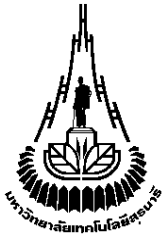
รหัสโครงการ SUT3-304-53-36-01



รายงานการวิจัย

การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ของมนุษย์ เพื่อการตรวจวิเคราะห์และรักษา โรคพิษสุนัขบ้า ด้วยเทคโนโลยีเฟจ

Production of human monoclonal antibody for diagnosis and therapy of rabies by phage display technology

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-53-36-01

รายงานการวิจัย

การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ของมนุษย์ เพื่อการตรวจวิเคราะห์และรักษา โรคพิษสุนัขบ้า ด้วยเทคโนโลยีเฟจ

Production of human monoclonal antibody for diagnosis and therapy of rabies by phage display technology

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. ผกามาศ ขาวปลอด

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา

สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553 - 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2553 ถึง 2555 โดยมีกรรมการจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวณัชชา พฤกษาเมธานันท์ นักศึกษาปริญญาโท ที่ได้เป็นผู้ช่วยวิจัยหลักในการทำการคัดเลือกและวิเคราะห์เฟจ โดยใช้ผลงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ขอขอบคุณ นางสาวสุจินตนา ชุมแสง และดร. นันทนิจ จารุเศรณีย์ นักวิจัยในห้องปฏิบัติการ ที่ได้ทำหน้าที่สร้างคลังเฟจ ซึ่งได้เลือดจาก นายสัตวแพทย์ธนัท กุลกาจณาวรรณ และนายสัตวแพทย์สุทัศน์ แสงชูวงศ์ นางสาวสุจินตนา ชุมแสง และนางสาวณัชชา พฤกษาเมธานันท์ เป็นต้นแบบในการสร้างคลัง อีกทั้งขอขอบคุณ คุณปิยมาศ มหาบุญญานนท์ เจ้าหน้าที่บริหารจัดการทรัพย์สินทางปัญญา ของ มทส ที่ได้ช่วยเหลือในขั้นตอนการจดสิทธิบัตรเป็นอย่างดี นอกจากนี้แล้วยังขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ นางสาวเพ็ญสุดา สมภูงา นางสาวสุภมาส บัณฑิตสาธิสรรค์ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้า ถูกคัดเลือกจากคลังแอนติบอดี (scFv) มนุษย์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า (คลัง YAMO-I) และคลังที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัส (คลัง Yamo-Rb) ด้วยเทคโนโลยีเฟจ โดยทำการคัดเลือก (ไบโอแพนนิ่ง) จำนวน 1-5 รอบ โดยใช้เชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าที่หมดฤทธิ์แล้ว (inactivated virus) 2 ชนิด คือ PCEC และ PVRV เป็นเป้าหมายในการคัดเลือก ซึ่งสามารถคัดเลือกโคลนที่สามารถจับจำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้าได้จำนวน 14 โคลน ได้แก่ IRA7c, IIIRC2c, IRC3c, IYC11c, IYC12c, IYD1c, IYF5c, IIRD5v, IIYB5v, IIYG4v, IIYE5v, IIYG8v, IIYD4v และ IVB4cv ผลจากการทดสอบโดยใช้วิธีการอีไลซ่าพบว่า โคลนเหล่านี้มีความสามารถในการจับจำเพาะได้ดีต่อเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือก ลำดับเบสของดีเอนเอได้ถูกวิเคราะห์โดยวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ โมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้าที่แสดงบนผิวเฟจ (Phage scFv) ทั้ง 13 โคลนถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า (Neutralization) ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า มีเพียง IRA7c และ IIIRC2c ที่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าได้ ดังนั้นจึงได้เลือกแอนติบอดีเพียง 4 โคลนมาผลิต และทำให้บริสุทธิ์ได้ดีด้วยวิธีการ IMAC ได้แก่ IYF5c, IIYG4v, IRA7c และ IIIRC2c โดยทำการนำยีนของแอนติบอดีเหล่านี้ไปใส่ไว้ใน พลาสมิด pET27b(+) เพื่อให้ยีนทำการแสดงออก โดยการผลิตเป็นแอนติบอดี scFv แบบอิสระในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าโดยใช้แอนติบอดี scFv แบบอิสระ (soluble scFv)ยืนยันผลการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แสดงบนผิวเฟจ (Phage scFv) คือมีเพียง IRA7c และ IIIRC2c ซึ่งได้รับการคัดเลือกมาจากคลังแอนติบอดีมนุษย์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อพิษสุนัขบ้าเท่านั้น ที่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าได้ โดยมีความสามารถยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า 4.54 IU/mg และ 0.20 IU/mg ตามลำดับซึ่งชี้นส่วนของแอนติบอดีมนุษย์ทั้ง 2 นี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปใช้เป็นแอนติบอดีสำหรับการรักษา หรือป้องกันโรคได้ต่อไป นอกจากนั้นแล้วยังมีผลการทดลองที่น่าสนใจคือ แอนติบอดีโคลน IYF5c ซึ่งแสดงความสามารถในการจับได้เป็นอย่างดีกับเชื้อไวรัสชนิดตาย (PCEC) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ ELISA แต่กลับไม่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคได้เลย ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ในการคาดเดาความสามารถของแอนติบอดีในการยับยั้งโรคได้จริง อย่างไรก็ตามแอนติบอดีนี้ อาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจสอบเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าในระดับ strain ได้ต่อไป การวิจัยนี้นำไปสู่การยื่นขอจดสิทธิบัตร 5 ฉบับเพื่อคุ้มครองลำดับกรดอะมิโนของแอนติบอดีทั้ง 14 ชนิดที่ได้ค้นพบ และผลงานนำเสนอและตีพิมพ์ในรายงานการประชุมฉบับเต็มของ งานประชุมระดับนานาชาติ IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, NANOMED ในปี 2555 ซึ่งยังได้รับรางวัล ผู้เข้ารอบสุดท้ายในการเป็นผลงานตีพิมพ์ดีเยี่ยม อีกด้วย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Human monoclonal antibodies against Rabies virus were selected from non-immunized human scFv library (YAMO-I library) and immunized library (Yamo-Rb library) by using phage display technology. The biopanning was performed for 1-5 rounds by using two types of inactivated rabies vaccines as targets. These are purified vero cell rabies vaccine (PVRV) and purified chick embryo cell vaccine (PCEC). A total of 14 positive clones from various methods of biopanning that can bind to rabies; IRA7c, IIIRC2c, IRC3c, IYC11c, IYC12c, IYD1c, IYF5c, IIRD5v, IIYB5v, IIYG4v, IIYE5v, IIYG8v, IIYD4v and IVB4cv, were isolated and their genes were sequenced. We found that clones IVB4cv and IRA7c were identical.These two clones were isolated from the same library by using different biopanning method. Thus, there are a total of 13 positive clones. Phage scFv were tested for neutralization capacity by the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). Only clones IRA7c and IIIRC2c showed neutralization of the rabies virus *in vitro*. Four scFv antibodies genes were transferred into pET27b (+) expression vector for over-expression in *E. coli* BL21 and purified by Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Neutralization assay using soluble scFv confirm and indicated that only clones IRA7c and IIIC2c, which were derived from immunized library, could neutralize the virus at 4.54 and 0.20 IU/mg, respectively. These two clones could be used as the basis for the development into therapeutic antibodies in the future. It is interesting to note that clone IYF5c, which shows very strong binding to PCEC virus by ELISA method, couldn't neutralize the virus. These results indicated that ELISA result can't be used to predict neutralization activity of the antibody. Nevertheless, clone IYF5c could be developed as the strain specific detection probe in the future. The outcome of this research project has led to the filing of 5 patent applications, claming the amino acid sequences of the isolated 14 scFv antibody clones as well as one publication in a proceeding, which was awarded "Best Conference Paper Finalist" by the IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, NANOMED, in the year 2012.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ **3**

บทคัดย่อภาษาไทย **4**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ **5**

สารบัญ **6**

บทที่ 1 : บทนำ **7**

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 7

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 8

ขอบเขตของการวิจัย 8

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 8

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรม และ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง **10**

บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย **14**

บทที่ 4 : บทสรุป **17**

สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย 17

ข้อเสนอแนะ 18

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย **21**

ภาคผนวก **28**

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน 28

1. ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ 28
2. การยื่นจดสิทธิบัตร 28

ภาคผนวก ข การผลิตบุคลากร 30

ประวัติผู้วิจัยหลัก **31**

ประวัติผู้วิจัยร่วม **32**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1 : บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคที่ยังคงไม่มีทางรักษา ผู้ที่สัมผัสโรคเมื่อแสดงอาการแล้วจะเสียชีวิตทุกราย ในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ทั่วโลกไม่ต่ำกว่าปีละ 50,000 คน และ 90% ของผู้ที่เสียชีวิตจะอยู่ในประเทศในเอเชีย เช่น อินเดีย บังคลาเทศ จีน ฟิลิปปินส์ พม่า ไทย เป็นต้น มีผู้ที่สัมผัสโรคและต้องได้รับการฉีดวัคซีนไม่ต่ำกว่าปีละประมาณ 10 ล้านคนซึ่งในจำนวนนี้มี ไม่น้อยกว่า 30% เป็นผู้ที่ควรได้เซรุ่มหรือ passive antibody รอบแผลทันทีที่ถูกกัด เพื่อป้องกันการเกิดโรคได้อย่างแท้จริง ในประเทศไทย คนไข้ที่มารับการรักษาและต้องได้รับเซรุ่มที่สถานเสาวภามีประมาณปีละ 40% ของคนไข้ที่สัมผัสโรคทั้งหมด ส่วนในประเทศที่กำลังพัฒนาอื่นทั่วโลกมีผู้ที่สัมผัสโรคและได้รับเซรุ่มมีเพียงประมาณ 3% เท่านั้น ประเทศไทยเป็นหนึ่งในไม่กี่ประเทศในเอเชียที่สามารถผลิตเซรุ่มจากม้า (Equine Rabies Immunoglobulin ; ERIG) และจากคน (Human Rabies Immunoglobulin; HRIG) ภายใต้มาตรฐาน GMP (Good Manufacture Practice) อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาและอุปสรรคทั้งในแง่ของการผลิตและการนำมาใช้หลายประการอาทิเช่น

1. ปัญหาการขาดแคลนอาสาสมัครและสัตว์ทดลอง เพราะการฉีดวัคซีนกระตุ้นอาสาสมัครและม้าเพื่อนำซีรั่มมาผลิต ERIG และ HRIG พบว่าเมื่อฉีดวัคซีนกระตุ้นซ้ำบ่อยๆทั้งม้าและอาสาสมัครจะมีการตอบสนองของระดับ neutralizing antibody ไม่ดีนักทำให้มีผลต่อระดับแอนติบอดีของ final product ซึ่งทำให้ต้องเปลี่ยนม้าหรืออาสาสมัครชุดใหม่ทำให้เสียเวลาและเพิ่มต้นทุนการผลิตขึ้น
2. ปัญหาการปนเปื้อนของไวรัสหรือโปรตีนในคนบางชนิดที่ไม่สามารถกำจัดได้ในระหว่างกระบวนการผลิต
3. ปัญหาจากการใช้ เนื่องจากเซรุ่มที่ผลิตจากม้าอาจทำให้เกิดการแพ้ (anaphylaxis) เนื่องจาก ERIG เป็น foreign protein เมื่อนำมาใช้ในคน จึงทำให้ต้องมีการทำ skin test ก่อนใช้ซึ่งหากให้ผลบวกจำเป็นต้องเปลี่ยนไปใช้ HRIG ซึ่งอาจขาดแคลนหรือมีราคาแพงกว่า ERIG หลายเท่า

ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม โดยใช้เทคโนโลยีเฟจ เพื่อการผลิต แอนติบอดีย์มนุษย์ต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจึงมีความสำคัญและเหมาะสมในการนำมาใช้ในแง่ของ therapeutic use สำหรับป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่สุด นอกเหนือจากการนำมาใช้ในด้านการตรวจวิเคราะห์ (diagnostic) เช่น การผลิต conjugate (anti-rabies conjugated FITC) หรือ การพัฒนา rapid diagnostic kit (ICT-kit) เป็นต้น และที่สำคัญที่สุดคือเรียนรู้และการพัฒนาคนเพื่อนำไปสู่การผลิตแอนติบอดีย์มนุษย์ชนิดอื่นๆเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาการรักษาโรคติดเชื้อและโรคอื่นๆที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยต่อไป โดยเฉพาะในกลุ่มโรคที่ไม่ได้รับการสนใจจากประเทศที่พัฒนาแล้วเช่นโรคพิษสุนัขบ้าเป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนา ทั้งบุคคลกร และเทคโนโลยีในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีมนุษย์ต้นแบบ เพื่อการรักษา และ วินิจฉัย โรคพิษสุนัขบ้า โดยแบ่งเป็นวัตถุประสงค์ย่อยต่างๆ ดังนี้

1. เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการทำการคัดหาเฟจที่แสดงโมโนโคลนอล แอนติบอดี (bio-panning) ส่วน scFv ที่สามารถจับกับไวรัสที่ทำให้เกิดโรค พิษสุนัขบ้า ได้อย่างจำเพาะเจาะจงจากคลังของ เฟจ แอนติบอดี “ย่าโม 1” ซึ่งเป็นคลังของ แอนติบอดีมนุษย์ที่มีความหลากหลายสูง
2. เพื่อทำการสร้างคลังของเฟจที่แสดงโมโนโคลนอล แอนติบอดี ส่วน scFv ที่มีความ จำเพาะต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า
3. เพื่อทำการคัดหาเฟจที่แสดงโมโนโคลนอล แอนติบอดี ส่วน scFv ที่สามารถจับกับไวรัสที่ทำให้เกิดโรค พิษสุนัขบ้า จากคลังที่ได้สร้างขึ้นในข้อ 2 ด้วยวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นจากวิธีการในข้อ 1
4. เพื่อใช้วิธีการ ELISA ในการตรวจคุณสมบัติในการมีอันตรกริยากับไวรัส ของ โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่างๆ ที่ได้คัดหามาตามกระบวนการในข้อ 1 และ 3
5. เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโต และการทำลาย ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคพิษสุนัขบ้า โดยการทำการตรวจสอบในระดับเซลล์

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติ บอดี มนุษย์ ชนิด scFv จากคลังแอนติบอดีมนุษย์ “ย่าโม 1” ซึ่งเป็นคลังที่มีความหลากหลายสูง และทำการสร้างคลังโมโนโคลนอล แอนติบอดี มนุษย์ ที่มีภูมิคุ้มกันจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อพิษสุนัขบ้า แล้วคัดเลือก โมโนโคลนอลแอนติบอดี จากคลังทั้งสอง ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ทางการตรวจวินิจฉัย และรักษา โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ ELISA การย้อมเซลล์ การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อของไวรัส rabies ในระดับเซลล์ เพื่อให้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการใช้เทคนิควิศวกรรมแอนติบอดี ในการแปลงโครงสร้าง โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ได้คัดเลือกมาให้มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้ทางการตรวจ วินิจฉัย และรักษาต่อไป เช่น การเชื่อมกับ โปรตีนเรืองแสง, reporter protein สำหรับทำ biosensor, การสร้างเป็นแอนติบอดีโมเลกุลคู่ (diabody) หรือเปลี่ยน เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สมบูรณ์ เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาเป็น HRIG สำหรับผู้ที่ถูกสุนัขบ้ากัดต่อไป

