นี้ผู้ประดิษฐ์ใช้พลาสมิด 2 ประเภทที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในการออกแบบและ 10 ตัดต่อ แต่ในการประดิษฐ์หรืองานวิจัยอื่นสามารถใช้พลาสมิดหรือตัวนำส่งยืนประเภทอื่นได้เช่นกัน

ตัวอย่างที่ 1.1 การออกแบบและสร้างชุดควบคุมเชิงบวก

เริ่มต้นจากชุดออกแบบเชิงบวกซึ่งทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนบางตัวบนโปรตีน p17 จาก YP เป็น KP (Y = ไทรอซีน, K = ไลซีน, P = โพรลีน) ด้วยวิธี Round The Horn เนื่องด้วยเมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนตัว ดังกล่าวแล้วจะทำให้เอนไซม์โปรตีอีสไม่สามารถจับหรือจับได้แบบอ่อนกับโปรตีนเป้าหมาย (Tritch, R., 15 Cheng, Y., Yin, F. and Erickson-Viitanen, S., 1991) ซึ่งเหตุการณ์นี้สามารถใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวกได้ เนื่องจากเอนไซม์โปรตีอีสไม่สามารถจับและตัดโปรตีนเป้าหมายได้ ฉะนั้นพิวชันโปรตีนจะไม่ถูกตัดและ สามารถถูกส่งออกไปยังเพอริพลาสซีมได้ ดังนั้น *E. coli* ที่ถูกบรรจุด้วยพลาสมิดของชุดควบคุมเชิงบวกจึง สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะได้

ตัวอย่างที่ 1.2 การออกแบบและสร้างชุดควบคุมเชิงลบ

20 ในส่วนของชุดทดสอบเชิงลบทางผู้ประดิษฐ์ได้ใช้วิธีเปลี่ยนโปรตีอีสอินยิบเตอร์จาก scFvp17 เป็น scFv-GLF แทนเนื่องจากโปรตีอีสอินยิบเตอร์ตัวใหม่ไม่มีความสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมาย หรือยังสามารถใช้ โปรตีอีสอินยิบเตอร์ตัวอื่นที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องหรือมีความสัมพันธ์กับสับสเตรตของเชื้อไวรัส-1 ซึ่งหมายถึงไม่ สามารถจับหรือปักป้องโปรตีนเป้าหมายได้ เพราะฉะนั้นในกรณีนี้โปรตีนเป้าหมายจะถูกตัดออกเป็นสองส่วน โดยเอนไซม์โปรตีอีสได้อย่างแน่นอน

25 หลังจากนั้นจึงนำระบบมาทำการเปรียบเทียบชุดควบคุมทั้งเชิงบวก เชิงลบ และระบบที่สนใจทั้งใน ระบบไตรซิสทรอนิกและไบซิสทรอนิก อันเนื่องมาจากมีการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* บนจานอาหารเลี้ยง เชื้อที่มียาปฏิชีวนะcarbenicilinบรรจุอยู่ โดยอัตราการเจริญในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกันออกไป ซึ่ง ความคาดหวังที่เกิดขึ้นคือ ชุดการทดลองเชิงลบจะต้องไม่สามารถเจริญได้ในจานอาหารที่บรรจุด้วยcarbenicilin เพาะโปรตีอีสอินยิบเตอร์ของชุดควบคุมเชิงลบ (อินทร่าเซลลูลาร์แอนติบอดีที่จับกับ transcription 30 factor จากยีสต์ หรือ anti-GCN4 scFv ที่มีชื่อเรียกอย่างย่อว่า GLF) ไม่มีความสามารถในการปักป้องคลีเวจ

ไซต์ของพิวชั่นโปรตีน เมื่อไม่สามารถปกป่องได้พิวชั่นโปรตีนจะถูกตัดโดยเอนไซม์โปรตีอสและส่วนที่ถูกส่งออกไปยังเพอริพลาสซีมจึงมีแค่ ssTorA::p17 เท่านั้น โดยส่วนของ p24::Bla ยังคงอยู่ในไซโตพลาสซีมจึงทำให้ชุดการทดลองดังกล่าวไม่มีเอนไซม์เบต้า-แคลคแทมเมส (Bla) ในเพอริพลาสซีมจึงไม่สามารถแทนยาปฏิชีวนะได้ ดังนั้น ชุดการทดลองนี้จึงไม่ควรเจริญได้บนจานอาหารที่มีคาร์เบนิซิลลิน อย่างไรก็ดี จากรูปที่ 7 (เลนที่ 1) จะเห็นว่าที่ชุดการทดลองดังกล่าวสามารถเจริญบนจานอาหารได้บ้างเมื่อมีการหยดเชลล์จำนวนมาก หรือที่มีการเจือจางน้อยๆ (dilution) เช่น ที่ 10^{-1} หรือ 10^{-2} เท่า ลงในจุดนั้น เป็นเพาะเมื่อแบคทีเรีย *E. coli* เกิดการตายและทับถมกันจำนวนมาก ทำให้แบคทีเรียบางส่วนสามารถเจริญบนเศษชากของแบคทีเรียที่ตายในช่วงต้นและปลดปล่อยเอนไซม์เบต้า-แคลคแทมเมสที่ถูกผลิตออกมายังไซโตพลาสซีมและทำให้แบคทีเรียดังกล่าวถูกคล้ายกับสามารถย่อยยาปฏิชีวนะและเจริญได้ ในขณะที่เมื่อมีการหยดเชลล์จำนวนน้อยหรือที่มีการเจือจางมากๆ เช่น ที่ 10^{-5} หรือ 10^{-6} เท่า ลงในจุดนั้น เชลล์จะไม่สามารถเจริญได้เพราปริมาณเอนไซม์เบต้า-แคลคแทมเมสจากเชลล์ที่ตายนั้นมีไม่เพียงพอที่จะทำให้เชลล์ทนยาปฏิชีวนะได้ และในเลนที่ 2 คือชุดการทดลองที่เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ในชุดการทดลองนี้เชลล์ควรจะสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีคาร์เบนิลลินเพราชุดการทดลองนี้ถูกทำให้เกิดการถ่ายพันธุ์โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ปริเวณคลีเวจไซต์บนสับสเตรทที่เป็นส่วนหนึ่งของพิวชั่นโปรตีนจาก YP เป็น KP ซึ่งมีรายงานในปี 1991 ว่าเมื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนดังกล่าวแล้วจะทำให้เอนไซม์โปรตีอสไม่สามารถจับกับพิวชั่นโปรตีนหรือจับได้อย่างอ่อนมากทำให้พิวชั่นโปรตีนไม่สามารถถูกตัดโดยเอนไซม์โปรตีอส HIV-1 แต่ก็อาจมีบางส่วนที่ยังสามารถจับได้อย่างอ่อนจึงมีบางส่วนของพิวชั่นโปรตีนถูกตัดได้บ้าง (Tritch, R., Cheng, Y., Yin, F. and Erickson-Viitanen, S., 1991) ซึ่งก็เป็นไปตามผลการทดลองในรูปที่ 7 ที่แสดงให้เห็นว่าเชลล์สามารถเจริญได้บนจานอาหารแต่ก็ยังเจริญได้น้อยกว่าระบบไตรซิสทรอนิกเวกเตอร์ (WT) และ ไบซิสทรอนิกเวกเตอร์ (WT) ในเลนที่ 3-4 โดยจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีอสอินซิบิเตอร์ (scFvp17) มีความสามารถหรือมีประสิทธิภาพในการปกป่องคลีเวจไซต์บนพิวชั่นโปรตีนสูงกว่าตัวอย่างที่มีการทำให้เกิดการถ่ายพันธุ์ของคลีเวจไซต์จาก YP เป็น KP ดังเลนที่ 2 ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่จากการทดลองในเลนที่ 3 และ 4 จะเห็นว่าแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกในเลนที่ 3 สามารถเจริญบนจานอาหารได้มากกว่าแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวกเตอร์แบบไบซิสทรอนิก ในเลนที่ 4 ซึ่งเป็นเพราเวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกทั้ง 3 องค์ประกอบสำคัญถูกบรรจุอยู่ในพลาสมิด pDD18 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีจำนวนชุดของพลาสมิด (copy number) สูงกว่าพลาสมิด pDD322 จึงทำให้สามารถผลิตองค์ประกอบทั้ง 3 องค์มาได้ในปริมาณมากและจากเหตุผลดังกล่าวนี้ทำให้เห็นถึงข้อบกพร่องของระบบที่มีเวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกนี้ในระบบที่ใช้อีซิวี-1 เป็นตัวอย่าง เพราะเมื่อพิวชั่นโปรตีนที่ใช้เป็นตัวรายงานผลถูกผลิตออกมามาก และถูกส่งออกไปมากเข่นเดียวกัน ทำให้จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในความเข้มข้นที่สูงจึงจะเห็นความแตกต่างของปริมาณของพิวชั่นโปรตีนที่ถูกส่งออกไปสู่เพอริพลาสซีม ซึ่งก็เป็นตัวแสดงถึง 30 ประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของโปรตีอสโดยโปรตีอสอินซิบิเตอร์ที่ถูกแสดงออกด้วยนั้นเอง เหตุผลนี้จึงเชื่อได้ว่าระบบที่มีเวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการปกป่องได้อย่างชัดเจน เมื่อมีการใช้โปรตีอสอินซิบิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพดีแล้ว แต่ถ้ามีการนำเทคนิค PROTECT ไปใช้กับ

การคัดเลือกปรติอสอินอิบิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร หรือคัดเลือกจาก naïve library ก็อาจจำเป็นต้องใช้ระบบที่มีเวกเตอร์แบบไตรซิสทรอนิกที่สามารถผลิตปรตีนได้เป็นจำนวนมากซึ่งเปรียบเสมือนเป็นการเพิ่มสัญญาณที่แสดงถึงประสิทธิภาพการบัญชีการทำงานของปรติอสโดยปรติอสอินอิบิเตอร์ที่ถูกแสดงออกด้วย ทำให้สามารถสังเกตผลของระบบได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ เมื่อปรตีนถูกผลิตเป็นจำนวนมากและ

5 ปรตีนทุกองค์ประกอบถูกกระตุนให้เกิดการผลิตพร้อมกัน อาจส่งผลให้เอนไซม์ปรติอส HIV-1 ไม่สามารถตัดพิวชั่นปรตีนได้ทั้งหมดได้ทันท่วงที จึงทำให้เกิดการหลุดลอดของพิวชั่นปรตีนบางส่วนที่ถูกผลิตออกมแต่ไม่ได้รับการปกป้องด้วยปรติอสอินอิบิเตอร์แต่ถูกส่งออกยังเพอริพลาสซีมโดยแทพพารเวย์ไปเสียก่อน ส่งผลให้เกิดการเจริญของเซลล์ที่เป็นพื้นหลัง (background growth) เมื่อมีการหยดจำนวนเซลล์จำนวนมากๆ ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ทางผู้ประดิษฐ์จึงมีการประดิษฐ์ระบบ PROTECT ในอีกรูปแบบหนึ่งคือ ระบบที่มีเวกเตอร์แบบไบซิสทรอนิกซึ่งสามารถผลิตปรติอสได้ตลอดเวลา จึงทำให้เมื่อเซลล์ถูกนำมารีเยิ่งในจานเลี้ยงเข้าซึ่งมีการเติมอะราบิโนสเพื่อกระตุนปรตีน่าโมเตอร์ AraBAD ที่ควบคุมการผลิตปรติอสอินอิบิเตอร์และพิวชั่นปรตีนนั้น ปรติอสก์ถูกผลิตอยู่ก่อนแล้วภายในไซโตพลาสซีม จึงสามารถทำการตัดพิวชั่นปรตีนที่ไม่ถูกปกป้องด้วยปรติอสอินอิบิเตอร์ได้ทันท่วงที ทำให้ลดการเกิดการเจริญของเซลล์ที่เป็นพื้นหลังลงได้ ดังนั้นระบบที่มีเวกเตอร์แบบไบซิสทรอนิกนี้จึงสามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการปกป้องของ scFvp17 WT ได้มากกว่า อันจะสังเกตได้จากระบบไบซิสทรอนิกนี้สามารถเจริญบนจานอาหารได้น้อยกว่าระบบไตรซิสทรอนิกแต่สามารถให้ความถูกต้องได้มากกว่า และเลนที่ 5 ในรูปที่ 7 แสดงการเจริญของชุดควบคุมเชิงลบของระบบไบซิสทรอนิกซึ่งมีเหตุผลในการเจริญได้เหมือนกับเลนที่ 1 นั่นเอง ในรูปที่ 7d-7e แสดงความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย E. coli ในจานอาหารที่บรรจุด้วยคาร์เบนซิลลินในรูปแบบของกราฟ เพื่อให้เข้าใจผลการทดลองสปอตเพลท ในรูปที่ 7 ได้ง่ายยิ่งขึ้น ซึ่งกราฟแสดงผลการทดลองในรูปที่ 7c เนื่องจากที่ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอะราบิโนสเป็นผลการทดลองที่สามารถเห็นความต่างของแต่ละระบบได้ดีที่สุด โดยแกน x แสดงการเจือจางของแบคทีเรีย E. coli ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} เท่า (OD600 ตั้งตันของทุกตัวอย่างเท่ากับ 2.5) และแกน y แสดงถึงความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ (คาร์เบนซิลลิน) นอกจานนั้นจากการทดลองยังสามารถแสดงความเข้มข้นของตัวกระตุนที่เหมาะสมของระบบซึ่งตรวจสอบที่ 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอะราบิโนส โดยผลการทดลองระบุได้ว่าในทุกความเข้มข้นของอะราบิโนสช่วยกระตุนให้เกิดการผลิตและทำงานขององค์ประกอบทั้ง 3 ในระบบแต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอะราบิโนสโดยที่ความเข้มข้นนี้ระบบสามารถผลิตและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

