

Abstract (บทคัดย่อ)**Project Code : TRG5880162****Project Title : การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในระยะต่าง ๆ ของผู้ป่วย
ไข้เลือดออก****Investigator :**ผศ. ดร. ปานน้ำทิพย์ พิทักษ์สัจจะกุล ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล**E-mail Address:** pannamthip.pit@mahidol.ac.th**Project Period: 2 ปี****1. บทคัดย่อ**

ที่มาของปัญหา: โรคไข้เดงกีเป็นโรคที่มีความสำคัญมากในประเทศเขตร้อนชื้น โดยมีการประมาณว่าในแต่ละปีมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อ 50-100 ล้านรายทั่วโลก ปัญหาที่สำคัญของกลไกการเกิดโรคของเชื้อไวรัสเดงกีคือ การส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงขึ้นในการติดเชื้อครั้งที่สอง (secondary infection) โดยเชื้อไวรัสเดงกีที่ต่างสายพันธุ์กับการติดเชื้อครั้งแรก เรียกกลไกที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคเช่นนี้ว่า Antibody Dependent Enhancement ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีน หรือยารักษาไข้เดงกีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 สายพันธุ์

จากการศึกษาในระยะหลังพบว่า การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแอนติบอดี (antibody germline) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบวัคซีนได้ เช่นการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันเชื้อ HIV (Chen et al., 2012) สำหรับเชื้อไวรัสเดงกี ได้มีการศึกษาถึงลักษณะของ heavy chain CRD3 ของผู้ป่วยไข้เลือดออกในระยะต่างๆ พบว่า แอนติบอดีที่มีในร่างกายของผู้ติดเชื้อในระยะต่างๆ เช่น ระยะเฉียบพลัน ระยะฟื้นไข้ และระยะหลังการติดเชื้อ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Parameswaran et al., 2013) นอกจากนี้เนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยได้มีการศึกษาลักษณะของ germline antibody ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ (Pitaksajakul et al., 2014) ซึ่งพบความแตกต่างกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณลักษณะต่างกัน อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวผลิตจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เลือดออกในระยะเฉียบพลัน และได้ผ่านการคัดเลือกคุณสมบัติในการยับยั้งไข้เลือดออกว่ามีคุณสมบัติค่อนข้างใกล้เคียงกัน ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาลักษณะของ germline antibody ในผู้ป่วยไข้เลือดออกในระยะต่างๆ คือ ระยะเฉียบพลัน ระยะฟื้นไข้ และระยะหลังการติดเชื้อ เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างของกลุ่มแอนติบอดี ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการพัฒนาวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก โดยเปรียบเทียบลักษณะของ germline antibody ของอาสาสมัครที่ได้รับการฉีดวัคซีน และลักษณะของ germline antibody ที่มีอยู่ในผู้ป่วยในระยะต่างๆ นอกจากนั้นผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานของลักษณะแอนติบอดีที่มีอยู่ในผู้ป่วยไข้เลือดออกในประเทศไทย เนื่องจากข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้ยังมีอยู่อย่างจำกัด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยในอนาคต ทั้งในการพัฒนาวัคซีน หรือการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีแอนติบอดีสำหรับรักษาโรคไข้เลือดออกต่อไป นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เฉพาะต่อ Envelop และ NS1 ที่ได้เตรียมไว้แล้ว ที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เพื่อศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของแอนติบอดีที่มีคุณลักษณะแตกต่างกัน

การดำเนินการวิจัย: การวิจัยครั้งนี้จะเริ่มด้วยการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครจำนวน 5 คนที่ยินดีเข้าร่วมโครงการ โดยจะเก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 10 c.c. จำนวน 3 ครั้ง ครั้งแรกหลังจากติดเชื้อและเกิดอาการไม่เกิน 7 วัน ครั้งที่สองคือหลังจากมีไข้เป็นเวลาประมาณ 14 วัน และครั้งที่สามหลังจากผู้ป่วยฟื้นจากไข้เป็น