ทฤษฎี สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) เป็นเทคโนโลยีที่มีศักยภาพสูงในการนำมาสร้างเป็น โมโนโคลนอลแอนติบอดี ของมนุษย์ ในรูปแบบต่างๆ (recombinant human monoclonal antibody) เพื่อการประยุกต์ใช้ที่หลากหลาย ข้อดีที่สำคัญของเทคโนโลยีนี้คือ สามารถใช้คัดหา และพัฒนาคุณสมบัติให้เหมาะสม เพื่อทำการผลิต แอนติบอดีได้อย่างไม่จำกัด ซึ่งการผลิตเป็น โมโนโคลนอลแอนติบอดี ของมนุษย์ ต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคพิษสุนัขบ้านั้น มีประโยชน์อย่างยิ่งใน

การใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ถูกสุนัขบ้ากัด เพราะไม่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ และปลอดจากการปนเปื้อน รวมทั้งยังสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วย

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

1.1 *โรคพิษสุนัขบ้า*

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคที่ยังคงไม่มีทางรักษาผู้ที่สัมผัสโรคเมื่อแสดงอาการแล้วจะเสียชีวิตทุกราย ในแต่ละปีมีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ทั่วโลกไม่ต่ำกว่าปีละ 50,000 คน และ 90% ของผู้ที่เสียชีวิตจะอยู่ในประเทศในเอเชีย เช่น อินเดีย บังคลาเทศ จีน ฟิลิปปินส์ พม่า ไทย เป็นต้น มีผู้ที่สัมผัสโรคและต้องได้รับการฉีดวัคซีนไม่ต่ำกว่าปีละประมาณ 10 ล้านคนซึ่งในจำนวนนี้มีผู้ที่ควรได้เซรุ่มไม่น้อยกว่า 30% เนื่องจากคนไข้ที่ได้รับวัคซีนต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 7-10 วันคนไข้จึงจะมีระดับแอนติบอดีย์ถึงระดับที่จะคุ้มกันโรคได้ การที่คนไข้ได้รับเซรุ่ม หรือ passive antibody รอบแผลทันทีที่ถูกกัดจะสามารถ neutralize ไวรัสได้ทันที คนไข้ที่มารับการรักษาและต้องได้รับเซรุ่มที่สถานเสาวภาประมาณปีละ 40% ของคนไข้ที่ฉีดวัคซีนหลังสัมผัสโรค แต่ในความเป็นจริงทั่วโลกมีผู้ที่สัมผัสโรคและได้รับเซรุ่มมีเพียงประมาณ 3% เท่านั้น ประเทศไทยเป็นหนึ่งในไม่กี่ประเทศในเอเชียที่สามารถผลิตเซรุ่มจากม้า (Equine Rabies Immunoglobulin ; ERIG) และจากคน (Human Rabies Immunoglobulin; HRIG) ภายใต้มาตรฐาน GMP (Good Manufacture Practice) อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาและอุปสรรคทั้งในแง่ของการผลิตและการนำมาใช้หลายประการดังนี้

ปัญหาจากม้าและอาสมัคร

1.ปัญหาการฉีดวัคซีนกระตุ้นอาสาสมัครและม้าเพื่อนำซีรั่มมาผลิต ERIG และ HRIG พบว่าเมื่อฉีดวัคซีนกระตุ้นซ้ำบ่อยๆทั้งม้าและอาสาสมัครจะมีการตอบสนองของระดับ neutralizing antibody ไม่ดีนักทำให้มีผลต่อระดับแอนติบอดีย์ของ final product ซึ่งทำให้ต้องเปลี่ยนม้าหรืออาสาสมัครชุดใหม่ทำให้เสียเวลาและเพิ่มต้นทุนการผลิตขึ้น

2.อาสาสมัครต้องเสียเวลา ค่าใช้จ่ายในการเดินทางและรบกวนหรือขาดรายได้จากการหยุดงานหลายครั้ง

3.ต้องการอาสาสมัครจำนวนมากเพื่อนำมาผลิต HRIG

4.อันตรายจากการปนเปื้อนของไวรัสหรือโปรตีนในคนบางชนิดที่ไม่สามารถกำจัดได้ในระหว่างกระบวนการผลิต

ปัญหาจากการใช้

1.เซรุ่มที่ผลิตจากม้าอาจทำให้เกิดการแพ้ (anaphylaxis) เนื่องจาก ERIG เป็น foreign protein เมื่อนำมาใช้ในคน จึงทำให้ต้องมีการทำ skin test ก่อนใช้ซึ่งหากให้ผลบวกจำเป็นต้องเปลี่ยนไปใช้ HRIG ซึ่งอาจขาดแคลนหรือมีราคาแพงกว่า ERIG หลายเท่า และหากไม่มี HRIG ก็จำเป็นต้องใช้ ERIG ด้วยความระมัดระวังและควรมีความพร้อมของเครื่องมือในกรณีการเกิด anaphylactic shock ซึ่งบางครั้งทำให้แพทย์บางท่านตัดสินใจไม่ใช้ ERIG และฉีดวัคซีนเพียงอย่างเดียวซึ่งจะทำให้คนไข้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าจากการไม่ได้รับเซรุ่มเพิ่มขึ้น

2. ERIG ที่ใช้จะอยู่ในรูปของ $F(ab')_2$ ซึ่งได้ตัดส่วนของ Fc ออกไปเพื่อลดการแพ้จากการใช้แอนติบอดีย์ซึ่งเป็นโปรตีนจากม้า ซึ่งความจริงแล้ว Fc มีบทบาทสำคัญในกลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและ immune cells ต่างๆนอกเหนือจากการจับกับไวรัสโดยตรงซึ่งมีผลโดยตรงในการป้องกันการติดเชื้อและกำจัดไวรัส

ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิต complete form ของแอนติบอดีย์ต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่เป็นโปรตีนของมนุษย์จึงมีความสำคัญและเหมาะสมในการนำมาใช้ในแง่ของ therapeutic use สำหรับป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่สุด นอกเหนือจากการนำมาใช้ในด้าน diagnostic เช่น การผลิต conjugate (anti-rabies conjugated FITC) หรือการพัฒนา rapid diagnostic kit (ICT-kit) เป็นต้น และที่สำคัญที่สุดคือเรียนรู้และการพัฒนาคนเพื่อนำไปสู่การผลิตแอนติบอดีย์มนุษย์ชนิดอื่นๆเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาการรักษาโรคติดเชื้อและโรคอื่นๆที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย

1.2 *การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ด้วยเทคโนโลยีเฟจ*

เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ หรือเทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) เป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจ และได้รับการพัฒนาเป็นอย่างยิ่งในช่วงเวลา 20 กว่าปีที่ผ่านมานี้ ทั้งนี้เป็นเพราะเทคโนโลยีนี้มีข้อเด่นที่สำคัญคือสามารถคัดเลือกได้ทั้งยีนและโปรตีนจากยีนนั้น ที่มีความสามารถในการมีอันตรกริยา (interaction) ที่ต้องการได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการคัดเลือกความสามารถในการจับกับสารเป้าหมาย (target) ที่สะดวกและรวดเร็ว ภายในห้องทดลอง (*in vitro*) [1-4] โปรตีนที่กล่าวมานี้อาจเป็นเปบไทด์ (peptide) เส้นสั้นๆ [1,5,6] หรือโปรตีนขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ความยาว 7-500 กรดอะมิโน [2,5] รวมทั้ง antibody ประเภทต่างๆ [7,8] ดังนั้นจึงพบว่าได้มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการศึกษาการมีอันตรกริยาระหว่างโปรตีนหลายประเภท เช่น การจับกันของเปบไทด์กับโปรตีนโดเมนชนิดต่างๆ [9] หรือการใช้เป็นแหล่งคลังของ cDNA เพื่อใช้ในการคัดหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา [3] คลังของเฟจที่แสดงเปบไทด์เส้นสั้นๆ ยังถูกใช้เป็นแหล่งในการหาตัวกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ [10,11] เปบไทด์เส้นสั้นๆที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการพัฒนายา (drug lead) ต่อไปได้ [12-16]

การให้ความสนใจที่จะนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจมาใช้เป็นแหล่งในการผลิต monoclonal antibody นั้นได้เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี 2533 [17] โดยในขั้นแรกเป็นการสร้างคลังของ antibody จากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย antigen แล้ว โดยทำการแสดงเฉพาะส่วนของ antibody ที่มีหน้าที่ในการจับคือ ส่วน Fab [18,19] หรือ สร้างเป็น antibody เส้นเดี่ยวที่มีเฉพาะส่วนที่มีหน้าที่ในการจับ เรียกว่าส่วน single chain variable fragments (form), scFv [17] antibody เหล่านี้จะถูกแสดงบนโปรตีนที่ปกคลุมผิวชนิดรอง (pIII) พบว่ามีความสำเร็จจากการใช้คลังเหล่านี้ในการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen หลายชนิด [7,20-27] แต่ข้อจำกัดประการสำคัญของการใช้วิธีการนี้คือต้องทำการกระตุ้นสัตว์ทดลองก่อนจึงเป็นการเสียเวลา และยังเป็นคลังที่มีเฉพาะ antibody ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย antigen ที่ใช้ อย่างไรก็ตามความสำเร็จนี้นับเป็นเครื่องชี้ว่าสามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจมาใช้ในการคัดเลือกและผลิต monoclonal antibody ที่มีความสามารถในการจับอย่างมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้จริง

การพัฒนาก้าวสำคัญที่ทำให้การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจในการผลิต monoclonal antibody เป็นที่แพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างสูง ทั้งในงานวิจัยขั้นพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ เริ่มต้นในเวลา 2 ปีต่อมา เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถสร้างคลังของ monoclonal antibody จากสัตว์ที่ไม่ได้รับการ

กระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนได้สำเร็จ (nonimmune library หรือ naïve library) [28] คลังชนิดนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยได้กว้างขวางกว่าคลังที่สร้างจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนหลายเท่า เพราะสามารถใช้ในการสร้าง monoclonal antibody ต่อ antigen เกือบทุกชนิดที่ต้องการ เนื่องจากคลังของ antibody ที่สร้างขึ้นนี้เป็นตัวแทนความเป็นไปได้ทั้งหมดจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ตามธรรมชาติ โดยพบว่า monoclonal antibody ที่คัดเลือกมาได้นั้นมีคุณภาพดีคือมีความสามารถในการจับ (affinity, ในช่วง 1-200 nM) และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูงเท่ากับ monoclonal antibody ที่สร้างจาก hybridoma [28-31]

คลังที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นมีหลายประเภท โดยแต่ละคลังก็มีความแตกต่างกันในด้านต่างๆ เช่น ความแตกต่างในชนิดของโปรตีนปกคลุมผิวที่ใช้แสดง antibody (pIII หรือ pVIII) แหล่งที่มาของ RNA ที่จะใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง โครงสร้างของ antibody ที่ใช้แสดง (แบบ Fab หรือ ScFv) ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้างคลัง (plasmid หรือ phagemid) สายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียที่ใช้ในการเลี้ยงเฟจ สายพันธุ์ของ helper phage หรือขั้นตอนการตัดต่อยีนเข้าไปในตัวเฟจ ทั้งนี้นักวิจัยกลุ่มใดจะใช้วิธีการไหนนั้นขึ้นอยู่กับความชำนาญ ประสบการณ์ และวัสดุที่มีอยู่ นอกจากนั้นแล้วในปัจจุบันยังมีความพยายามในการสร้างคลังจากเส้น ดีเอ็นเอสังเคราะห์ (synthetic oligonucleotide) [32-34] อีกด้วย

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอีกอย่างหนึ่งที่มีประโยชน์ในการสร้าง antibody ให้มีคุณภาพสูงคือมีความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการจับสูง (high specificity และ affinity) คือการนำ antibody ที่คัดได้จากคลังมาพัฒนาเป็น monoclonal antibody ที่มีคุณภาพดีขึ้น (maturation) โดยใช้หลักการกำกับวิวัฒนาการ (directed evolution) [8,35]ด้วยเทคนิคต่างๆเช่น การทำให้เกิดการกลายพันธ์อย่างสุ่มด้วยเทคนิคทาง PCR ที่มีความแม่นยำต่ำ (error prone PCR) [36,37] หรือ การใช้เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ (DNA shuffling) [38-42]การปรับปรุงคุณภาพด้วยวิธีนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโดยการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการสร้าง antibody ที่มีความสามารถในการจับสูงมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่า ตัวอย่างเช่นพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของ antibody บางประเภทได้ถึง 10 เท่า ทำให้ได้ monoclonal antibody ที่มีความสามารถในการจับสูงถึง 10^{11} M^{-1} ซึ่งสูงกว่าค่าที่จะได้จาก monoclonal antibody ที่ผลิตด้วยวิธีการเดิม (คือ10^{10} M^{-1}) [43-45]

นอกจากการปรับปรุงคุณภาพในการจับแล้ว ยังสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ในการปรับปรุงคุณสมบัติอื่นๆตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่นความสามารถในการทำงาน (function) ต่างๆ เช่นการกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) [46-53] หรือการใช้เป็นตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้ง (agonist หรือ antagonist) โปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆในเซลล์ [54,55] นอกจากนั้นแล้วยังใช้ในการคัดเลือก antibody ที่ทนต่อสภาวะบางอย่างเช่น สภาวะกรด ด่าง หรือทนต่อเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteinase) [56,57] หรือที่สภาวะ reducing [41] รวมทั้งการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค (therapeutic use) [13-15,33,58-65] หรือติดฉลาก (tag) [66-71] เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ

กล่าวโดยสรุป การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจเพื่อการผลิต monoclonal antibody นั้น มีประโยชน์มากและมีข้อดีกว่าเทคโนโลยีการผลิตแบบเดิม (conventional method) หลายประการ ดังจะได้สรุปไว้เป็นข้อๆ ดังนี้