20 โดยสรุปแล้ว การประดิษฐ์นี้ทำการคัดเลือกภัยในเซลล์ (in vivo) ดังนั้นจึงควรมีผลที่แสดงออกคล้ายคลึงกับเมื่อปรติอสอินอิบิเตอร์เปรกษาโรคในเซลล์มนุษย์ ได้ใกล้เคียงกว่าระบบที่ทำการคัดเลือกแบบภายนอกเซลล์ (in vitro) นอกจากนี้ การเลือกใช้เบต้า-แแลคแทมเมสเป็นรีพอร์ตเตอร์ปรตีน คือใช้ความสามารถในการทนยาปฏิชีวนะของเซลล์มาคัดเลือก เซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกจะมีชีวิตอยู่ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ผ่านการคัดเลือกจะตายไป ทำให้ระบบเป็นการคัดเลือกแบบเซลล์ชั้น จึงสามารถทำการคัดเลือกได้คร่าว

โดยสรุปแล้ว การประดิษฐ์นี้ทำการคัดเลือกภัยในเซลล์ (in vivo) ดังนั้นจึงควรมีผลที่แสดงออก

30 คล้ายคลึงกับเมื่อปรติอสอินอิบิเตอร์เปรกษาโรคในเซลล์มนุษย์ ได้ใกล้เคียงกว่าระบบที่ทำการคัดเลือกแบบภายนอกเซลล์ (in vitro) นอกจากนี้ การเลือกใช้เบต้า-แแลคแทมเมสเป็นรีพอร์ตเตอร์ปรตีน คือใช้ความสามารถในการทนยาปฏิชีวนะของเซลล์มาคัดเลือก เซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกจะมีชีวิตอยู่ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ผ่านการคัดเลือกจะตายไป ทำให้ระบบเป็นการคัดเลือกแบบเซลล์ชั้น จึงสามารถทำการคัดเลือกได้คร่าว

ลามากๆ ได้ นอกจากนี้ ระบบมีการใส่สับสเตรทไปรหัวงเปปไทร์ส่งสัญญาณและรีพอร์ตเตอร์โปรตีนซึ่งแต่ละตัวมีความเป็นอิสระต่อกัน เพราะจะสามารถพับม้วนเป็นรูปร่างของแต่ละองค์ประกอบของเอยได้ ทำให้ระบบมีอิสระด้านขนาดของสับสเตรทมากขึ้น เมื่อเทียบกับการแทรกสับสเตรทไปรหัวงลูปของรีพอร์ตเตอร์โปรตีน นอกจากนี้จากการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ไปก่อนหน้านี้พบว่า (1) เนื่องจากระบบใช้การขันส่งของโปรตีนในการคัดเลือก ทำให้ระบบคัดเลือกแต่การจับกันของโปรตีนที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูง เพื่อให้การจับกันต้องสามารถทนต่อขั้นตอนการขันส่งที่ต้องมีการผ่านเซลล์เมมเบรนของอีโคไลได้ด้วย ทำให้เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นระบบในการคัดเลือกยา และ (2) ความสามารถในการละลายน้ำของ scFv หรือ affinity ของ scFv สามารถเพิ่มได้เมื่อทำการคัดเลือกที่มีการกดดันเซลล์มากขึ้น ในที่นี้คือการเพิ่มความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกนั้นเอง แปลว่าเราสามารถนำโปรตีอสอินซิบิเตอร์ที่มีอยู่ไปทำการพัฒนา 10 ประสิทธิภาพให้ดียิ่งขึ้นได้โดยง่าย นอกจากนี้ การประดิษฐ์นี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมได้คือ สามารถนำระบบของงานประดิษฐ์นี้ไปใช้กับโรคอื่นๆ ได้ เพราะระบบนี้เปรียบเสมือนระบบต้นแบบที่ใช้ประโยชน์จากการการขันส่งโปรตีนในแบคทีเรียอีโคไลเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบหรือคัดเลือกไปรตีอสอินซิบิเตอร์ ดังนั้นในทางอุตสาหกรรมจึงสามารถประยุกต์ระบบจากงานประดิษฐ์นี้ เพื่อใช้ในรูปแบบต่างๆ อาจเป็นการหาโปรตีอสอินซิบิเตอร์ของโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ HIV-1 เช่น โรคไวรัสตับอักเสบซี, โรคอัลไซเมอร์ หรือโรคอื่นๆ เป็นต้น เนื่องจากระบบนี้ถูกทดสอบในสิ่งมีชีวิต (แบคทีเรียอีโคไล/in vivo) นอกจากสามารถใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบได้อย่างแม่นยำแล้วยังสามารถใช้ศึกษาผลกระทบหรือผลการทดสอบอื่นๆ ที่สามารถเกิดขึ้นจริงในเซลล์สิ่งมีชีวิตอีกด้วย

การประยุกต์ทางอุตสาหกรรมของการประดิษฐ์นี้แบ่งได้เป็น 3 แบบคือ

- สามารถประยุกต์ใช้ในรูปแบบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากในแต่ละครั้งได้ (high-throughput screening) ได้ เนื่องจากระบบนี้มีการนำระบบการคัดเลือกแบบเซเลคชันโดยอาศัยเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมสามาใช้ นอกจากนี้ระบบนี้ทำการคัดเลือกภายในสิ่งมีชีวิต (แบคทีเรีย E. coli / อินวีโว) ทำให้สามารถใช้เป็นเครื่องมือคัดเลือกได้อย่างแม่นยำแล้วยังสามารถศึกษาผลกระทบหรือผลการทดสอบอื่นๆ ที่สามารถเกิดขึ้นจริงในเซลล์สิ่งมีชีวิตอีกด้วย
- 20 2. โปรตีอสอินซิบิเตอร์ที่ต้องการคัดเลือก ไม่จำเป็นต้องเป็นชนิดที่จับบนสับสเตรทและปกป้องคลีเวจไซต์เท่านั้น สามารถนำมาใช้คัดเลือกชนิดที่จับกับโปรตีอสและยับยั้งการทำงานของโปรตีอสได้ด้วย เช่นกัน
3. สามารถนำการประดิษฐ์นี้ไปประยุกต์ใช้กับการรักษาโรคอื่นๆ ได้ เพราะระบบนี้เปรียบเสมือนระบบต้นแบบ (platform) ที่ใช้ประโยชน์จากการขันส่งโปรตีนในแบคทีเรีย E. coli เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบสิ่งหนึ่งๆ ดังนั้นในทางอุตสาหกรรมสามารถประยุกต์ระบบในงานประดิษฐ์นี้ เพื่อใช้ในรูปแบบต่างๆ อาจเป็นการหาโปรตีอสอินซิบิเตอร์ของโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่ HIV-1 เช่น โรคไวรัสตับอักเสบซี โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น