เวลา 3-6 เดือน ตัวอย่างเลือด ที่ได้จะนำมาปั่นเพื่อแยกส่วนซีรัมออก และนำส่วนที่เหลือมาสกัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อใช้ในการสกัด RNA และ สร้าง cDNA และใช้ในการเพิ่มปริมาณส่วนแอนติบอดียีน แอนติบอดียีนที่ได้จะนำมาสร้างเป็นคลังฟาจ (phage library) เพื่อคัดเลือกเฉพาะแอนติบอดีที่จับเฉพาะกับ envelop protein แอนติบอดีที่ผ่านการคัดเลือกจะนำไปศึกษาลักษณะลำดับเบสของแอนติบอดี และวิเคราะห์ข้อมูลโดยฐานข้อมูล Immonogenetics (IMGT) และนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างแอนติบอดีที่ได้จากผู้ป่วยในระยะต่างๆ สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี เราจะทำการสกัด RNA จากเซลล์ไฮบริโดมา เพื่อสังเคราะห์ cDNA และใช้ในการเพิ่มปริมาณแอนติบอดียีน ลำดับเบสของแอนติบอดียีนที่ได้จะนำมาวิเคราะห์โดยฐานข้อมูล IMGT

ผลการทดลอง:

จากการเก็บตัวอย่างเลือดคนไข้ไข้เลือดออกทั้งหมด 3 ระยะ เราได้ตัวอย่างเลือดในระยะเฉียบพลัน 36 ตัวอย่าง ระยะฟื้นไข้ 32 ตัวอย่าง และระยะหลังการติดเชื้อ 12 ตัวอย่าง โดยในจำนวนนี้มี 10 คน ที่ติดเชื้อไข้เลือดออกสายพันธุ์ที่ 2 ที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งขณะนี้อยู่ระหว่างการเพิ่มจำนวนแอนติบอดียีน เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) ที่เฉพาะต่อเชื้อไวรัสไข้เลือดออก เราได้ศึกษา Mab ทั้งหมด 2 กลุ่ม คือ Anti-E และ Anti-NS1 พบว่า Anti-E มีลักษณะทางจีโนไทป์ที่แตกต่างกันได้เป็น 2 กลุ่มหลัก เช่นเดียวกับที่เคยมีการศึกษามาก่อน แต่เราพบว่า Anti-NS1 แต่ละตัวมีลำดับเบสที่เหมือนกัน แต่มีความแตกต่างของ subclass IgG ที่ใช้ ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติด้านเอพิโทปที่จำเพาะ และคุณสมบัติด้านการลดการเพิ่มจำนวนไวรัสจากเซลล์ที่ติดเชื้อ

Abstract

Background. Dengue disease is one of important viral diseases in tropical region. It was estimated that 50-100 millions of dengue cases were reported each year. The important pathogenesis of dengue diseases is their severity occurring in secondary infection that called Antibody dependent Enhancement (ADE). However, neither effective treatment nor vaccine to protect all 4 serotypes of Dengue virus is available.

Recently, the study of antibody germline can be applied for vaccine design of target pathogen, for example, vaccine for HIV (Chen et al., 2012). For dengue virus, study of heavy chain CDR3 from dengue patients at acute, convalescence, and post-recovery showed significant differentiation (Parameswaran et al., 2012). In addition, we previously reported the genetic information of HuMAbs isolated from Thai dengue patients from secondary DENV2 acute infection. In this study, we continue to study 2 different samples of antibody directly isolated from dengue patients, and antibody from HuMAbs. The information obtained from this study can be used as basic information of genetic characteristic of antibody from Thai dengue patients, and can be further applied for dengue vaccine development in the future.

Methods. For characterization of genetic information obtained from dengue patients, 10 ml of blood samples were collected for RNA isolation of isolated PBMC, and synthesized cDNA. These cDNA were used for antibody gene amplification. The fragment of antibody genes will be further used for antibody library construction, selection to envelope protein, and analyzed the antibody sequences by IMGT database. For HuMAbs characterization, RNA was isolated from hybridoma, and used for cDNA synthesis, and antibody gene amplification. The obtained sequences were analyzed using IMGT.