1. การผลิต monoclonal antibody ด้วยเทคโนโลยีเฟจ สะดวก และประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม เพราะใช้เวลาน้อยกว่า ใช้เงินน้อยกว่า ใช้แรงงานและความชำนาญน้อยกว่าและข้อสำคัญคือไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง
2. สามารถใช้กับ antigen ได้หลากหลายชนิดกว่า เพราะสามารถใช้กับ antigen ที่เป็นพิษต่อสัตว์หรือ antigen ที่คล้ายกับโปรตีนในสัตว์ทดลอง หรืออาจใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็น antigen ก็ได้ นอกจากนั้นยังสามารถใช้กับ antigen ที่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้ (nonimmunogenic antigen)
3. สามารถใช้ในการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen จำนวนมากชนิด ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในงานด้าน proteomics ในปัจจุบัน
4. สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้าง antibody ที่มีคุณสมบัติเหมือนของคน (humanized antibody) เพื่อใช้ในการรักษาโรค (therapeutic antibody)
5. สามารถปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามต้องการ เช่นมีความสามารถในการจับ หรือความจำเพาะเจาะจงสูงขึ้น หรือทนต่อสภาวะต่างๆ
6. สามารถนำไปผลิตเป็นจำนวนมากได้ง่าย ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และเซลล์สัตว์โดยทั่วไป เพื่อใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ในปัจจุบันได้มีตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจเพื่อการผลิตโนโนโคลนอล แอนติบอดี เพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าแล้ว [72-74] ซึ่งเป็นการผลิตโดยบริษัท crucell และขณะนี้อยู่ในระหว่างการทดลองในมนุษย์ (clinical trial) [75] ซึ่งแอนติบอดีที่ใช้เป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีผสมกัน 2 ชนิด ชนิดแรกได้มาจาก hybridoma ส่วนชนิดที่ 2 ได้มาจากเทคโนโลยีเฟจ เนื่องจากแอนติบอดีนี้เป็นของบริษัทเอกชน ดังนั้นถ้ามีขายในท้องตลาด ก็คาดได้ว่าจะมีราคาสูงมาก ดังนั้นการผลิตเพื่อการใช้ในการตรวจ รักษาเองในประเทศจึงจะมีประโยชน์มาก ทั้งความสามารถในการพัฒนาเทคโนโลยีขั้นสูง ความสามารถในการแข่งขัน และการลดการนำเข้า รวมทั้งยังเป็นการช่วยสร้างบุคลากรที่มีความชำนาญในเทคโนโลยี ขั้นสูงนี้ด้วย โดยคลังของแอนติบอดีต้นแบบ และวิธีการในการสร้างคลังนั้น ได้รับการพัฒนาขึ้นในประเทศไทยจากโครงการวิจัยที่ผู้วิจัยหลักเคยได้รับการสนับสนุนจากสภาวิจัยแห่งชาติมาก่อน ดังนั้นจึงไม่ติดปัญหาเกี่ยวกับ สิทธิบัตร หรือทรัพย์สินทางปัญญา

บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

3.1 วิธีการคัดเลือกเฟจ

วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ สามารถใช้ในการคัดหาเฟจที่จับจำเพาะกับไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าจากทั้งคลังแอนติบอดีปฐมภูมิ (คลังย่าโม 1) และคลังทุติยภูมิชื่อ Yamo-Rabies ที่ได้สร้างขึ้นจากโครงการวิจัยนี้

3.1.1 การคัดเลือก แอนติบอดีผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสายเดี่ยว

ใช้หลักการ การคัดเลือกความสามารถในการจับกับเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง (affinity selection) ในหลอดอิมูโน (immunotube) ดังนี้

<u>ขั้นที่ 1 การตรึงแอนติเจนเป้าหมาย</u>

1.1 ใส่ 0.35-1.4 IU ของ ไวรัสที่หมดฤทธิ์ (inactivated virus) ใน 100 mM $NaHCO_3$ ปริมาณ 100 ul ลงในหลอดอิมูโน (immunotube)

1.2 ปิดฝาด้วยจุกที่มากับหลอดอิมูโน (immunotube) จากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

<u>ขั้นที่ 2 การคัดเลือกรอบแรก</u>

2.1 เติมสารละลายเพิ่มความคงตัว (5% w/v sucrose, 0.3 % w/v BSA, and 50 mM $NaHCO_3$) ปริมาณ 100 ul ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาทีจากนั้น ล้างหลอดอิมูโน (immunotube) 2 ครั้งด้วย PBS

2.2 เติม นมปลอดไขมัน 2% w/v (2% w/v MPBS (Non-fat dried milk) ใน PBS ปริมาณ 4 ml ปิดปากหลอดอิมูโน (immunotube) ด้วยจุกที่มากับหลอดอิมูโน (immunotube) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.3 เท 2 % w/v MPBS ออก

2.4 เติมคลังของเฟจปริมาณ 10^{10} ที่เจือจางอยู่ใน 4 % w/v MPBS ปริมาณ 200 ul ปิดฝาด้วยจุกแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.5 เทสารทิ้ง แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 10 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 10 รอบ

2.6 ทำการสกัด (elute) เฟจที่จับกับแอนติเจน โดยใส่ทริบซิน บัฟเฟอร์ (trypsin buffer) ปริมาณ 100 ul ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 50 mM glycine-HCl pH 2.0 ปริมาณ 100 ul แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที

2.7 ทำให้สารสกัดเป็นกลาง (neutralize) โดยการเติม สารละลายทำให้เป็นกลาง (Neutralization solution) (200 mM $NaHPO_4$, pH 7.5) จำนวน 100 ul

2.8 เก็บเฟจที่สกัดมา ได้ครึ่งหนึ่งไว้ที่ 4°C ส่วนอีกครึ่งหนึ่งเอาไปใส่ลงในหลอดที่มีแบคทีเรีย *E. coli* TG1 ที่กำลังโตอยู่ในช่วงชี้กำลัง (log phase) ในน้ำเลี้ยง 2xYT จำนวน 2 ml

2.9 ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ถูกติดเชื้อ (infect) ด้วยเฟจที่ได้จากการคัดเลือกในรอบที่ 1 บนจานเลี้ยงเชื้อผสมวุ้น 2xYT ที่มี 100 ul/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 1% w/v โดยปั่นแยกเซลล์ที่ได้ให้ตกลงมาที่ความเร็วประมาณ 3000 xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทน้ำเลี้ยงทิ้งให้เหลือประมาณ 100 ul แล้วเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C ข้ามคืน โดยในขั้นตอนนี้ก่อนที่จะเกลี่ยเชื้อลงทั้งหมดต้องนำเชื้อส่วนหนึ่งมาเจือจางลงทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ก่อน แล้วจึงนำไปเกลี่ย (spread) ลงบนจานวุ้นเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้เป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) ดังที่ได้อธิบายไว้โดยละเอียดในขั้นที่ 5 เพื่อให้สามารถคำนวณจำนวนของเฟจที่คัดเลือกมาได้ในรอบนี้ นอกจากนั้นแล้วในกรณีที่ต้องการคัดเลือกเพียงรอบเดียว ยังสามารถข้ามจากขั้นตอนที่ได้แบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวในขั้นนี้ ไปต่อในขั้นที่ 6 คือการสร้างเป็นตัวเฟจ เพื่อทำการตรวจความสามารถในการจับด้วยวิธีการ ELISA ในขั้นตอนที่ 7 ได้เลย

<u>ขั้นที่ 3 การเตรียมเฟจเพื่อทำการคัดเลือกรอบที่สอง</u>

3.1 ทำการเก็บรวบรวมโคโลนีของแบคทีเรียที่โตขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อโดยใส่น้ำเลี้ยง 2xYT จำนวน 1 ml ลงไปแล้วใช้แท่งแก้วขูดเอาแบคทีเรียออกมาให้หมด กระจายเชื้อให้เข้ากันดี อย่าให้ติดกันเป็นก้อน

3.2 นำแบคทีเรียจากขั้นแรกจำนวน 10 ul ไปเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 1% w/v น้ำตาลกลูโคส จำนวน 10 ml

3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมกับเขย่าไปด้วยอย่างแรงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4 เติมเฟจตัวช่วย (KM13) จำนวน $5x10^{11}$ ตัว

3.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C โดยไม่ต้องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที

3.6 นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

3.7 แยกเอาส่วนใสด้านบนออก แล้วใส่อาหารเหลว 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin, 50 ug/ml kanamycin และน้ำตาลกลูโคส 0.1% w/v จำนวน 10 ml กระจายแบคทีเรียที่อยู่ก้นหลอดให้ดีในอาหารเหลวนี้

3.8 นำแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C พร้อมกับเขย่าไปด้วยอย่างแรงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

* ในวันนี้ให้ทำการตรึงโปรตีนเป้าหมายบนจาน ELISA เพื่อทำการคัดเลือกในรอบต่อไปด้วย โดยใช้วิธีการตรึงดังที่ได้อธิบายในขั้นที่ 1 ปริมาณของแอนติเจน ที่จะใช้ในการคัดเลือกรอบที่ 2 อาจใช้เท่ากับปริมาณที่ใช้ในการคัดเลือกรอบสุดท้ายหรืออาจน้อยกว่านั้น 2-10 เท่าแล้วแต่ความเหมาะสม

<u>ขั้นที่ 4 การคัดเลือกรอบที่สอง</u>

4.1 ทำการแยกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฟจอยู่จากขั้นที่แล้วโดยการ ปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว 3300 xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) ไว้ในหลอดทดลองที่สะอาด

4.2 ทำการตกตะกอนเฟจโดยการเติมสารละลาย PEG/NaCl (20% Polyethylene glycol 8000, 2.5M NaCl) ปริมาณ 2.5 มล. ลงใน supernatant จากขั้นที่ 4.1 ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 1 ชั่งโมง

4.3 นำไปปั่นตกตะกอนที่ 3300 xg เป็นเวลา 30 นาที

4.4 กำจัดส่วนใสด้านบน (PEG/NaCl) ออกแล้วปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ 3300 xg เป็นเวลา 5 นาที

4.5 กำจัด PEG/NaCl ออกให้หมด

4.6 เติม PBS ปริมาณ 500 ul แล้วผสมกับตะกอนเฟจให้เข้ากันดี

4.7 นำเฟจทั้งหมดที่ได้จากขั้นที่ 4.5 ไปทำการคัดเลือกรอบที่ 2 ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ในขั้นที่ 2

* ถ้าต้องการคัดเลือก 3 รอบ ให้ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นที่ 2 และ 3 อีกครั้งหนึ่ง

<u>ขั้นที่ 5 การแยกเป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว</u>

หลังจากที่ได้บ่มเฟจที่สกัด ออกมาได้ กับ *E. coli* TG1 ตามขั้นตอนที่ 2.8 แล้ว ทำการแยกให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียซึ่งแสดง โมโนโคลนอลแอนติบอดี โครงสร้างต่างๆกันดังนี้

5.1 นำแบคทีเรีย TG1 ที่ติดเชื้อด้วยเฟจมาเจือจางลงทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ก่อน

5.2 นำแบคทีเรียทุกความเจือจางประมาณ 100 ul ไปเกลี่ย ลงบน บนจานวุ้นเลี้ยงเชื้อ 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 1% (w/v)

5.3 นำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืนเพื่อให้ได้เป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) เพื่อใช้ในการสร้างเป็นเฟจโคโลนีเดี่ยวในขั้นที่ 6 ต่อไป รวมทั้งต้องทำการคำนวณจำนวนของเฟจที่คัดเลือกมาได้ทั้งหมด โดยการนับจำนวนเฟจที่โตบนเฟจเลี้ยงเชื้อแล้วคูณกับค่าการเจือจาง (dilution) ที่ใช้

<u>ขั้นที่ 6 การเตรียมเฟจโคโลนีเดี่ยว</u>

ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 2 วัน วันแรกเป็นการเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละโคโลนีที่มีเฟจมิด (phagemid) ที่แสดงโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป (stock) และเพื่อนำไปผลิตเป็นตัวเฟจโดยการทำให้ติดเชื้อด้วยเฟจตัวช่วย

วันแรก

6.1 เลือกจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีแบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวจากขั้นก่อน จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟัน หรือลวดเขี่ยแต่ละโคโลนีขึ้นมา

6.2 นำแต่ละโคโลนีไปเลี้ยงใน 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin, 50ug/ml kanamycin และ น้ำตาลกลูโคส 1%(w/v) ที่อยู่ในหลุมบนจานวัดปริมาณระดับอณู (microtiter plate) จำนวน 100 ul ดังนั้นจึงสามารถเลี้ยงแบคทีเรียได้ทีละ 96 โคโลนี ต่อจานวัด ในคราวเดียวกัน

6.3 นำจานวัดปริมาณระดับอณู (microtiter plate) ไปบ่มที่ 37°C โดยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน

วันที่ 2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.4 นำแบคทีเรียปริมาณ 2-5 ul จากแต่ละหลุมในขั้นที่แล้วไปใส่ในหลุมบนจาน ELISA ที่มี 2xYT + 100 ug/ml ampicillin + น้ำตาลกลูโคส 1% (w/v) อยู่ 200 ul ส่วนแบคทีเรียที่เหลือเก็บไว้ใช้ในระยะยาว โดยการเติมกลีเซอรอล (glycerol) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 15% แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -80°C

6.5 นำไปบ่มที่ 37°C โดยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง

6.6 เติม 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin + น้ำตาลกลูโคส 1% (w/v) + 10^9 เฟจตัวช่วย จำนวน 50 ul

6.7 นำไปบ่มที่ 37°C โดยไม่ต้องเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.8 นำ microtiter plate ไป ปั่นตกตะกอน ที่ 3300 xg เป็นเวลา 15 นาที

6.9 กำจัดส่วนใสด้านบน (supernatant) ออก แล้วเติม 2xYT ที่มี 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin, 50ug/ml kanamycin ปริมาณ 200 ul

6.10 นำไปบ่ม ที่ 30°C, 250 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

* ในวันนี้ให้ทำการตรึงโปรตีนเป้าหมายบนจาน ELISA เพื่อทำการตรวจสอบในวันถัดไปด้วย โดยใช้วิธีการตรึงดังที่ได้อธิบายในขั้นที่ 1 ปริมาณของแอนติเจน ที่จะใช้ในการตรวจสอบ ELISA อาจใช้เท่ากับปริมาณที่ใช้ในการคัดเลือกรอบสุดท้าย หรืออาจน้อยกว่านั้นแล้วแต่ความเหมาะสม โดยทำการตรึงลงในหลุมเท่ากับจำนวนโคโลนีที่จิ้มขึ้นมาในขั้นที่ 6.1 นอกจากนั้นแล้วยังต้องมีตัวควบคุม (background) ในการวิเคราะห์ด้วย โดยการใส่ นมปลอดไขมัน 2% w/v (MPBS) ปริมาณ 200 ul หรือแอนติเจน อื่นที่เหมาะสม ลงไปในหลุมของจาน ELISA ให้เท่ากับจำนวนของเฟจที่ต้องการทำการวิเคราะห์ โดยควรทำการทดสอบแบบ สอง หรือ สามซ้ำ (duplicate หรือ triplicate) เพื่อความถูกต้อง

<u>ขั้นที่ 7 การทำ โมโนโคลนอล เฟจอีไลซ่า (Monoclonal Phage ELISA)</u>

7.1 นำจานวัดปริมาณระดับอณู (microtiter plate) จากขั้นที่ 6.10 ไป ปั่นตกตะกอน ที่ 3300 xg เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนใสด้านบน (supernatant) ที่มีเฟจอยู่ไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

7.2 ทำการล้างจาน ELISA ที่เตรียมไว้จากขั้นที่แล้ว 2 ครั้งด้วย PBS จากนั้นเติม นมปลอดไขมัน 2% w/v (2% w/v MPBS (2% Non-fat dried milk ใน PBS) ปริมาณ 200 ul ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกัน (block) การจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific binding)

7.3 เติมเฟจจากขั้น 7.1 ปริมาณ 100 ul ที่เจือจางอยู่ใน MPBS 4% w/v ปริมาณ 50 ul ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.4 คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

7.5 เติม HRP anti-M13 ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน 2% (w/v) MPBS ปริมาณ 100 ul ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.6 ล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

7.7 เติมสาร ABTS + 0.05% H_2O_2 แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-60 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี

7.8 ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวแสง 405 nm

7.9 คัดเลือกเฟจที่มีความสามารถในการจับดี คือมีค่า OD เป็น 2 เท่าของค่าควบคุม (control) ขึ้นไป เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