4. อาจนำไปใช้เพื่อคัดเลือกโปรดิวส์อินชิเตอเร่ได้ตามความต้องการในทางอุตสาหกรรมที่ไม่จำเป็นต้องอยู่ในรูปแบบของอินทราเซลลูลาร์เอนติบอดี เช่น เปป์ไทด์แอปตามิอร์

วิธีการในการประดิษฐ์ตีตีสุด

เหมือนกับที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

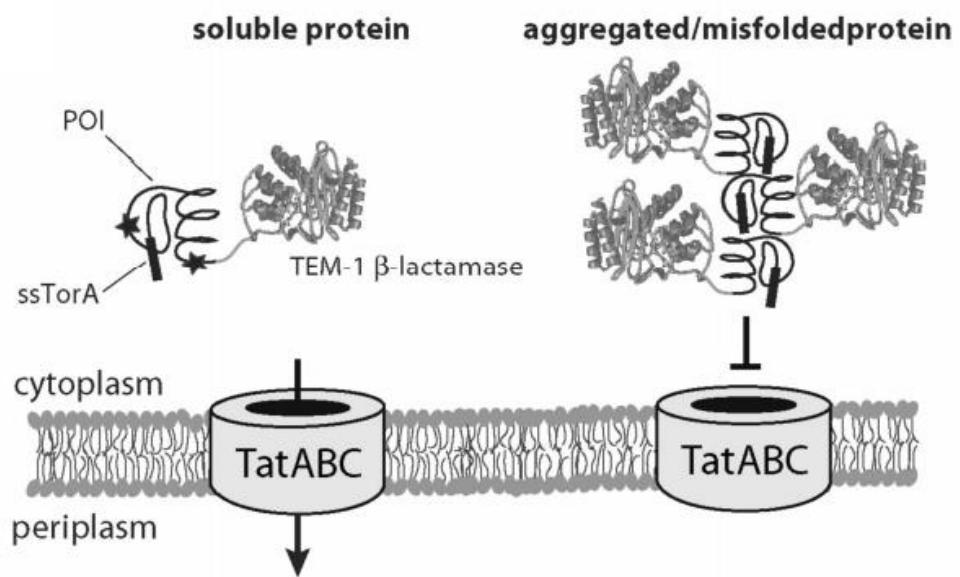
ข้อถือสิทธิ

1. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโพรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชั่นพาราเวย์ มีลักษณะเฉพาะ 3 ขั้นตอน คือ
 - ก. การผลิตองค์ประกอบสำคัญของระบบในเซลล์เจ้าบ้านที่เลือกใช้ ซึ่งมี 3 องค์ประกอบหลัก ดังต่อไปนี้ (1) โพรตีอีส, (2) โพรตีอีสอินอิบิเตอร์ และ (3) สับสเตรทหรือพิวชั่นโพรตีน ที่ประกอบไปด้วยเปปไทด์ส่งสัญญาณที่จำเพาะกับแทพพาราเวย์, สับสเตรทของเอนไซม์โพรตีอีสที่จำเป็นต้องมีบริเวณคลีเวจไซต์รวมอยู่ และโพรตีนบ่งชี้ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ (ssTat::protease substrate with cleavage site::Bla) ซึ่งทั้ง 3 องค์ประกอบหลักจะถูกผลิตภายในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน
 - ข. การติดตามการเจริญของแบคทีเรียเจ้าบ้านที่อยู่ภายใต้ข้อกำหนดหรือแรงกดดัน คือ ความสามารถทนยาปฏิชีวนะของเซลล์ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อสับสเตรทหรือพิวชั่นโพรตีน ถูกปอกป่องโดยโพรตีอีสอินอิบิเตอร์ ทำให้สับสเตรทหรือพิวชั่นโพรตีน ไม่ถูกตัดโดยโพรตีอีส และเกิดการขันส่งของโพรตีอีสอินอิบิเตอร์ จากไซโตพลาสซึมไปยังเพอริพลาสซึม หรือในอีกนัยหนึ่งสามารถระบุได้ว่าพิวชั่นโพรตีนไม่ถูกตัดโดยโพรตีอีส เนื่องจากการทำงานของโพรตีอีสอินอิบิเตอร์ในการปอกป่องโพรติโอลิติกคลีเวจไซต์
 - ค. การระบุและคัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปอกป่องโพรติโอลิติกคลีเวจไซต์
2. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโพรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชั่นพาราเวย์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 ที่ซึ่ง ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์ คือ ยาปฏิชีวนะในกลุ่มของเบต้าแลคแทมริงค์ (β -lactam ring)
3. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโพรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชั่นพาราเวย์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 หรือ 2 ที่ซึ่ง เซลล์เจ้าบ้าน คือ แบคทีเรีย *E. coli*
4. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโพรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชั่นพาราเวย์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 3 ที่ซึ่ง สายพันธุ์ของ *E. coli* ที่ใช้ คือ MC4100
5. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโพรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชั่นพาราเวย์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 ที่ซึ่ง เปปไทด์ส่งสัญญาณที่จำเพาะกับแทพพาราเวย์ คือ ssTolA
6. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโพรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชั่นพาราเวย์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 5 ที่ซึ่ง เปปไทด์ส่งสัญญาณที่จำเพาะกับแทพพาราเวย์ที่ใช้แทน ssTolA เลือกได้จาก CueO, DmsA, FdnG, FdoG, HyA, NapA, Sufi, WcaM, YagT, YcbK, YcdB, YdhX, หรือ YnfE
7. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโพรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชั่นพาราเวย์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 1 ที่ซึ่ง โพรตีนบ่งชี้ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ คือ เอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (β -lactamase)
8. กระบวนการที่ใช้คัดเลือกโพรตีอีสอินอิบิเตอร์โดยอาศัยกระบวนการขันส่งโพรตีนทวินอาร์จีนีนทรานส์โลเคชั่นพาราเวย์ ตามข้อถือสิทธิข้อที่ 7 ที่ซึ่ง โพรตีนบ่งชี้ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะที่ใช้แทนที่เอนไซม์