Results. Total of 36 blood samples from acute, 32 from convalescence, and 12 from post-recovery were collected. Among this number, 10 samples were DENV2 that were used in this study. Antibody gene were amplified, and will be used for antibody library construction. For HuMAbs study, 2 groups of HuMAbs were used in this study, anti-E and anti-NS1. For anti-E, most of anti-E were used the major 2 groups of heavy chain germline (IGHV1-69 and IGHV3-23) as same as our previous study. For anti-NS1, all of anti-NS1 HuMAbs showed identical variable gene sequences. However, they showed different in IgG subclass and also their specific epitope. Also, different in viral replication inhibition were observed.

Keywords: Recombinant IgG; Neutralization; Dengue virus; Cross-neutralizing; Germline

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อสร้างคลังฟาจแอนติบอดีจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย登革ที่ในระยะเฉียบพลัน ระยะหลังมีไข้ และระยะฟื้นไข้

2.2 เพื่อคัดเลือกฟาจแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน Envelop ของเชื้อ登革ที่ไวรัสโดยวิธี panning

2.3 เพื่อศึกษาลำดับเบสของแอนติบอดีที่ยีนที่แยกได้จากผู้ป่วย登革ที่ในระยะเฉียบพลัน และระยะฟื้นไข้ หลังจากทำการคัดเลือกด้วยวิธีฟาจดิสเพลย์

2.4 เพื่อศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของแอนติบอดี ยีน จากเซลล์ไฮบริโดมา ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับเฉพาะกับโปรตีน E และ NS1

2.5 เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัส登革ที่ของแอนติบอดีที่เฉพาะต่อโปรตีน E และ NS1

3. บทสรุปผู้บริหาร

โรคไข้เลือดออกจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยโรคนี้เกิดจากการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก登革ที่ (Dengue virus) โดยมียุงลายสายพันธุ์ *Aedes aegypti* เป็นพาหะนำโรคหลัก (Clyde et al., 2006) โดยไข้เลือดออกสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่มอาการ คือ Dengue Fever (DF), Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), และ Dengue Shock Syndrome (DSS) จากรายงานขององค์การอนามัยโลก พบว่า 2 ใน 5 ของประชากรโลกมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก และพบว่าประชากรประมาณ 50-100 ล้านคนทั่วโลกติดเชื้อไวรัส登革ที่ (WHO, 2009) ซึ่งในจำนวนนี้มีผู้ป่วยจำนวนถึง 500,000 คนที่เป็นโรคไข้เลือดออกชนิดรุนแรง (DHF or DSS) (Qi et al., 2008) ที่เป็นกลุ่มอาการที่เป็นสาเหตุให้ถึงแก่ชีวิตได้ ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตถึง 20,000 คนต่อปี (Gubler, 2002) ซึ่งในการควบคุมและป้องกันโรคไข้เลือดออกนี้ ขณะนี้ยังไม่มียาโดยเฉพาะ สำหรับวัคซีนป้องกันไข้เลือดออกนั้น วัคซีนที่ผลิตขึ้นจำเป็นต้องสามารถสร้างภูมิคุ้มกันในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส登革ที่ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ เพื่อป้องกันการก่อโรคที่รุนแรงยิ่งขึ้น เนื่องมาจากลักษณะการก่อโรคที่เรียกว่า Antibody dependence enhancement (ADE)

โดยจะเห็นได้จากการทดสอบวัคซีน ChimeriVax-DENV ของบริษัท Sanofi ในระยะเริ่มแรกมีความปลอดภัย และสร้างภูมิคุ้มกันได้ในระดับที่ดี แต่ต่อมาเมื่อทำการทดสอบวัคซีนใน phase 2b พบว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถให้ภูมิคุ้มกันสำหรับเชื้อไวรัส登革ที่สายพันธุ์ DENV2 ได้เพียง 30.2 % เท่านั้น

ในการออกแบบ และพัฒนาวัคซีนในระยะหลัง ได้มีการนำลักษณะลำดับกรดอะมิโนของ antibody มาใช้ร่วมกับการพัฒนาวัคซีนต่อเชื้อไวรัสหลายชนิด โดยศึกษาถึงลำดับกรดอะมิโนของแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสต่าง ๆ เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ germline antibody (Bedouelle et al., 2006;