3.1.2. การผลิตชิ้นแอนติบอดีอิสระที่ไม่อยู่บนผิวเฟจโดยการเปลี่ยนชนิดของแบคทีเรีย

วิธีการนี้ใช้ในการผลิตชิ้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี แบบใดก็ได้ถ้าในโครงสร้างของเฟจมิดมีรหัส TAG ระหว่างชิ้นของแอนติบอดี กับ pIII ดังที่ได้อธิบายแล้วข้างต้น โดยชิ้นแอนติบอดีที่ไม่อยู่บนผิวเฟจอาจอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อหรืออยู่ในช่องว่างในผนังเซลล์ (periplasmic space) ของแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ หลังจากที่ได้ชิ้นแอนติบอดีที่ไม่อยู่บนผิวเฟจแล้ว สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ได้ต่อไป ในกรณีที่มีโคลนของ scFv จำนวนมากที่ต้องการทดสอบ อาจทำการผลิตทีละหลายๆโคลนในปริมาณน้อยๆโดยการเลี้ยงใน จานวัดปริมาณระดับอณู 96 หลุม เมื่อได้ชิ้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่อยู่บนผิวเฟจแล้ว ควรนำไปยืนยันความสามารถในการจับกับแอนติเจน อีกครั้งหนึ่งโดยวิธีการ ELISA ด้วย รายละเอียดของการทำในขั้นตอนต่างๆที่ได้กล่าวมาข้างต้นอธิบายได้ดังนี้

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การเตรียม ชิ้นแอนติบอดีที่ไม่อยู่บนผิวเฟจ ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

1. จิ้มโคโลนีเดี่ยว *E. coli* HB2151 ที่อยู่บนจานวุ้นแร่ธาตุเลี้ยงเชื้อ (mineral agar plate) มา 1 โคโลนีแล้วนำไปเลี้ยงในน้ำแร่ธาตุสำหรับเลี้ยงเชื้อ (mineral broth) ที่ 37°C

2. นำเฟจโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้จากขั้นตอนการคัดเลือกเฟจจำนวน 10 ul จากนั้นนำไปผสม กับ *E. coli* HB2151 จำนวน 200 ul ที่กำลังโตอยู่ในช่วงชี้กำลัง (log phase) (OD600 ประมาณ 0.4) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเขย่า เพื่อให้เฟจ เข้าไปโตใน แบคทีเรีย

3. นำแบคทีเรียไปเกลี่ย ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ลงบนจานวุ้น 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 1 น้ำตาลกลูโคส % w/v แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน

4. ทำการจิ้มโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงใน น้ำเลี้ยงน้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 2% w/v อยู่ แล้วบ่มที่ 30°C โดยการเขย่าไปด้วยข้ามคืน

5. นำแบคทีเรียจากขั้นที่แล้วจำนวน 50ul ไปเลี้ยงใน น้ำเลี้ยงน้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 0.1% w/v จำนวน 50-100 ml ที่ 30°C โดยการเขย่าไปด้วยจนโตได้ค่า OD600 = 0.9 (ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง)

6. นำไป ปั่นตกตะกอน ที่ 3000 xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำไปผสมให้เข้ากันดี (resuspend) ใน น้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin + 1mM IPTG แล้วเลี้ยงที่ 30°C เป็นเวลา 20 ชั่งโมง

7. ทำการปั่นแยกเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการ ปั่นตกตะกอน ที่ 5000xg 4°C เป็นเวลา 15 นาที ชิ้นแอนติบอดีอิสระจะอยู่ในส่วนน้ำใสด้านบน (supernatant)

8. นำไปใช้ในการตรวจสอบทาง ELISA หรือนำไปเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การตรวจสอบความสามารถในการจับกับ แอนติเจน ด้วยวิธีการ ELISA

1. ใส่ 0.07-0.1 IU ของไวรัสที่ไม่มีฤทธิ์ (inactivated virus) ใน 100mM $NaHCO_3$ ปริมาณ 100 ul ลงในหลุมของจาน ELISA ชนิดประสิทธิภาพการจับสูง (high-binding capacity, Maxisorb) ปริมาณของ แอนติเจน ที่จะใช้ในการตรวจสอบ ELISA อาจใช้เท่ากับปริมาณที่ใช้ในการคัดเลือกรอบสุดท้าย หรืออาจน้อยกว่านั้นแล้วแต่ความเหมาะสม โดยทำการตรึงลงในหลุมเท่ากับจำนวน ชิ้นแอนติบอดีอิสระ ที่ต้องการทดสอบ นอกจากนั้นแล้วยังต้องมีตัวควบคุม (background) ในการวิเคราะห์ด้วย โดยการใส่ 3% BSA ใน PBS หรือ นมปราศจากไขมัน 2% w/v ใน PBS (2% MPBS) อื่นที่เหมาะสม ปริมาณ 200 ul ลงไปในหลุมของจาน ELISA ให้เท่ากับจำนวนของ แอนติบอดีอิสระ ที่ต้องการทำการวิเคราะห์ โดยควรทำการทดสอบแบบสอง หรือ สามซ้ำ (duplicate หรือ triplicate) เพื่อความน่าเชื่อถือ

2. ปิดปากหลุมด้วยเทปใส หรือแผ่นพลาสติกสำหรับหุ้ม (plastic wrap) จากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

3. เติม สารละลายเพิ่มความคงตัว (ซูโครส 5% w/v, 0.3 % w/v BSA, and 50 mM $NaHCO_3$) ปริมาณ 100 ul ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา45 นาที

4. ทำการล้างจาน ELISA ที่เตรียมไว้จากขั้นที่แล้ว 2 ครั้งด้วย PBS

5. เติม นมปราศจากไขมัน 2% w/v ใน PBS (2% w/v MPBS)(ปริมาณ 200-250 ul ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. เท 2% w/v MPBS ทิ้ง

7. เติมน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนในด้านบนที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว (culture supernatant) หรือ สารสกัดจากผนังเซลล์ (periplasmic extract) ที่มี ชิ้นแอนติบอดี อิสระ ปริมาณ 50-200 ul ที่เจือจางอยู่ในนมปลอดไขมันใน 4% w/v PBS ปริมาณ 50 ul ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

9. เติมตัวตรวจสอบฮิสติดีนที่เชื่อมอยู่กับ เอชอาร์พี (HisProbe-HRP) ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน PBS ปริมาณ 100 ul ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

10. ล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

11. เติมสาร ABTS + 0.05% H_2O_2 ปริมาณ 200 ul แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-60 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี

12. ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่องอ่านจาน ELISA ที่ความยาวแสง 405 nm

13. คัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการจับดี คือมีค่า OD ที่เป็น 2 เท่าของค่าควบคุมขึ้นไป เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

* หมายเหตุ ในกรณีที่ต้องการใช้ แอนติบอดีต่อ c-Myc ในการตรวจสอบ อาจทำได้ดังนี้ (ขั้นที่ 1-7 เหมือนกัน)

1. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ ในระหว่างแต่ละรอบที่ล้างอาจแช่และเขย่าก่อนเป็นเวลา 5 นาที

2. เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ c-Myc ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน PBS ปริมาณ 100 ul ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. ล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วล้างต่อด้วย PBS อีก 3 รอบ

4. เติม แอนติบอดีแพะที่สามารถจับกับแอนติบอดีหนูที่เชื่อมอยู่กับ เอชอาร์พี (goat anti mouse-HRP) หรือแอนติบอดีกระต่ายที่สามารถจับกับแอนติบอดีหนูที่เชื่อมอยู่กับ เอชอาร์พี (rabbit anti mouse-HRP) ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน PBS ปริมาณ 100 ul ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. เติมสาร ABTS + 0.05% H_2O_2 แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-60 นาทีเพื่อรอให้เกิดสี

6. ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่องอ่านจาน ELISA ที่ความยาวแสง 405 nm

7. คัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการจับดี คือมีค่า OD ที่เป็น 2 เท่าของค่าควบคุม ขึ้นไป เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.2 วิธีการสร้างคลังเฟจแบบทุติยภูมิจากอาสาสมัครที่ได้รับการกระตุ้นให้ผลิตแอนติบอดีต่อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า

ทำการสร้างคลังเฟจด้วยวิธีการที่ได้พัฒนามาก่อนแล้วในห้องปฏิบัติงานของหัวหน้าโครงการวิจัย ซึ่งได้รับการตีพิมพ์ไปแล้วดังนี้

Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., and Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnol 9, 6.

ซึ่งขั้นตอนการสร้างคลังโดยละเอียด สามารถดูได้จากรายงานการวิจัย เรื่อง “การพัฒนาเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี (Application of phage display technology for the production of monoclonal antibody) รหัสโครงการ SUT3-304-47-24-11

ทั้งนี้ความแตกต่างของการสร้างคลังคือ ต้นแบบของ mRNA เพื่อจะใช้สร้างเป็นคลังแอนติบอดีชนิดทุติยภูมินั้น ได้มาจากอาสาสมัคร 4 คน เป็นชาย 2 คน หญิง 2 คน ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยการฉีดวัคซีนชนิด PVRV (VeroRab, Pitman-more/ W138-153-3M strain, Sanofi-Pasteur, Lyon, France) or PCEC (LEP-Flury strain, Rabipur, Chiron, India) ตามวิธีการ

ของ WHO ที่ได้นำมาใช้ที่ สภากาชาดไทย สกัดเลือดจากอาสาสมัครมาคนละประมาณ 50 ml. ผลการวิเคราะห์คุณภาพคลังพบว่ามีขนาดเล็กกว่าคลังย่าโม 1 คือ มีค่า diversity ประมาณ 10^5 และมีความสมบูรณ์ของ recombinant antibody insert ประมาณร้อยละ 50 อย่างไรก็ตามพบว่าคลังนี้มีคุณภาพดีพอ เพราะสามารถคัดหาแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติดีได้สำเร็จ

3.3 แอนติบดีมนุษย์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าที่คัดหามาได้

จากผลจากการทำ biopanning ดังที่ได้อธิบายในหัวข้อ 3.1 ผู้วิจัยสามารถคัดหาแอนติบอดีได้ทั้งหมด 14 โคลน ผลงานนี้ได้รับการตีพิมพ์ใน Proceeding ดังนี้

Pruksametanan, N., Yamabhai, M., and Khawplod, P. (2012). Selection of single chain human monoclonal antibody (scFv) against Rabies virus by phage display technology. Paper presented at: IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, NANOMED.p.78-81

ซึ่งผลงานนี้ยังได้รับรางวัล “Best Conference Paper Finalist” ในประเภทนักวิจัยอีกด้วย

ผลงานวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ แสดงใน 4 หน้าถัดไป

Selection of Single Chain Human Monoclonal Antibody (scFv) Against Rabies virus by Phage Display Technology

Natcha Pruksametanan and Montarop Yamabhai
Phage Display Biotechnology Laboratory,
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology,
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima , Thailand
montarop@sut.ac.th

Pakamatz Khawplod
Queen Saovabha Memorial Institute
Thai Red Cross Society
Bangkok, Thailand
pakamatz@yahoo.com

Abstract— **Human monoclonal antibodies against Rabies virus were selected from non-immunized human scFv library (YAMO-I library) and immunized library (Yamo-Rb library) by using phage display technology. The biopanning was performed for 2-5 rounds by using two types of inactivated rabies vaccines as targets. These are purified vero cell rabies vaccine (PVRV) and purified chick embryo cell vaccine (PCEC). A total of 14 positive clones from various method of biopanning that can bind to rabies, i.e.; IRA7c, IIIRC2c, IRC3c, IYC11c, IYC12c, IYD1c, IYF5c, IIRD5v, IIYB5v, IIYG4v, IIYE5v, IIYG8v, IIYD4v and IVB4cv, were isolated and their genes were sequenced. The ELISA result showed that the positive clones always bind strongly to the targets that were used for biopanning; however some clones can cross-react to the related virus. These selected scFv antibodies will be tested for neutralization activities *in vitro* in the next step.**

Index Terms—**Phage display, Rabies virus, single-chain fragments(scFv), human monoclonal antibody.**

INTRODUCTION

Rabies is a fatal zoonotic disease that is transmitted by both wild and domestic animals. Globally, it is estimated that at least 55,000 people die of rabies and there are about 10 millions people who receive post-exposure vaccination annually. Currently available rabies immune globulin (RIG) for clinical use are Equine Rabies Immunoglobulin (ERIG) and Human Rabies Immunoglobulin (HRIG). However, RIG was produced in limited amounts [1]. Moreover, HRIG is too costly, not easily available, and suffered from potential disadvantages, such as limited capacity, batch-to-batch variation, and possible contamination with blood borne adventitious agents. ERIG also has drawbacks of animal origin that carries a risk of occasional adverse reaction, including anaphylaxis, especially after second exposure [2, 3]. Thus, utilization of Phage display technology for the production of human antibody specific to rabies virus is attractive and suitable alternative strategy for the prevention, treatment and diagnostic of rabies. Phage display technology has been shown to be a powerful method for the generation of antibody *in vitro* by mimicking the selection strategies of the immune system [4]. In phage display, antibody fragments are expressed as fusions to capsid proteins presented on the surface of the filamentous bacteriophage particles, which are approximately 7 nm by 900-2000 nm in length. Therefore this system provides direct linkage between the antibody genotype (DNA sequence in phage paticle) and its phenotype (affinity and specificity of phage-displayed antibody).

In this study, Phage display scFv antibody libraries were used to select single chain human monoclonal antibodies (scFv) against rabies virus. scFv is a popular format in the recombinant antibody technology because it can be cloned and manipulated as individual polypeptide and efficiently displayed on the surface of bacteriophage (phage). Even if single chain fragments of variation (scFv) are significantly smaller then full-length human antibodies IgGs (25 vs 150 kDa). They can still bind their respective antigens tightly (i.e. with dissociation constants of 5 uM to 10 nM) and represent structurally minimized version of full-length human antibodies IgGs. Moreover, When compared to fragment of antigen binding (Fabs) which are ~50 kDa, scFvs which generally resistant and aggregation have twice smaller than Fabs [5]. Therefore scFv antibody is an attractive nanomaterial for both diagnostic and therapeutic purposes.

METERIALS AND METHODS

Meterials

Two types of phage display libraries, i.e., Non-immunized (YAMO-I) [4] and immunized libraries (Yamo-Rb) were constructed in our laboratory. Both libraries were constructed using antibody genes isolated from the peripheral blood of human donors. The YAMO-I library was constructed from 140 non-immunized (Naïve) donors; whereas, Yamo-Rb library was constructed from four human donors immunized with PVRV (VeroRab, Pitman-more/ W138-153-3M strain, Sanofi-Pasteur, Lyon, France) or PCEC (LEP-Flury strain, Rabipur, Chiron, India).

Selection of human scFv phage library on inactivated rabies virus (Biopanning)

Selection was performed using inactivated rabies vaccines (PVRV or/and PCEC) as targets. Two to five rounds of selection were carried out. Maxisorp Immuno tube (Nunc, Denmark) was pre-coated with 0.35-1.4 IU of inactivated rabies virus, at 37 ^{o}C for 3 hours following by 4 ^{o}C overnight, in 100 mM $NaHCO_3$, pH 8.5. After that, the immuno tube was stabilized with 5% w/v sucrose, 0.3 % w/v BSA, and 50 mM $NaHCO_3$ for 45 min. Then, the tube was washed three times with phosphate buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, pH 7.4) and blocked with PBS containing skimmed milk (2%, w/v, MPBS) for 1 hour. For each round of biopanning, the phage library (~10^{10} phages) was incubated with pre-coated inactivated rabies virus in 4%, w/v, MPBS for 2 hours at room temperature. Unbound phage was washed away with PBS supplemented with 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) and with PBS. Phage antibody against rabies viruses was recovered with 1x trypsin buffer and 0.2M glycine HCl, pH 2.0. The eluted phage was infected into *E. coli* to obtain individual phage clones as previously described [6]. For each round of selection, specificities of

individual phage scFv clones were identified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [6].