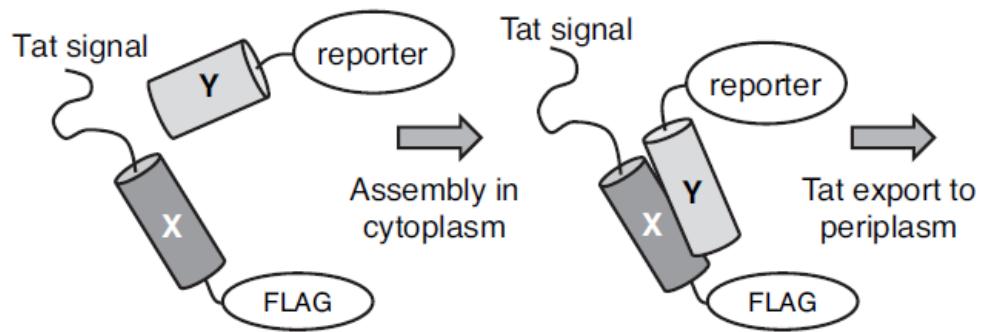
หน้า 2 ของจำนวน 2 หน้า

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

5

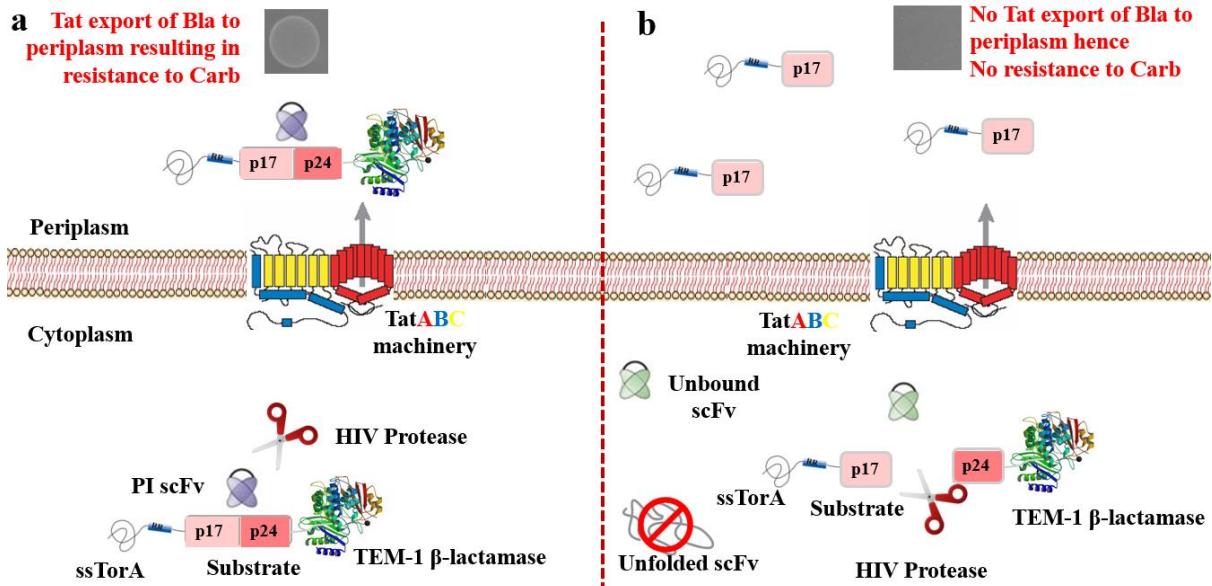


รูปที่ 1



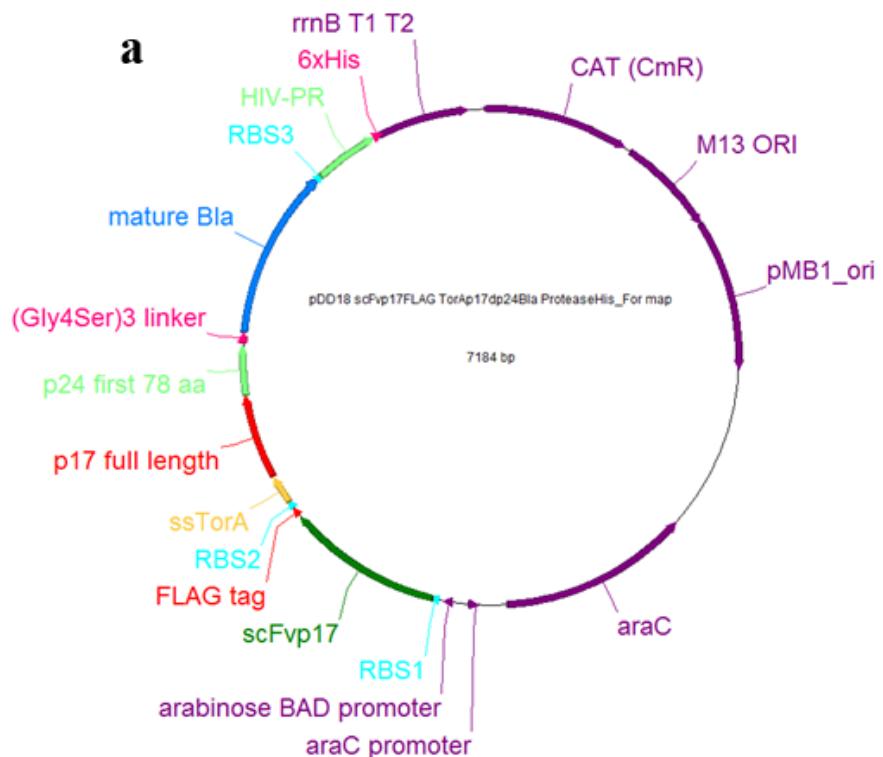
รูปที่ 2

Engineering Protease Inhibitor scFv using Tat Pathway

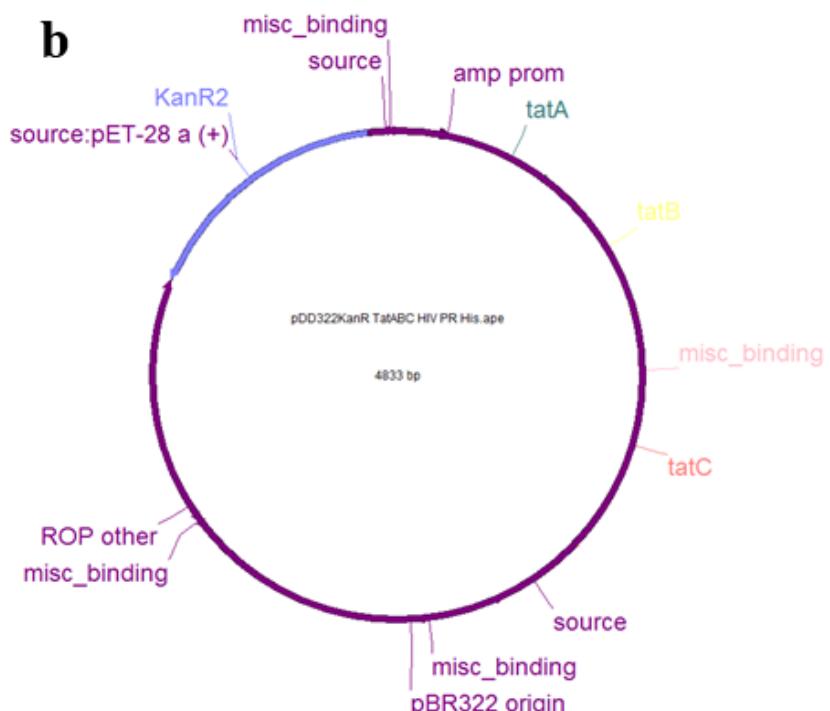


รูปที่ 3

หน้า 3 ของจำนวน 7 หน้า



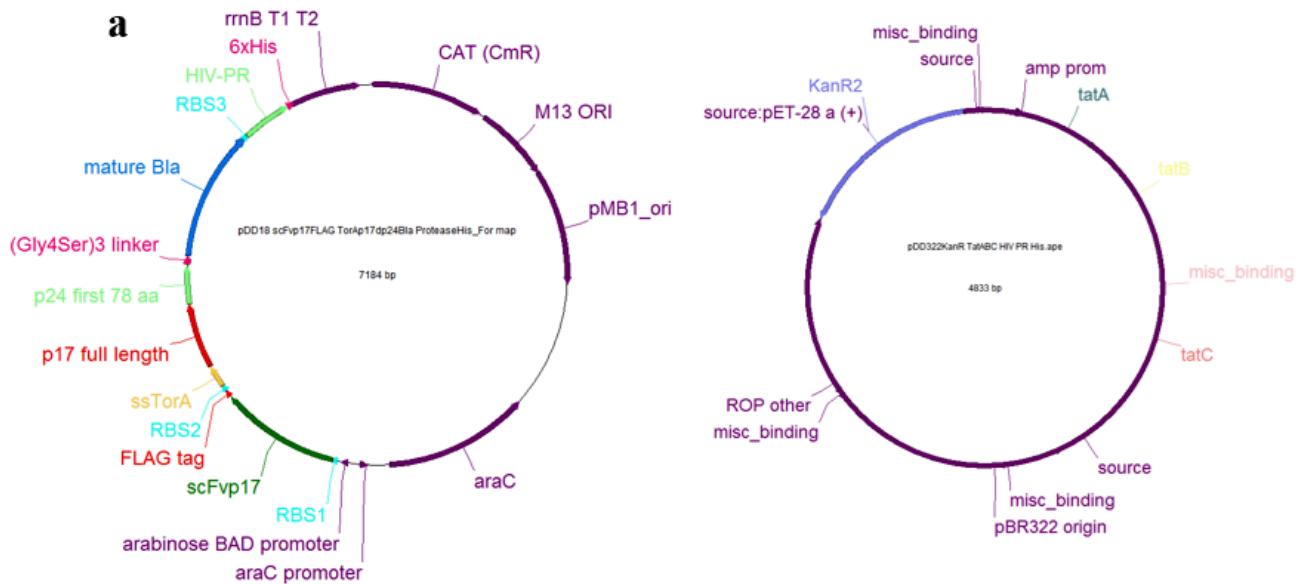
รูปที่ 4a



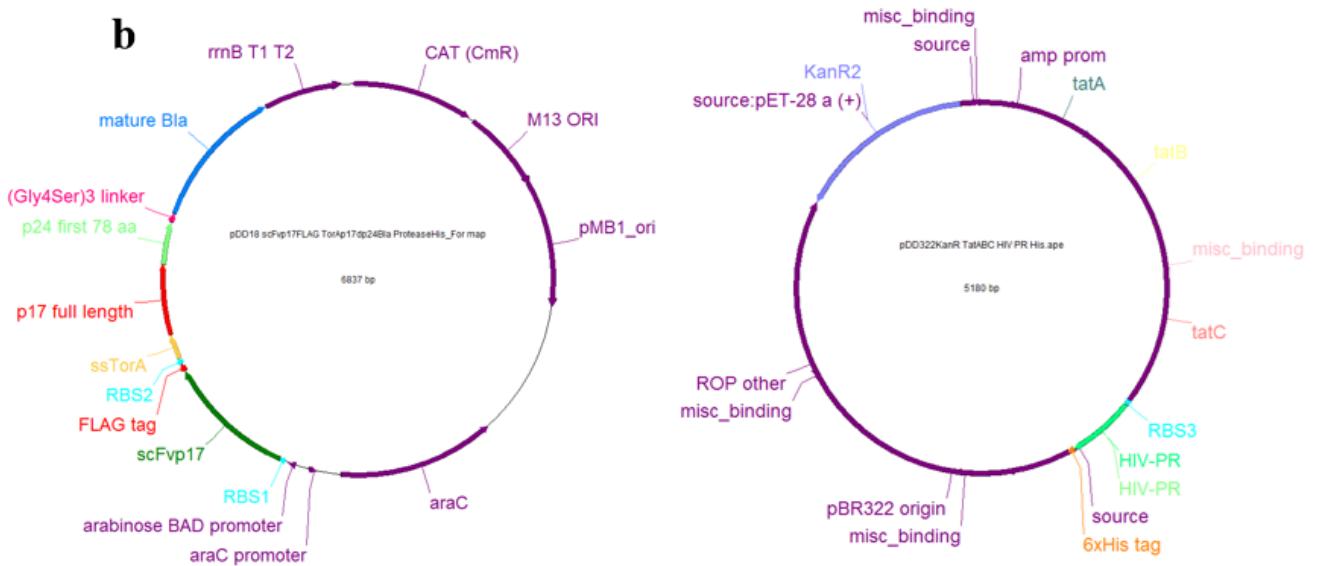
รูปที่ 4b

รูปที่ 4

หน้า 4 ของจำนวน 7 หน้า



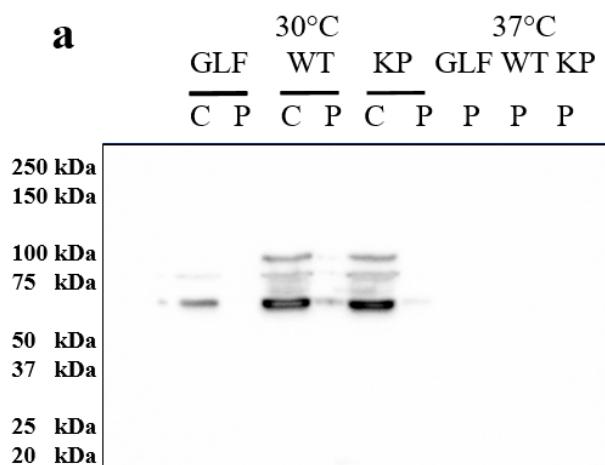
รูปที่ 5a



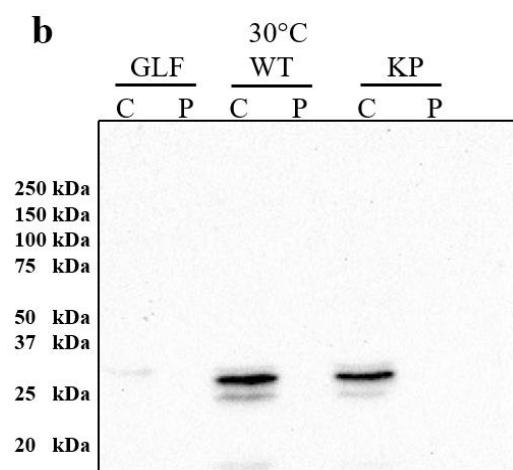
รูปที่ 5b

รูปที่ 5

หน้า 5 ของจำนวน 7 หน้า



