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 ตามลำดับซึ่งชิ้นส่วนของแอนติบอดีมนุษย์ทั้ง 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.