Monoclonal Phage ELISA

Single colony of each round of biopanning was randomly picked and cultured in 96-deep well plate followed by super-infection by KM13 helper phage [4]. Phage supernatants were collected after centrifugation and subjected to ELISA for screening of monoclonal anti-rabies virus phage-scFv. The Immuno 96 microWell™ plate (Nunc, Denmark) was immobilized with inactivated rabies at 37 °C for 3 hours following by 4 °C overnight in 100 mM $NaHCO_3$ and 2% skimmilk in 100 ul PBS buffer as a control. The phage supernatant was added to Immuno 96 microWell™ plate (Nunc, Denmark) and the binding phage-scFv was detected with HRP-conjugated anti-M13 antibody (1:5000). The color of the reaction was developed with ABTS reagent (Fluka). The reaction was quantified by measuring the absorbance at 405 nm.

DNA sequence and analysis

After the positive cloned are confirm by ELISA twice. Each clone of positive Phagemid DNA was extracted using DNA miniprep kit (Qiagen). The restriction fragment analysis was performed by using *BstN*-1. The selected positive clone with variable restriction pattern were confirmed by automated DNA sequencing (Macrogen, Korea) and analyzed with Igblast software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) and the sequence alignment of the scFv antibodies was done using CLUSTALW 2.1 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

RESULTS AND DISSUSSIONS

A total of 14 positive clones from various method of biopanning were isolated. These are IRA7c, IIIRC2c, IRC3c, IYC11c, IYC12c, IYD1c, IYF5c, IIRD5v, IIYB5v, IIYG4v, IIYE5v, IIYG8v, IIYD4v and IVB4cv. After DNA sequence analysis, we found that clones IVB4cv and IRA7c were identical. These two clones were isolated from the same library, i.e., Yamo-Rb by using different biopanning method. Clone IVB4cv was obtained from the fourth round of biopnning using a combination of both PCEC and PVRV as targets; whereas clone IRA7c was from the first round of panning using PCEC as a target. Clones IIIRC2c, IRC3c, IYC11c, IYC12c, IYD1c and IYF5c were selected by using PCEC as a target; while IIRD5v, IIYB5v, IIYG4v, IIYE5v, IIYG8v, IIYD4v were selected by using PVRV as a target. The ELISA results in Fig. 1 showed that the positive clones always bind strongly to the target that was used for biopanning. Nine clones were obtained from naïve library (YAMO-I) and four clones were from immunized library (Yamo-Rb). Five clones which are IRA7c, IIIRC2c, IIYG4v, IIYE5v, and IVB4cv showed cross-reactivity to both PCEC and PVRV targets.

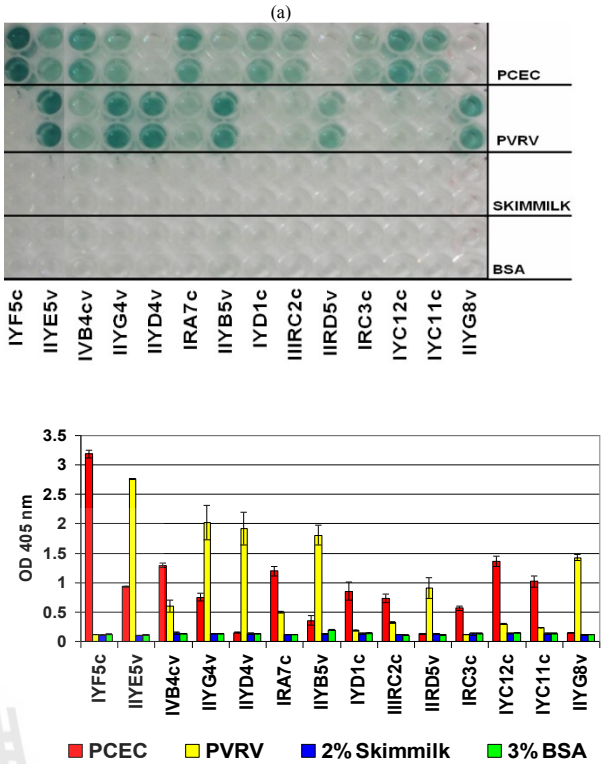


Fig. 1. (a) ELISA plate showing positive reactions (green colour) with PCEC or PVRV and negative reaction (clear) with 2% skimmilk and 3 % BSA
(b) ELISA signal at O.D. 405 nm

The *BstN*-1 fingerprinting analysis of 14 positive clones was shown in Fig. 2. In this figure pMOD (empty vector) was digested to compare with the positive scFv clones (pMOD+scFv gene).

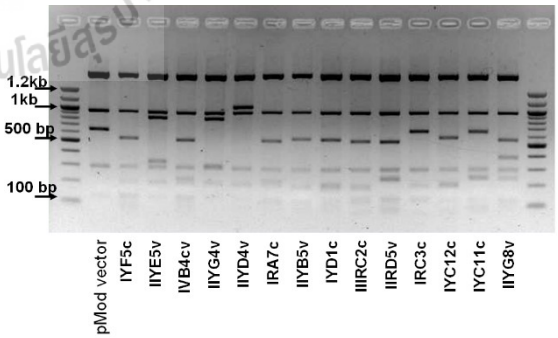


Fig. 2. Restriction fragment analysis by *BstN*I

After the positive cloned were confirmed by automated DNA sequencing. The DNA sequence of each scFv clone was analyzed with Igblast and the sequence alignment of the 14 scFv antibodies was done using CLUSTALW software. Fig. 3 showed the origin of germline and family of all the isolated V_H and V_L segments; whereas, Fig. 4 illustrates the amino acid sequence alignmnet of all positive clones. It is interesting to note that clone IRC3c, which consist only V_L, could still bind to the target, even if the signal is quit low when compared to other

positive clones. There have been many reports on the binding of VHH, which is a single-domain antibody (sdAb) that consists only of V_H domain from camelidae [5, 7, 8]. Our data is the first report on the binding of single V_L domain of human antibody.

No.	Name		Germline	Amino acid difference from germline
1	IRA7c	VH	IGHV3-33*01	18
		VL	IGLV2-14*02	7
2	IIIRC2c	VH	IGHV4-39*07	19
		VL	IGLV2-14*01	8
3	IRC3c	VH		
		VL	IGLV2-14*01	3
4	IYC11c	VH	IGHV1-2*02	7
		VL	IGLV3-21*03	0
5	IYC12c	VH	IGHV3-23*01	6
		VL	IGLV1-44*01	13
6	IYD1c	VH	IGHV3-23*01	6
		VL	IGLV3-19*01	8
7	IYF5c	VH	IGHV1-18*01	0
		VL	IGLV1-47*01	2
8	IIRD5v	VH	IGHV1-2*02	15
		VL	IGLV2-14*01	5
9	IIYB5v	VH	IGHV1-69*01	1
		VL	IGLV1-44*01	3
10	IIYG4v	VH	IGHV6-1*01	0
		VL	IGLV6-57*01	11
11	IIYE5v	VH	IGHV6-1*01	5
		VL	IGLV6-57*01	11
12	IIYG8v	VH	IGHV3-9*01	1
		VL	IGLV1-44*01	8
13	IIYD4v	VH	IGHV3-30-3*01	2
		VL	IGLV6-57*01	1
14	IVB4cv	VH	IGHV3-33*01	18
		VL	IGLV2-14*02	7

Fig. 3. Germlines and Families of V_H and V_L segments of all clones.

Fig. 4 showed the amino acid sequence alignment of all isolated scFv clones. The TAG amber stop condons were found in clone IIYB5v, IIYD4v and IYD1c. These codons are translated as glutamine instead of stop codon in *E. coli* suppressor strain such as DH5alpha or TG1; therefore, the functional antibody can be displayed on filamentous phage. The complementarity determining regions (CDRs) of the heavy and light chain of the antibody (V_H/CDR1, V_H/CDR2, V_H/CDR3, V_L/CDR1, V_L/CDR2 and V_L/CDR3) and the linker sequence were indicated. Amino acid sequence analysis revealed that all isolated positive clones have only the lambda type of the light chain (V_L) from family 1,2,3, and 6; while variable heavy chains (V_H) were from family 1, 3 and 6. No clone containing the kappa type of the light chain (V_K) was isolated.

family 1,2,3, and 6. One clone consisted of only V_L fragment. These selected phage-scFv clones will be further engineered to generate soluble scFv nanobodies and tested for neutralization activities *in vitro* in the next step.

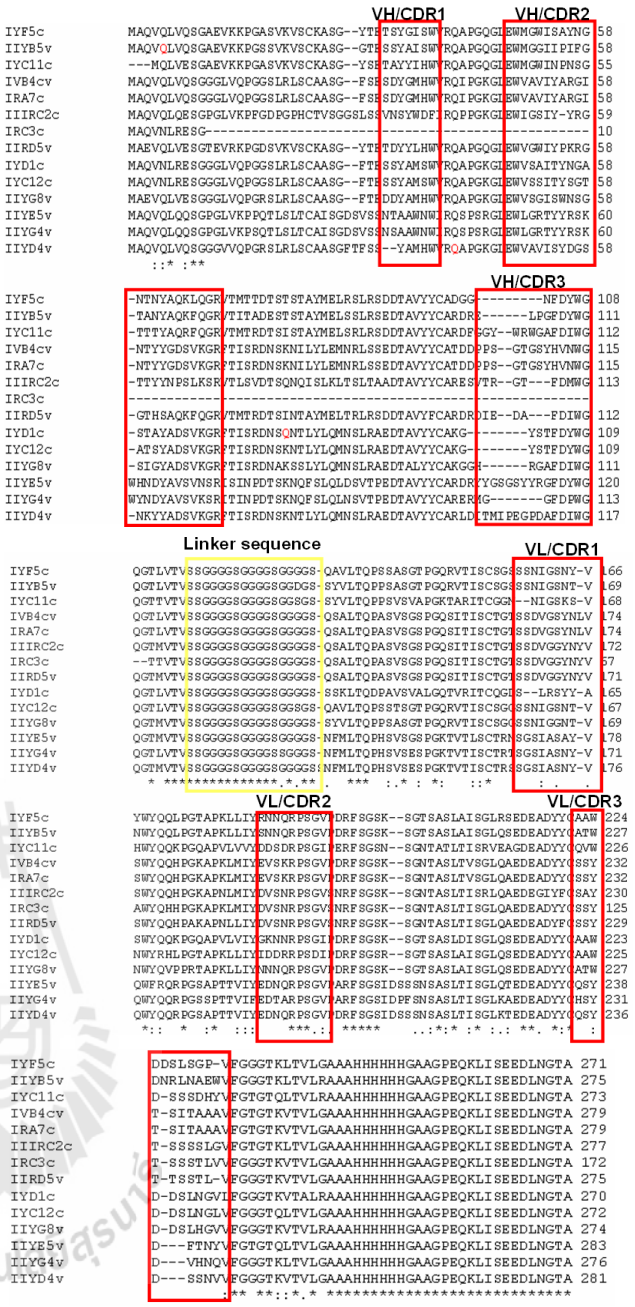


Fig. 4 Amino acid sequence alignment of all positive clones are shown. The GC-rich sequence that links V_H and V_L segments is indicated. The three complementarity determining regions (CDRs) are marked with box. These scFv antibodies are linked with 6xHis and Myc epitope at the C-terminal. Red Q is glutamine that is translated from an amber stop codon in suppressor *E. coli strains.*

IV. CONCLUSIONS

In conclusion, 13 unique phage-displayed anti-rabies virus scFv antibodies were successfully selected from naïve library (Yamo-I) and immunized (Yamo-Rb) human scFv antibody libraries. All antibodies possessed variable heave chains (V_H) from family 1,3, and 6 and only lambda light chains (V_L) from

ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project ofThailand, Office of the Higher Education Commission, Suranaree University of Technology (SUT), and National Research Council of Thailand (NRCT).

REFERENCES

T. Matsumoto, K. Yamada, K. Noguchi, K. Nakajima, K. Takada, P. Khawplod, and A. Nishizono, " Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus," *Microbiology and Immunology*, Vol. 54(11), pp.673-683, 2010.

R.A. Kramer, W.E. Marissen, J. Goudsmit, T.J. Visser, M. Clijsters-Van der Horst, A.Q. Bakker, M. de Jong, M. Jongeneelen, S. Thijsse, H.H. Backus, et al.,"The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries." *European Journal of Immunology*. Vol.35, pp.2131-2145, 2005.

[1] M. Houimel and K. Dellagi, "Isolation and characterization of human neutralizing antibodies to rabies virus derived from a recombinant immune antibody library," *J Virol Methods,* Vol.161 (2), pp. 205-215.

P. Pansri, N. Jaruseranee, K. Rangnoi, P. Kristensen, and M. Yamabhai, "A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens." *BMC Biotechnol* , pp.1-16, 2009.

M. R. Kierny, T. D. Cunningham and B. K. Kay, "Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms" *Nano reviews*, 2012

K. Rangnoi, N. Jaruseranee, R. O'Kennedy, P Pansri and M. Yamabhai, "One-Step Detection of Aflatoxin-B1 Using scFv-Alkaline Phosphatase-Fusion Selected from Human Phage DisplayAntibody Library" *Mol Biotechnol*, pp 240-249, 2011.

A. Hultberg1, N. J. Temperton, V. rie Rosseels, M. Koenders, M.Gonzalez-Pajuelo, B. Schepens, L. Itatı´ Iban˜ ez, P. Vanlandschoot, J. Schillemans, M. Saunders, R. A. Weiss, Xavier Saelens, J. A. Melero, C. T. Verrips, S. Van Gucht and H. J. de Haard, "Llama-Derived Single Domain Antibodies to Build Multivalent, Superpotent and Broadened Neutralizing Anti-Viral Molecules" *PLoS ONE*, Vol.6, 2011.