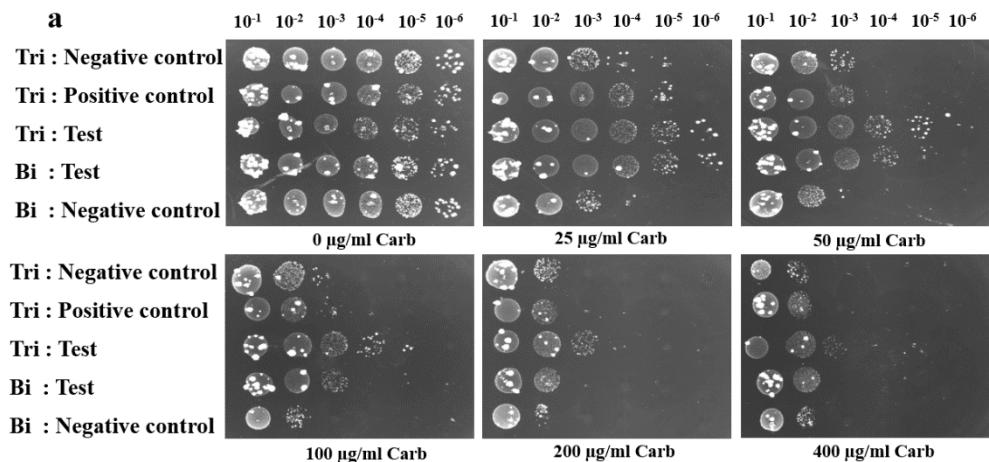
รูปที่ 6a



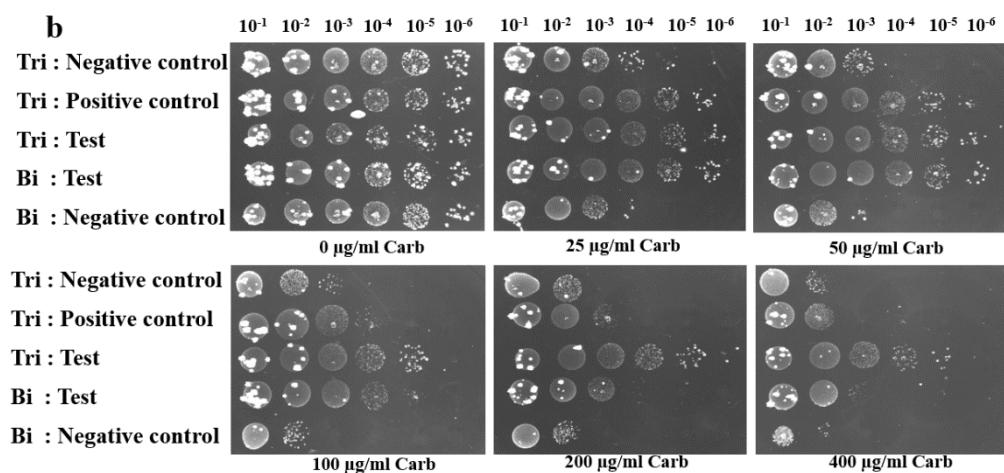
รูปที่ 6b

รูปที่ 6

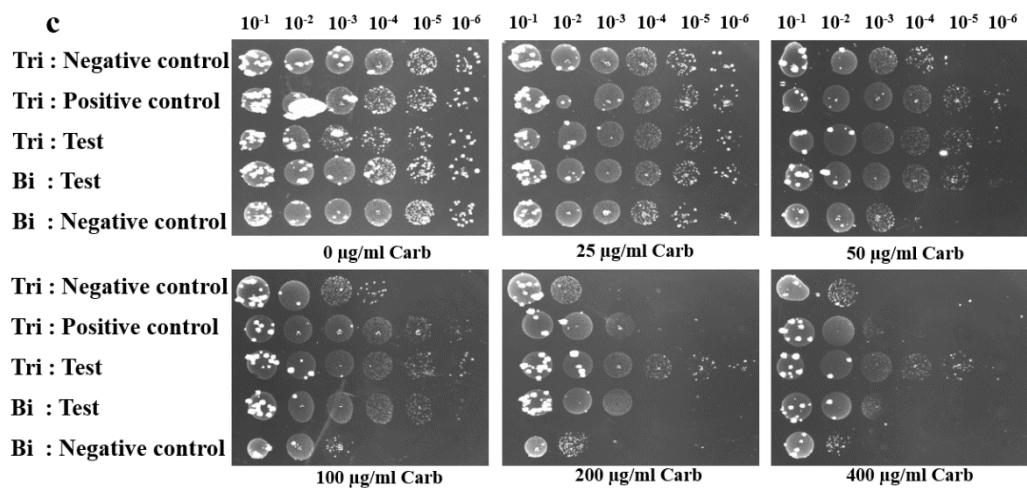
หน้า 6 ของจำนวน 7 หน้า



รูปที่ 7a

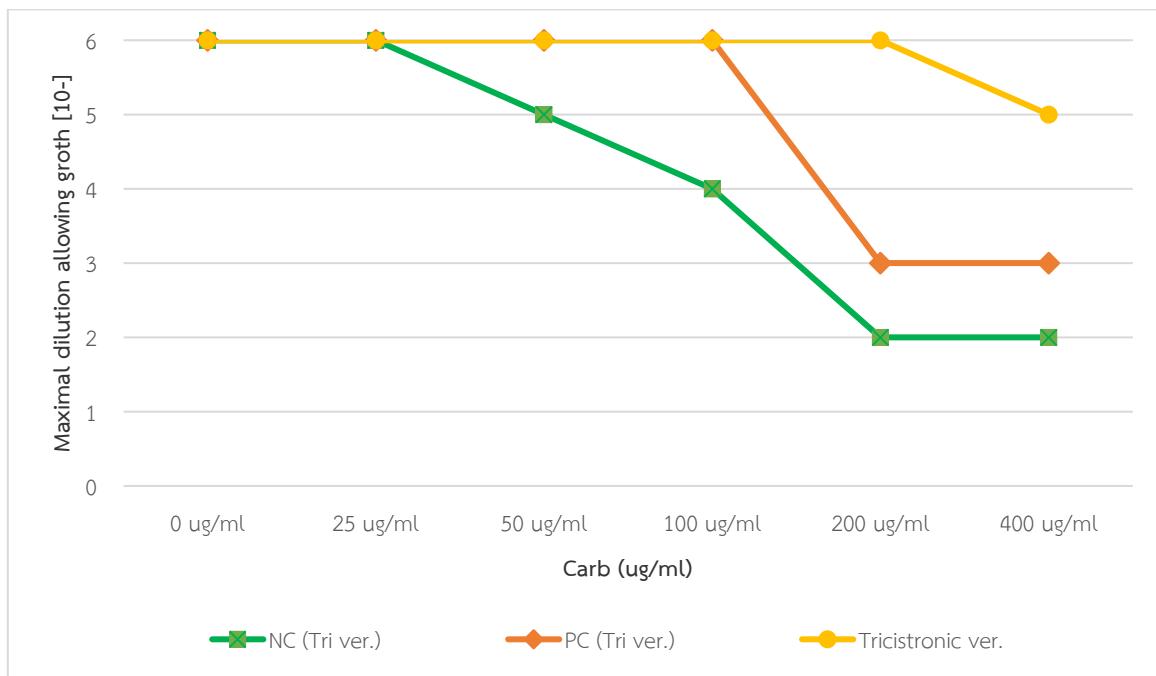


รูปที่ 7b

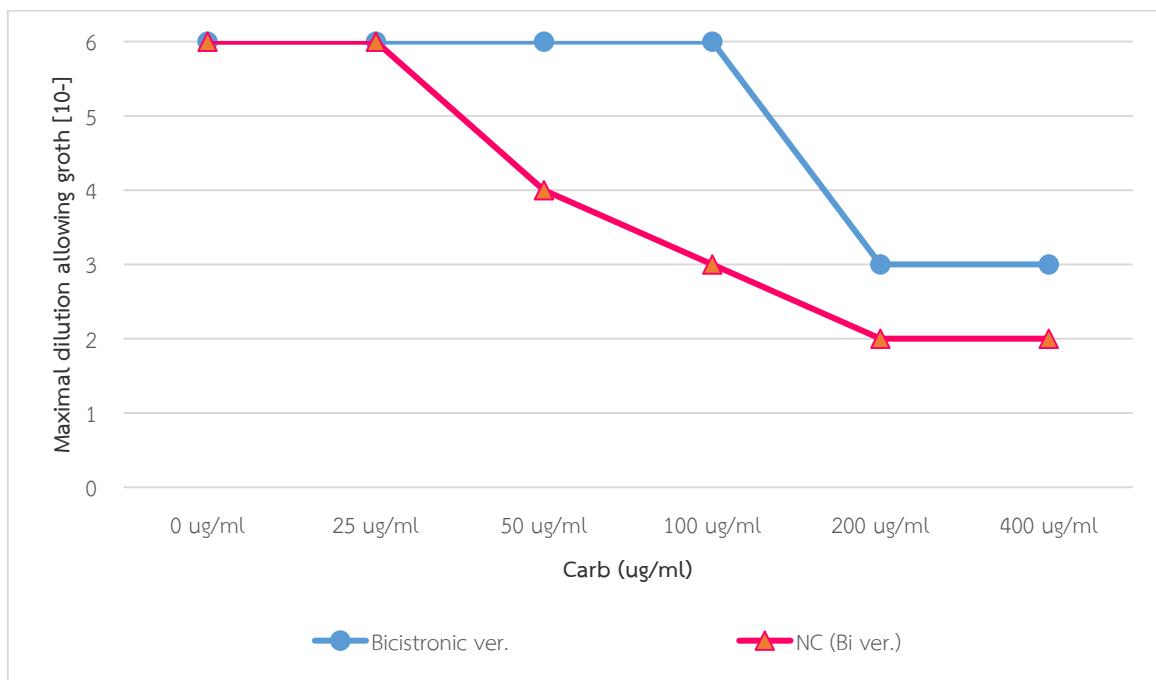


รูปที่ 7c

หน้า 7 ของจำนวน 7 หน้า



รูปที่ 7d



รูปที่ 7e

รูปที่ 7

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอการออกแบบระบบอันประกอบไปด้วยองค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้สำหรับคัดเลือกโปรตีอสอินซิบิเตอร์ เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีอสที่เป็นสาเหตุของโรคบางชนิดหรือที่เป็นส่วนสำคัญต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยใช้การทดสอบแบบอินวีโนในเซลล์

5 แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยองค์ประกอบและกระบวนการที่ใช้นี้สามารถนำไปคัดเลือกและวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโปรตีอสอินซิบิเตอร์ได้ นำไปคัดเลือกและวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตัดของสับสเตรทที่ถูกทำให้เกิดการกลایพันธุ์ต่างๆ โดยโปรตีอส หรือการตัดสับสเตรทตันแบบโดยโปรตีอสที่ถูกทำให้กลایพันธุ์ รวมถึงการนำไปใช้ในการคัดเลือกยีนใหม่ๆ (drug screening) ได้ด้วยเช่นกัน เทคนิคนี้มีพื้นฐานมาจากการประยุกต์ใช้ทวินอาร์เจนทranสโลเคชั่นพาราเวียหรือแทพาราเวียของแบคทีเรีย *E. coli*

10 เทคนิคนี้สามารถทำได้โดยการให้แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตพิวชั่นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยสับสเตรทอยู่ ตรงกลางและมีเป้าหมายสัญญาณของแทพาราเวียอยู่ที่ปลายเอ็น (N-terminus) และมีรีพอร์ตเตอร์โปรตีน เป็นเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (β -lactamase) อยู่ที่ปลายซี (C-terminus) รวมทั้งโปรตีอสและโปรตีอสอินซิบิเตอร์ไปพร้อมๆ กัน เมื่อโปรตีอสอินซิบิเตอร์ยับยั้งการย่อยที่คลีเวจไซต์ของสับสเตรทโดยโปรตีอสจะเกิด การขันส่งด้วยแทพาราเวียของพิวชั่นโปรตีนที่ไม่ถูกตัดจากไซโตพลาสซึมไปยังเพอริพลาสซึม และทำให้เซลล์ 15 แบคทีเรีย *E. coli* สามารถทนยาปฏิชีวนะได้ ทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้คัดเลือกโปรตีอสอินซิบิเตอร์ได้