P.Vanlandschoot, C. Stortelers, E. Beirnaert, L. Itati Ibnez, B. Schepens, E. Depla and X. Saelens, "Nanobodies:New ammunition to battle viruses" *Antiviral Research*, pp 389-407, 2011.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4 ลำดับกรดอะมิโนของแอนติบอดีทั้ง 14 โคลนแสดงดังนี้ (*หมายเหตุ ข้อมูลส่วนนี้ปกปิดเป็นความลับ เพราะกำลังอยู่ในระหว่างการยื่นขอจดสิทธิบัตร*)

โดยจากการประดิษฐ์ตามขั้นตอนที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้ได้ชิ้นส่วนแอนติบอดีมนุษย์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมชนิด scFv ที่เชื่อมต่อกับ 6 Histidine (His-tag) และ Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-SerGlu-Glu-Asp-Leu (Myc-tag) ซึ่งจำเพาะต่อโรคพิษสุนัขบ้า (*Rhabdoviridae Lyssavirus*) จำนวน 13 ชนิด ดังต่อไปนี้

<u>ชนิดที่ 1</u> เรียกว่า Human anti-Rabies IR7c-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
Phe Ser Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg
Gln Ile Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ala Val Ile Tyr Ala Arg Gly Ile Asn Thr
Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile
Leu Tyr Leu Glu Met Asn Arg Leu Ser Ser
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
Asp Asp Pro Pro Ser Gly Thr Gly Ser Tyr
His Val Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser
Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser
Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser
Tyr Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr
Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn
Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser
Ser Tyr Thr Ser Ile Thr Ala Ala Ala Val
Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

Gly Ala Ala Ala His His His His His His
Gly Ala Ala Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile
Ser Glu Glu Asp Leu

ชนิดที่ 2 เรียกว่า Human anti-Rabies IYF5c-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val
Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr
Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp
Gly Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser
Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn
Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln
Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser
Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly
Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly
Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His
His His Gly Ala Ala Gly Pro Glu Gln Lys Leu
Ile Ser Glu Glu Asp Leu

ชนิดที่ 3 เรียกว่า Human anti-Rabies IIIR14c-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
Pro Gly Leu Val Lys Pro Phe Gly Asp Pro
Gly Pro His Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
Leu Ser Ser Val Asn Ser Tyr Trp Asp Phe
Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Thr
Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg
Val Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Gln Asn
Gln Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser Leu Thr
Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
Arg Glu Ser Val Thr Arg Gly Thr Phe Asp
Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala
Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser
Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr
Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly
Lys Ala Pro Asn Leu Met Ile Tyr Asp Val
Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala
Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Ala Glu
Asp Glu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Ala Tyr
Thr Ser Ser Ser Ser Leu Gly Val Phe Gly
Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala
Ala Ala His His His His His His Gly Ala
Ala Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
Glu Asp Leu

<u>ชนิดที่ 4</u> เรียกว่า Human anti-Rabies IYC11c-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปบไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val
Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala

Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile
Asn Pro Asn Ser Gly Thr Thr Thr Tyr Ala
Gln Arg Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr
Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met
Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Phe Gly
Gly Tyr Trp Arg Trp Gly Ala Phe Asp Ile
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Val Leu
Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro
Gly Lys Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly
Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro
Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile
Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser
Asp His Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln
Leu Thr Val Leu Arg Ala Ala Ala His His
His His His His Gly Ala Ala Gly Pro Glu
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

<u>ชนิดที่ 5</u> เรียกว่า Human anti-Rabies IYC12c -His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ser Ser Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Ala Thr
Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
Gly Tyr Ser Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
Ser Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro
Ser Ser Thr Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg
Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser
Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr
Arg His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
Leu Ile Tyr Ile Asp Asp Arg Arg Pro Ser
Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg
Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser
Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn
Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu
Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His
His His His Gly Ala Ala Gly Pro Glu Gln
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

<u>ชนิดที่ 6</u> เรียกว่า Human anti-Rabies IRC3c-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala
Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile
Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ala Trp Tyr
Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys
Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser

Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr
Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His
His His His Gly Ala Ala Gly Pro Glu Gln
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

<u>ชนิดที่ 7</u> เรียกว่า Human anti-Rabies IYD1c-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ser Ala Ile Thr Tyr Asn Gly Ala Ser Thr
Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
Gly Tyr Ser Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
Gly Gly Ser Ser Ser Lys Leu Thr Gln Asp
Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu
Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile
Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
Thr Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu
Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val
Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Ala
Leu Arg Ala Ala Ala His His His His His
His Gly Ala Ala Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Ser Glu Glu Asp Leu

ชนิดที่ 8 เรียกว่า Human anti-Rabies IIRD5v-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
Thr Glu Val Arg Lys Pro Gly Asp Ser Val
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
Gly Trp Ile Tyr Pro Lys Arg Gly Gly Thr
His Ser Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val
Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr
Ala Tyr Met Glu Leu Thr Arg Leu Arg Ser
Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
Asp Arg Asp Ile Glu Asp Ala Phe Asp Ile
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu
Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro
Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly
Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Ala Lys
Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Asp Val Ser
Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp
Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Thr
Thr Ser Ser Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
His His His His His His Gly Ala Ala Gly
Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

ชนิดที่ 9 เรียกว่า Human anti-Rabies IIYB5v-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr
Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val
Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr
Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Asp Arg Glu Leu Pro Gly Phe Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
Gly Gly Asp Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr
Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly
Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser
Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg
Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala
Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asn Arg
Leu Asn Ala Glu Trp Val Phe Gly Gly Gly
Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Ala Ala Ala
His His His His His His Gly Ala Ala Gly
Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

<u>ชนิดที่ 10</u> เรียกว่า Human anti-Rabies IIYD4v-His-Myc ซีดีเอ็นเอของ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Leu Asp Ile Thr Met Ile Pro Glu Gly Pro
Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
Ser Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys Thr Val
Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser
Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln Trp Tyr Gln
Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp
Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile
Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr
Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His
His His Gly Ala Ala Gly Pro Glu Gln Lys
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

<u>ชนิดที่ 11</u> เรียกว่า Human anti-Rabies IIYG4v-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp
Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys
Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys
Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg Glu Arg Met Gly Gly Phe Asp
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asn Phe Met
Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser
Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr
Arg Thr Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr
Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser
Ser Pro Thr Thr Val Ile Phe Glu Asp Thr
Ala Arg Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
Ser Gly Ser Ile Asp Pro Phe Ser Asn Ser
Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Ala
Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser
Tyr Asp Val His Asn Gln Val Phe Gly Gly
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala
Ala His His His His His His

ชนิดที่ 12 เรียกว่า Human anti-Rabies IIYE5v-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
Pro Gly Leu Val Lys Pro Pro Gln Thr Leu
Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
Val Ser Ser Asn Thr Ala Ala Trp Asn Trp
Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys
Trp His Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Asn
Ser Arg Ile Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asp Ser
Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Tyr Gly Ser Gly
Ser Tyr Tyr Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
Gly Gly Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln

Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Arg Asn Ser
Gly Ser Ile Ala Ser Ala Tyr Val Gln Trp
Phe Arg Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr
Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu
Thr Ile Ser Gly Leu Gln Thr Glu Asp Glu
Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Phe
Thr Asn Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Gln
Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His
His His His His Gly Ala Ala Gly Pro Glu
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

<u>ชนิดที่ 13</u> เรียกว่า Human anti-Rabies IIYG8v-His-Myc ซีดีเอ็นเอ ที่กรอบอ่านประมวลรหัสของพอลิเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys
Gly Gly His Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr
Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly
Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly
Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr Val Asn
Trp Tyr Gln Val Pro Pro Arg Thr Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Asn Asn Gln Arg

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

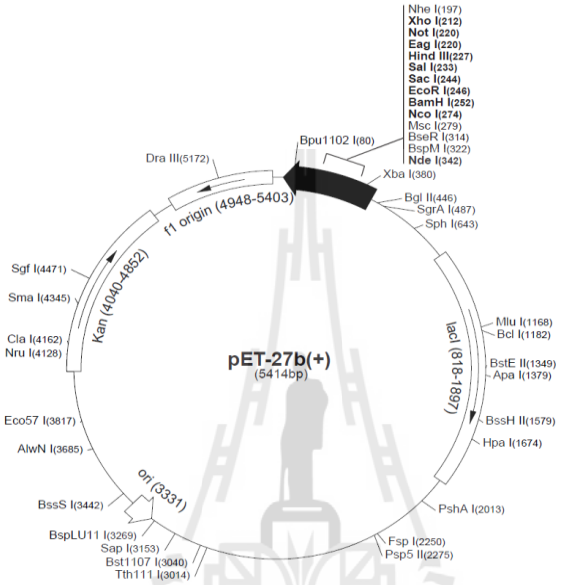
Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala
Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser
Leu His Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
Lys Val Thr Val Leu Arg Ala Ala Ala His
His His His His His Gly Ala Ala Gly Pro
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

<u>ชนิดที่14</u> ชิ้นส่วนแอนติบอดีมนุษย์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม เฉพาะสายเบา ชื่อ IRC3 ที่สามารถจับจำเพาะกับเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าได้ ด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม โดยใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ ซึ่งแอนติบอดีชนิดที่ได้ ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 153 ตัว มีโครงสร้าง 3 มิติ ของแอนติบอดีส่วนแปรปรวนสูงสายเบา (hypervariable region, light chain) ตรงปลายสุด มีเส้นเปบไทด์ที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวเชื่อมต่ออยู่ตอนท้าย มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 14 กิโลดาลตัน ที่มีประมวลรหัสของพอลิเปบไทด์ของชิ้นส่วนแอนติบอดี ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสายเบา ที่สามารถจับจำเพาะกับเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น

Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala
Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile
Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ala Trp Tyr
Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys
Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser
Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr
Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His
His His His

3.4 การผลิตเป็นชิ้นแอนติบอดีส่วน scFv อิสระ (soluble scFv antibody)

หลังจากที่ได้แสดงว่าแอนติบอดีที่อยู่บนผิวเฟจสามารถจับกับเป้าหมายคือไวรัส Rabies อย่างจำเพาะเจาะจงแล้ว ในขั้นต่อไปคือการนำไปผลิตให้เป็นชิ้นแอนติบอดี scFv อิสระ ไม่ติดอยู่บนผิวเฟจ ด้วยระบบการผลิตในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 โดยการใช้เวคเตอร์ pET27b+ (แสดงดังรูปด้านล่าง) เพื่อยืนยันความสามารถในการจับกับเป้าหมาย และให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นต่อไป คือการใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรักษาและวิเคราะห์ ทั้งนี้ความสามารถของระบบการแสดงออกของ *E. coli* ในการผลิตแต่ละโคลนของ แอนติบอดี scFv จะไม่เท่ากัน ขึ้นกับลำดับกรดอะมิโน และโครงสร้างของแอนติบอดี ซึ่งไม่อาจทำนายได้จนกว่าจะได้ลองทำจริง โดยผู้วิจัยได้ทำการเลือก 4 โคลนเพื่อผลิตแอนติบอดี scFv อิสระ ไม่ติดอยู่บนผิวเฟจ ออกมาและทำบริสุทธิ์ได้ดังภาพด้านล่าง



รูปที่ 1 แสดงเวคเตอร์ที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดีส่วน scFv อิสระ

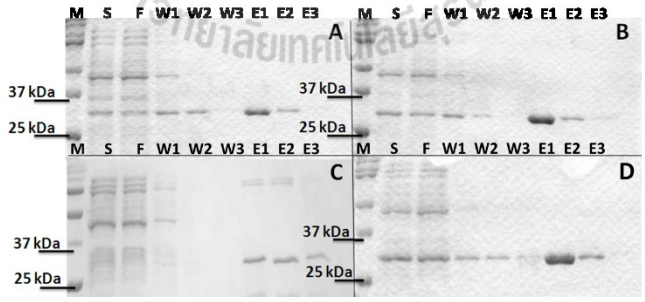


Figure 2. SDS PAGE of purified scFv antibody. SDS-PAGE stained with CBB;
(A) Anti-Rabies virus clone IRA7c, (B) Anti-Rabies virus clone IYF5c,
(C) Anti-Rabies virus clone IIIC2c, (D) Anti-Rabies virus clone IIYG4v;
Lene M, protein molecular weight marker; lene S, culture supernatant fraction; lene FT, flow-through fraction;
lene W1-W3, wash fraction; lene P, purified scFv antibody by IMAC.

รูปที่ 2 แสดงผลการผลิต แอนติบอดี scFv ชนิดต่างๆ และการทำให้บริสุทธิ์

3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า (neutralization assay)

การทำการวิจัยขั้นนี้ เป็นขั้นตอนสำคัญที่สุด สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรค โดยเป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า โดยการทดลองในจานทดลองซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับการรับรองโดย WHO ในการตรวจความสามารถของ anti-serum ในการยับยั้งเชื้อ เรียกวิธีการนี้ว่า Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) ดังนี้

3.4.1 เจือจางตัวอย่างแอนติบอดี 2 เท่า (2-fold interval) จำนวน 8 ครั้ง โดยใช้ 2% DMEM

3.4.2 เติมไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า 50 µl (100 TCID50) ผสมกับแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 µl จากนั้นบ่มที่ 37 ^{O}C เป็นเวลา 90 นาที ใน CO_2 incubater

3.4.3 เติมเซลล์ BHK-21 (10^5 cell/well) 50 ul

3.4.4 บ่มที่ 37 ^{O}C เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ใน CO_2 incubater หลังจากนั้นเทอาหารออก

3.4.5 ล้างด้วย PBS แล้วตรึงเซลล์ด้วย 90% acetone จากนั้นทำให้แห้งในตู้บ่ม

3.4.6 ย้อมด้วย FITC labeled anti-rabies ที่ 37 ^{O}C เป็นเวลา 30 นาที

3.4.7 ล้างด้วย PBS จากนั้นทำให้แห้งในตู้บ่ม

3.4.8 ทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้อง fluorescence microscope (negative field/8 fields) และนับพื้นที่ที่เซลล์ไม่มีเชื้อไวรัสภายใน (Negative field)

3.4.9 คำนวณ TCID50 โดยวิธี Spearman-Karber

Log TCID 50 = L - D(s - 0.5)

L = Log of the strongest dilution

D = Difference between log dilution

S = sum of proportion of negative filed

ตัวอย่าง

Dilution	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Negative field / 8 fileds	8/8	7/8	4/8	1/8	0/8
Proportion	1	0.88	0.5	0.12	0

Sum of proportions = 1.5 (from 1:32 to 1:256 dilutions)

The starting dilution is 1:32; log = -1.5

The dilution are twofold log 2 = +0.3

Log TCID50 = -1.5.0.3 (1.5-0.5) = -1.8

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

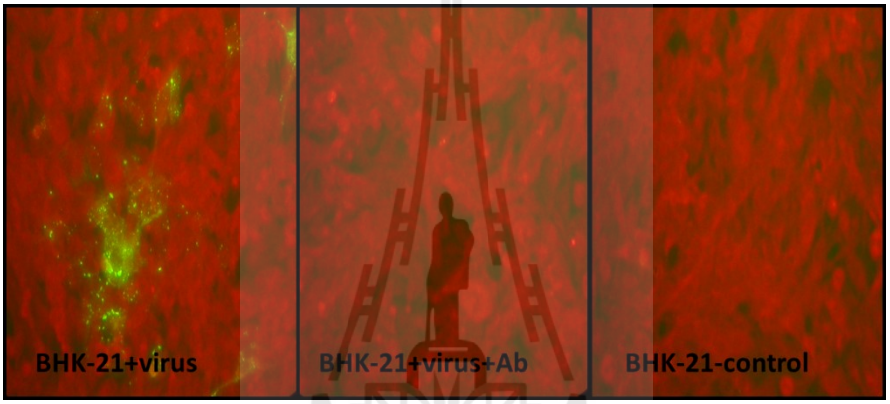
Antilog = dilution giving 50 % reduction in negative fields = 1: 63

เปรียบเทียบเป็นหน่วยสากล (international units) โดยเทียบกับซีรั่มมาตรฐาน (WHO standard serum)

<u>อ้างอิง</u>

Matsumoto, T., Yamada, K., Noguchi, K., Nakajima, K., Takada, K., Khawplod, P., and Nishizono, A. (2010). Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus. Microbiology and immunology 54, 673-683.

ตัวอย่างแสดงผลการวิเคราะห์ RFFIT แสดงดังภาพด้านล่าง



รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งแอนติบอดีด้วยวิธีการ RFFIT สีเขียว (หรือขาวในภาพขาว-ดำ) คือเชื้อไวรัสที่ถูกย้อมด้วยแอนติบอดีเรืองแสง หากแอนติบอดีสามารถยับยั้งเชื้อไม่ให้เข้าไปทำลายได้จะไม่เห็นเชื้อไวรัสในเซลล์

ผลสรุปความสามารถในการยังยั้งแอนติบอดีทั้ง 4 แสดงดังตารางในหน้าถัดไป

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถของแอนติบอดี ในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า

Soluble scFv antibody (concentration)	IU/ml	IU/mg
IRA7c (500 ug/ml)	2.27	4.54
IRA7c (4900 ug/ml)	20.13	4.10
IYF5c (284 ug/ml)	Negative	Negative
IIIRC2c(500 ug/ml)	0.10	0.20
IIYG4v (125.21 ug/ml)	Negative	Negative

Soluble scFv antibody (concentration)	IU/ml	IU/mg
3C1; negative control (368 ug/ml)	Negative	Negative

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4 : บทสรุป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการคัดหาโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้าจากคลังเฟจที่แสดงแอนติบอดี (scFv) มนุษย์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า (คลัง YAMO-I) และคลังที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัส (คลัง Yamo-Rb) ทั้งหมดจำนวน 14 โคลนดังแสดงในตารางที่ 2 โดยทำการคัดเลือก (ไบโอแพนนิ่ง) จำนวน 1-5 รอบ โดยใช้เชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าที่หมดฤทธิ์แล้ว (inactivated virus) 2 ชนิด คือ PCEC และ PVRV เป็นเป้าหมายในการคัดเลือก ผลจากการทดสอบโดยใช้วิธีการอีไลซ่าพบว่าโคลนเหล่านี้มีความสามารถในการจับจำเพาะได้ดีต่อเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือก และเมื่อลำดับเบสของดีเอนเอได้ถูกวิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสและศึกษาลำดับกรดอะมิโนของแอนติบอดี แสดงให้เห็นว่าโคลน IRA7c และ โคลน IVB4cv เป็นโคลนเดียวกันที่ได้มาจากคลังเดียวกัน แต่วิธีการทำการคัดเลือก (ไบโอแพนนิ่ง) แตกต่างกัน ทำให้มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้าจากคลังเฟจที่แสดงแอนติบอดี (scFv) ท้ายที่สุดจำนวน 13 โคลน โมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้าที่แสดงบนผิวเฟจ (Phage scFv) ทั้ง 13 โคลนถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า (Neutralization) ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า มีเพียง IRA7c และ IIIRC2c ที่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าได้ ดังนั้นจึงได้เลือกแอนติบอดีเพียง 4 โคลนมาผลิต และทำให้บริสุทธิ์ได้ดีด้วยวิธีการ IMAC ได้แก่ IYF5c, IIYG4v, IRA7c และ IIIRC2c โดยทำการนำยีนของแอนติบอดีเหล่านี้ไปใส่ไว้ใน พลาสมิด pET27b(+) เพื่อให้ยีนทำการแสดงออกโดยการผลิตเป็นแอนติบอดี scFv แบบอิสระในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าโดยใช้แอนติบอดี scFv แบบอิสระ (soluble scFv)ยืนยันผลการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แสดงบนผิวเฟจ (Phage scFv) คือมีเพียง IRA7c และ IIIRC2c ซึ่งได้รับการคัดเลือกมาจากคลังแอนติบอดีมนุษย์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อพิษสุนัขบ้าเท่านั้น ที่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าได้ โดยมีความสามารถยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า 4.54 IU/mg และ 0.20 IU/mg ตามลำดับดังแสดงในตารางสรุปที่ 3 และ 4 ซึ่งชิ้นส่วนของแอนติบอดีมนุษย์ทั้ง 2 นี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปใช้เป็นแอนติบอดีสำหรับการรักษา หรือป้องกันโรคได้ต่อไป นอกจากนั้นแล้วยังมีผลการทดลองที่น่าสนใจคือ แอนติบอดีโคลน IYF5c ซึ่งแสดงความสามารถในการจับได้เป็นอย่างดีกับเชื้อไวรัสชนิดตาย (PCEC) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ ELISA แต่กลับไม่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคได้เลย ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ในการคาดเดาความสามารถของแอนติบอดีในการยับยั้งโรคได้จริง อย่างไรก็ตามแอนติบอดีนี้ อาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจสอบเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าในระดับ strain ได้ต่อไป

ข้อวิจารณ์ที่น่าสนใจจากงานวิจัยนี้คือ ในการทดลองนี้ผู้วิจัยทำการคัดหาแอนติบอดีที่จำเพาะจากคลังแอนติบอดีมนุษย์ 2 คลังคือ คลังย่าโม 1 ซึ่งเป็นคลังแบบปฐมภูมิ สร้างจากเลือดของมนุษย์ปกติทั่วๆ ไป 140 คน เป็นต้นแบบมีขนาดค่อนข้างใหญ่คือประมาณ $5x10^8$ ส่วนคลังที่ 2 เป็นคลังแบบทุติยภูมิสร้างจากเลือดมนุษย์ 4 คน ที่ได้รับการกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้ามาก่อนแล้ว วิธีการสร้าง

ใช้วิธีการเดียวกับการสร้างคลังย่าโม 1 แต่อาจเป็นเพราะความชำนาญของผู้สร้างไม่เท่ากัน จึงได้คลังขนาดเล็กกว่า คือ $1.5x10^6$ อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยนี้พบว่าแอนติบอดีที่คัดหามาได้จากคลังทุติยภูมิเท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า หากสร้างคลังทุติยภูมิขึ้นมาใหม่ในกรณีที่มีเป้าหมายที่สามารถทำการกระตุ้นโดยการฉีดวัคซีนได้ จะสามารถใช้เป็นแหล่งที่ดีในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการได้ถึงแม้จะเป็นคลังที่มีขนาดค่อนข้างเล็กก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสร้างคลังโดยใช้เลือดของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นโดยเป้าหมายที่จำพาะเจาะจงนั้น ทำให้ได้คลังที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อเป้าหมายอย่างแท้จริง โดยการที่แอนติบอดีโคลน IYF5c แสดงความสามารถในการจับได้เป็นอย่างดีกับเชื้อไวรัสชนิดตาย (PCEC) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ ELISA แต่กลับไม่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคได้เลย แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ในการคาดเดาความสามารถของแอนติบอดีในการยับยั้งโรคได้จริง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าตำแหน่งการจับของแอนติบอดีโคลน IYF5c ไม่มีผลต่อการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส ดังนั้นจึงทำให้ไวรัสยังคงเข้าสู่เซลล์และก่อให้เกิดโรคได้

ข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยนี้ได้ผลขั้นต้นเป็น scFv ที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาต่อยอดเป็น therapeutic antibody เพื่อป้องกันและรักษาโรคพิษสุนัขบ้าได้ จึงควรดำเนินการวิจัยต่อยอดต่อไป ด้วยการปรับให้เป็น full-length human IgG และการทำ antibody engineering เพิ่มเติม ให้แอนติบอดีมีคุณสมบัติดีขึ้นอีกในการจับและยับยั้งเป้าหมาย อีกทั้งยังควรทำ epitope mapping ต่อ เพื่อให้เข้าใจธรรมชาติการจับของแอนติบอดี กับเชื้อไวรัสต่อไป ส่วนแอนติบอดีที่ไม่ neutralize แต่สามารถจับกับเป้าหมายได้ดีบนจาน ELISA อาจนำไปพัฒนาต่อยอดเป็น detection probe ที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไป

ตารางที่ 2 ตารางสรุปผลการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้า จากคลัง YAMO-I และ คลัง Yamo-Rb จำนวน 14 โดยใช้เชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าที่หมดฤทธิ์แล้ว (inactivated virus) 2 ชนิด คือ PCEC และ PVRV เป็นเป้าหมายในการคัดเลือก

Library / Target	Yamo-Rb (immunized)	YAMOI (Non-immunized)	Total
PCEC	4	3	7
PVRV	1	5	6
PCEC+PVRV	1	-	1
Total	6	8	14

ตารางที่ 3 ตารางสรุปผลการทดลองของโคลนที่ถูกคัดเลือกจากคลังที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัส (คลัง Yamo-Rb)

Clone	ELISA result (Phage)		ELISA result (Soluble scFv)		Neutralization		
	PCEC	PVRV	PCEC	PVRV	Crude Phage	PEG/Nacl Phage	Soluble scFv
IRA7c* (IVB4cv)	++	+	+	-	Yes	Yes	Yes (4.54 IU/mg)
IIIRC2c*	++	+	+	-	Yes	Yes	Yes (0.20 IU/mg)
IRC3c	+	-	N/A	N/A	N/A	No	N/A
IIRD5v	-	++	N/A	N/A	N/A	No	N/A

ตารางที่ 4 ตารางสรุปผลการทดลองของโคลนที่ถูกคัดเลือกจากคลังเฟจที่แสดงแอนติบอดี (scFv) มนุษย์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า (คลัง YAMO-I)

Clone	ELISA result (Phage)		ELISA result (Soluble scFv)		Neutralization		
	PCEC	PVRV	PCEC	PVRV	Crude Phage	PEG/Nacl Phage	Soluble scFv
IYF5c	+++	-	+++	-	No	No	No
IYC11c	++	-	N/A	N/A	N/A	No	N/A
IYC12c	++	-	N/A	N/A	N/A	No	N/A
IYD1c	++	-	N/A	N/A	N/A	No	N/A
IIYG4v	++	+++	+	++	N/A	No	No
IIYG8v	-	+	N/A	N/A	N/A	No	N/A
IIYD4v	-	+	N/A	N/A	N/A	No	N/A
IIYE5v	+	+	N/A	N/A	N/A	No	N/A
IIYB5v	-	+++	N/A	N/A	N/A	No	N/A

หมายเหตุ; Signal of OD 405 nm

- No signal compared with negative control

+ Low signal compared with negative control

++ Medium signal compared with negative control

+++ High signal compared with negative control

No haven't got neutralizing activity

Yes have neutralizing activity

N/A is an abbreviation for not applicable

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Kay BK, Kasanov J, Yamabhai M: **Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries**. *Methods* 2001, **24**:240-246.
2. Kehoe JW, Kay BK: **Filamentous phage display in the new millennium**. *Chem Rev* 2005, **105**:4056-4072.
3. Rodi DJ, Makowski L, Kay BK: **One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies**. *Curr Opin Chem Biol* 2002, **6**:92-96.
4. Smothers JF, Henikoff S, Carter P: **Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries**. *Science* 2002, **298**:621-622.
5. Kay BK, Winter J, McCafferty J (Ed): *Phage Display of Peptides and Proteins : A laboratory manual* London: Academic Press; 1996.
6. Schumacher TN, Mayr LM, Minor DL, Jr., Milhollen MA, Burgess MW, Kim PS: **Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display**. *Science* 1996, **271**:1854-1857.
7. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G: **Making antibody fragments using phage display libraries**. *Nature* 1991, **352**:624-628.
8. O'Brien PM, Aitken R (Ed): *Antibody Phage Display : methods and protocols* New Jersey: Humana Press; 2002.
9. Yamabhai M, Hoffman NG, Hardison NL, McPherson PS, Castagnoli L, Cesareni G, Kay BK: **Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains**. *J Biol Chem* 1998, **273**:31401-31407.
10. Batra S, Srinivasan T, Rastogi SK, Kundu B: **Identification of enzyme inhibitors using combinatorial libraries**. *Curr Med Chem* 2002, **9**:307-319.
11. Kay BK, Hamilton PT: **Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries**. *Comb Chem High Throughput Screen* 2001, **4**:535-543.
12. Hancock RE, Sahl HG: **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies**. *Nat Biotechnol* 2006, **24**:1551-1557.
13. Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M: **Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies**. *Drug Discov Today* 2004, **9**:525-529.
14. Latham PW: **Therapeutic peptides revisited**. *Nat Biotechnol* 1999, **17**:755-757.
15. McCarron PA, Olwill SA, Marouf WM, Buick RJ, Walker B, Scott CJ: **Antibody conjugates and therapeutic strategies**. *Mol Interv* 2005, **5**:368-380.

16. Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR: **Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development**. *Curr Opin Biotechnol* 2006, **17**:638-642.
17. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ: **Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains**. *Nature* 1990, **348**:552-554.
18. Chang CN, Landolfi NF, Queen C: **Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection**. *J Immunol* 1991, **147**:3610-3614.
19. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G: **Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains**. *Nucleic Acids Res* 1991, **19**:4133-4137.
20. Bugli F, Graffeo R, Sterbini FP, Torelli R, Masucci L, Sali M, Grasso A, Rufini S, Ricci E, Fadda G, et al.: **Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice**. *Toxicon* 2008, **51**:547-554.
21. Burton DR, Barbas CF, 3rd, Persson MA, Koenig S, Chanock RM, Lerner RA: **A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:10134-10137.
22. Cai X, Garen A: **Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:6537-6541.
23. Graus YF, de Baets MH, Parren PW, Berrih-Aknin S, Wokke J, van Breda Vriesman PJ, Burton DR: **Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived phage display libraries from myasthenia gravis patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies**. *J Immunol* 1997, **158**:1919-1929.
24. Hof D, Hoeke MO, Raats JM: **Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens**. *Clin Exp Immunol* 2008, **151**:367-377.
25. Lee MS, Lee JC, Choi CY, Chung J: **Production and characterization of monoclonal antibody to botulinum neurotoxin type B light chain by phage display**. *Hybridoma (Larchmt)* 2008, **27**:18-24.
26. Persson MA, Caothien RH, Burton DR: **Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:2432-2436.

27. Shaw I, O'Reilly A, Charleton M, Kane M: **Development of a High-Affinity Anti-Domoic Acid Sheep scFv and its Use in Detection of the Toxin in Shellfish**. *Anal Chem* 2008.
28. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G: **By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage**. *J Mol Biol* 1991, **222**:581-597.
29. Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G: **Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents**. *EMBO J* 1994, **13**:692-698.
30. Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E, Schier R, Hemingsen G, Wong C, Gerhart JC, Marks JD: **Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:6157-6162.
31. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR: **Making antibodies by phage display technology**. *Annu Rev Immunol* 1994, **12**:433-455.
32. Barbas CF, 3rd, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA: **Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:4457-4461.
33. Benhar I: **Design of synthetic antibody libraries**. *Expert Opin Biol Ther* 2007, **7**:763-779.
34. Hoogenboom HR, Winter G: **By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro**. *J Mol Biol* 1992, **227**:381-388.
35. Hoogenboom HR: **Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies**. *Trends Biotechnol* 1997, **15**:62-70.
36. Fromant M, Blanquet S, Plateau P: **Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction**. *Anal Biochem* 1995, **224**:347-353.
37. Martineau P: **Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs**. *Methods Mol Biol* 2002, **178**:287-294.
38. Crameri A, Cwirla S, Stemmer WP: **Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling**. *Nat Med* 1996, **2**:100-102.
39. Fermer C, Andersson I, Nilsson K, Nilsson O: **Specificity rescue and affinity maturation of a low-affinity IgM antibody against pro-gastrin-releasing peptide using phage display and DNA shuffling**. *Tumour Biol* 2004, **25**:7-13.

40. Korpimaki T, Rosenberg J, Virtanen P, Lamminmaki U, Tuomola M, Saviranta P: **Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering**. *Protein Eng* 2003, **16**:37-46.

41. Proba K, Worn A, Honegger A, Pluckthun A: **Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution**. *J Mol Biol* 1998, **275**:245-253.

42. Zhang XX, Deng Q, Zhang SY, Liu J, Cai Q, Lu ZM, Wang Y: **Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library**. *J Med Virol* 2003, **71**:511-517.

43. Schier R, Bye J, Apell G, McCall A, Adams GP, Malmqvist M, Weiner LM, Marks JD: **Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection**. *J Mol Biol* 1996, **255**:28-43.

44. Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KW, Merritt H, Yim M, Crawford RS, Weiner LM, Marks C, Marks JD: **Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site**. *J Mol Biol* 1996, **263**:551-567.

45. Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S, Briones AT, Burton DR, Barbas CF, 3rd: **CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range**. *J Mol Biol* 1995, **254**:392-403.

46. Burtrum D, Zhu Z, Lu D, Anderson DM, Prewett M, Pereira DS, Bassi R, Abdullah R, Hooper AT, Koo H, et al.: **A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo**. *Cancer Res* 2003, **63**:8912-8921.

47. Dauvillier S, Merida P, Visintin M, Cattaneo A, Bonnerot C, Dariavach P: **Intracellular single-chain variable fragments directed to the Src homology 2 domains of Syk partially inhibit Fc epsilon RI signaling in the RBL-2H3 cell line**. *J Immunol* 2002, **169**:2274-2283.

48. Gejima R, Tanaka K, Nakashima T, Hashiguchi S, Ito Y, Yoshizaki K, Sugimura K: **Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling**. *Hum Antibodies* 2002, **11**:121-129.

49. Kovaleva M, Bussmeyer I, Rabe B, Grotzinger J, Sudarman E, Eichler J, Conrad U, Rose-John S, Scheller J: **Abrogation of viral interleukin-6 (vIL-6)-induced signaling by intracellular retention and neutralization of vIL-6 with an anti-vIL-6 single-chain antibody selected by phage display**. *J Virol* 2006, **80**:8510-8520.

50. Li Y, Li H, Wang MN, Lu D, Bassi R, Wu Y, Zhang H, Balderes P, Ludwig DL, Pytowski B, et al.: **Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody**. *Blood* 2004, **104**:1137-1144.

51. Paz K, Brennan LA, Iacolina M, Doody J, Hadari YR, Zhu Z: **Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation**. *Mol Cancer Ther* 2005, **4**:1801-1809.

52. Piloto O, Levis M, Huso D, Li Y, Li H, Wang MN, Bassi R, Balderes P, Ludwig DL, Witte L, et al.: **Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice**. *Cancer Res* 2005, **65**:1514-1522.

53. Willemsen RA, Ronteltap C, Chames P, Debets R, Bolhuis RL: **T cell retargeting with MHC class I-restricted antibodies: the CD28 costimulatory domain enhances antigen-specific cytotoxicity and cytokine production**. *J Immunol* 2005, **174**:7853-7858.

54. Rowley MJ, O'Connor K, Wijeyewickrema L: **Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions**. *Biotechnol Annu Rev* 2004, **10**:151-188.

55. Xie MH, Yuan J, Adams C, Gurney A: **Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv**. *Nat Biotechnol* 1997, **15**:768-771.

56. Kristensen P, Winter G: **Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages**. *Fold Des* 1998, **3**:321-328.

57. Pedersen JS, Otzen DE, Kristensen P: **Directed evolution of barnase stability using proteolytic selection**. *J Mol Biol* 2002, **323**:115-123.

58. Almagro JC, Fransson J: **Humanization of antibodies**. *Front Biosci* 2008, **13**:1619-1633.

59. Booy EP, Johar D, Maddika S, Pirzada H, Sahib MM, Gehrke I, Loewen S, Louis SF, Kadkhoda K, Mowat M, et al.: **Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics**. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006, **54**:85-101.

60. Hale G: **Therapeutic antibodies--delivering the promise?** *Adv Drug Deliv Rev* 2006, **58**:633-639.

61. Jolliffe LK: **Humanized antibodies: enhancing therapeutic utility through antibody engineering**. *Int Rev Immunol* 1993, **10**:241-250.

62. Mitra A, Nan A, Line BR, Ghandehari H: **Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer**. *Curr Pharm Des* 2006, **12**:4729-4749.

63. Reilly RM: **Radioimmunotherapy of solid tumors: the promise of pretargeting strategies using bispecific antibodies and radiolabeled haptens**. *J Nucl Med* 2006, **47**:196-199.
64. Santos AD, Padlan EA: **Development of more efficacious antibodies for medical therapy and diagnosis**. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998, **60**:169-194.
65. Stowell CP: **Therapy with immunoglobulin: applications for monoclonal antibodies**. *J Infus Nurs* 2006, **29**:S29-44.
66. Buscombe JR: **The future of infection imaging**. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2006, **50**:99-103.
67. Carter P, Merchant AM: **Engineering antibodies for imaging and therapy**. *Curr Opin Biotechnol* 1997, **8**:449-454.
68. Filpula D: **Antibody engineering and modification technologies**. *Biomol Eng* 2007, **24**:201-215.
69. Howard GC, Kaser MR (Ed): *Making and Using Antibodies: A Practical handbook*: CRC; 2006.
70. Teillaud JL: **Engineering of monoclonal antibodies and antibody-based fusion proteins: successes and challenges**. *Expert Opin Biol Ther* 2005, **5 Suppl 1**:S15-27.
71. Van de Wiele C, Revets H, Mertens N: **Radioimmunoimaging. Advances and prospects**. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2004, **48**:317-325.
72. Bakker AB, Marissen WE, Kramer RA, Rice AB, Weldon WC, Niezgoda M, Hanlon CA, Thijsse S, Backus HH, de Kruif J, et al.: **Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in vitro escape mutants**. *J Virol* 2005, **79**:9062-9068.
73. Goudsmit J, Marissen WE, Weldon WC, Niezgoda M, Hanlon CA, Rice AB, Kruif J, Dietzschold B, Bakker AB, Rupprecht CE: **Comparison of an anti-rabies human monoclonal antibody combination with human polyclonal anti-rabies immune globulin**. *J Infect Dis* 2006, **193**:796-801.
74. Kramer RA, Marissen WE, Goudsmit J, Visser TJ, Clijsters-Van der Horst M, Bakker AQ, de Jong M, Jongeneelen M, Thijsse S, Backus HH, et al.: **The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries**. *Eur J Immunol* 2005, **35**:2131-2145.
75. de Kruif J, Bakker AB, Marissen WE, Kramer RA, Throsby M, Rupprecht CE, Goudsmit J: **A human monoclonal antibody cocktail as a novel component of rabies postexposure prophylaxis**. *Annu Rev Med* 2007, **58**:359-368.

76. Yamabhai M, Kay BK: **Examining the specificity of Src homology 3 domain--ligand interactions with alkaline phosphatase fusion proteins**. *Anal Biochem* 1997, **247**:143-151.
77. Flamand A, Raux H, Gaudin Y, Ruigrok RW. **Mechanisms of rabies virus neutralization**. Virology. 1993 May; 194(1):302-13.
78. Reading SA, Dimmock NJ. **Neutralization of animal virus infectivity by antibody**. Arch Virol. 2007;152(6):1047-59. Epub 2007 Feb 15. Review.
79. Wilde H, Chutivongse S. **Equine rabies immune globulin: a product with an underserved poor reputation.** Am J Trop Med Hyg 1990; 42: 175-178.]
80. Wilde H, Tipkong P, Khawplod P. **Economic issues in rabies treatment**. J Travel Med 1999; 6: 238-42.
81. Hanlon CA, Niezgoda M, Morrill PA et al. **The incurable wound revisited; progress in human rabies prevention**. Vaccine 2001; 19: 2273-9.
82. Sriaroon C, Daviratanasilpa S, Sansomranjai P, Khawplod P, Hemachudha T,Khamoltham T, Wilde H. **Rabies in a Thai child treated with the eight-site post-exposure regimen without rabies immune globulin**. Vaccine. 2003 Sep 8;21 (25-26):3525-6.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน

๑. *ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ*

Pruksametanan, N., Yamabhai, M., and Khawplod, P. (2012). Selection of single chain human monoclonal antibody (scFv) against Rabies virus by phage display technology. Paper presented at: IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering, NANOMED.p.78-81

หมายเหตุ ผลงานนี้ได้รับรางวัล “Best Conference Paper Finalist” ในประเภทนักวิจัย

๒. *การยื่นจดสิทธิบัตร*

2.1 คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์เลขที่ 1201005938 วันที่ยื่นคำขอ 5 พฤศจิกายน 2555

ชื่อภาษาไทย: การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมนุษย์ชนิด scFv จากคลังแอนติบอดีมนุษย์ที่เชื่อมต่อกับ 6 Histidine (His-tag) และ Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-SerGlu-Glu-Asp-Leu (Myc-tag) สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า (Rhabdoviridae Lyssavirus) ด้วยเทคนิค fluorescence *in situ* hybridization

ชื่อภาษาอังกฤษ: Production of human scFv monoclonal antibodies from human scFv library, fused with 6 Histidine (His-tag) and Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-SerGlu-Glu-Asp-Leu (Myc-tag) for the diagnostic of rabies (Rhabdoviridae Lyssavirus) by fluorescence *in situ* hybridization technique

2.2 คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์เลขที่ 1201005939 วันที่ยื่นคำขอ 5 พฤศจิกายน 2555

ชื่อภาษาไทย: ชิ้นส่วนแอนติบอดีผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสายเดี่ยว (12 ชนิด) ที่สามารถจับจำเพาะกับเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า

ชื่อภาษาอังกฤษ: Single chain variable domain antibody fragments (12 kinds) that can bind specifically to rabies virus

2.3 คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์เลขที่ 1201005940 วันที่ยื่นคำขอ 5 พฤศจิกายน 2555

ชื่อภาษาไทย: ชิ้นส่วนแอนติบอดีผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสายเบาที่สามารถจับจำเพาะกับเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า

ชื่อภาษาอังกฤษ: Light chain variable domain antibody fragment that can bind specifically to rabies virus

2.4 คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์เลขที่ 1201005941 วันที่ยื่นคำขอ 5 พฤศจิกายน 2555
ชื่อภาษาไทย: ชิ้นส่วนแอนติบอดีผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสายเดี่ยวที่สามารถจับจำเพาะกับเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า ที่เตรียมมาจาก เซลล์ตัวอ่อนของไก่

ชื่อภาษาอังกฤษ: Single chain variable domain antibody fragment that can bind specifically to rabies virus derived from chick embryo cell

2.5 คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์เลขที่ 1301000990 วันที่ยื่นคำขอ 19 กุมภาพันธ์ 2556

ชื่อภาษาไทย: โมโนโคลนอลแอนติบอดีมนุษย์ชนิด scFv (Human anti-Rabies) ที่ติดฉลากด้วย FITC (Anti-Rables conjugated FITC) สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า (*Rhabdoviridae Lyssavirus*)ด้วยเทคนิค fluorescence *in situ* hybridization

ชื่อภาษาอังกฤษ: Human scFv antibody (Human anti-Rabies) tagged with FITC (Anti-Rables conjugated FITC) for the detection of rabies (*Rhabdoviridae Lyssavirus*) by fluorescence *in situ* hybridization technique

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข การผลิตบุคลากร

1. ส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยนี้ ได้ใช้เป็นส่วนหนึ่งวิทยานิพนธ์ ของนักศึกษาปริญญาโท 1 คน คือ นางสาว ณัชชา พฤกษาเมธานันท์
2. ส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยนี้ ใช้เป็นโครงการปัญหาพิเศษให้ นายศรัญ เพชรมาก นักเรียนทุน พสวท จาก รร สุรนารีวิทยา เรื่อง “การพัฒนาวิธีการตรวจสอบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ต่อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธีการ ELISA” ซึ่งผลงานนี้ ได้รับรางวัลดีเยี่ยมจากการนำเสนอผลการฝึกงาน เป็นภาษาอังกฤษในค่ายวิทยาศาสตร์ ภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2556 และยังได้รับการคัดเลือกเป็นตัวแทนประเทศไทยไปนำเสนอผลงานในการประชุม SSH science fair ระหว่างวันที่ 5-8 สค 2557 ที่ประเทศญี่ปุ่น อีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัยหลัก

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ 8 มกราคม 2510 เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. 2532 แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา 1 ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี 2536 ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา 9 เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. 2541 จากนั้นในปี พ.ศ. 2543-2545 ได้ทุนไปทำ postdoctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. 2546-2547 ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Insititute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศสหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2547 และมีบุตร 1 คน ชื่อ ด.ญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ และหัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) จนถึงปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ 39 เรื่อง อนุสิทธิบัตร 1 เรื่อง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของมหาบัณฑิต 5 คน และดุษฎีบัณฑิต 4 คน และเป็นหัวหน้า โครงการวิจัยทั้งหมด 36 โครงการ ได้รับรางวัลวิทยานิพนธ์ดีเด่นจาก วช ในปี 2547 และรางวัลพนักงานดีเด่นด้านการวิจัยจาก มทส ในปี 2556

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร 044 224152-4 224234 หรือ 244388 โทรสาร 044 224150
Email: montarop@g.sut.ac.th

ประวัติผู้วิจัยร่วม

ผกามาศ ขาวปลอด เกิดเมื่อวันที่ 15 กันยายน 2504 เป็นบุตรของ นายจุฑา และ นางชุลี ธนกิจ จบการศึกษาระดับประถมจากโรงเรียนเทศบาลบ้านบางเหนียว จบมัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนสตรีภูเก็ต และมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนภูเก็ตวิทยาลัย จบปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2526 เริ่มทำงานในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย (WHO Collaborating Center for Research on Rabies Pathogenesis and Prevention) งานวิจัยเกี่ยวกับไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าด้านการพัฒนาวิธีการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าแบบประหยัดวัคซีนด้วยวัคซีนที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง จัดตั้งห้องปฏิบัติการตรวจหาภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้าด้วยเทคนิคเซลล์เพาะเลี้ยง (Rapid Immunofluorescent Focus Inhibition Test) ทดแทนเทคนิคการใช้สัตว์ทดลอง (Mouse Neutralization Test) ด้วยความร่วมมือจาก Dr. Mary Warell , Oxford University และ Pasteur Institute, ประเทศ ฝรั่งเศส ปี 2546-2550 ได้รับทุน RONPAKU ไปศึกษาต่อในระดับปริญญาเอกที่ Oita University ประเทศญี่ปุ่น ปี 2546-2548 ศึกษาเทคนิคการทำ recombinant rabies virus กับ Dr. Kenjiro Morimoto ที่สถาบัน NIID (Nation Institute of Infectious Diseases) โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น 2549-2550 ไปทำงานวิจัย ศึกษาและพัฒนาชุดตรวจ rabies antigen ด้วยเทคนิค immunochromatography (ICT kit) และนำไปประยุกต์ใช้ตรวจ rabies antibody (RAPINA test) ร่วมกับ Prof.Akira Nishizono , Oita University ประเทศญี่ปุ่น ปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 65 เรื่อง

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
1871 ถนนพระราม4
ปทุมวัน กรุงเทพฯ10330

50/802 ม.สถาพร ซอย7
ถนนรังสิตนครนายก ต.บึงยี่โถ อ.ธัญบุรี
ปทุมธานี12130

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี