

สรารัตน์ หัตถกรรม : การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจในการศึกษาแอนติบอดีมนุษย์ต่อเชื้อไวรัสไข้เลือดออก(APPLICATION OF PHAGE DISPLAY ANTIBODY TECHNOLOGY FOR THE STUDY OF HUMAN ANTI-DENGUE MONOCLONAL ANTIBODIES) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร.ภญ. มณฑารพ ยมาภย์ 160 หน้า.

ไวรัสเดงกี (Dengue) ทั้งสี่สายพันธุ์ และไวรัสซิกา (Zika) เป็นไวรัสในกลุ่มเฟลวิไวรัส (Flavivirus) สามารถติดต่อจากคนสู่คนโดยมียุงลายเป็นพาหะ และมักจะพบการระบาดของไวรัสทั้งสองชนิดนี้ในพื้นที่เดียวกัน การติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง สามารถก่อให้เกิด asymptomatic อาการเบื้องต้น คล้ายไข้หวัดทั่วไปคือ ไข้เดงกี (Dengue fever; DF) จนไปถึงระดับความรุนแรงที่เป็นอันตรายถึงชีวิตคือ ไข้เลือดออก (Dengue hemorrhagic fever; DHF) และ ไข้เลือดออกภาวะช็อค (Dengue shock syndrome; DSS) ส่วนการได้รับเชื้อไวรัสซิกานั้น สามารถส่งผลที่ร้ายแรงต่อหญิงตั้งครรภ์ โดยทำให้เสี่ยงต่อการแท้งบุตร หรืออาจให้กำเนิดทารกที่มีศีรษะขนาดเล็กกว่าปกติ และมีผลต่อการเกิดโรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง หรือกลุ่มอาการกูเลนแบร์ในผู้ใหญ่ (Guillain-Barré syndrome) ปัจจุบันนี้ยังไม่มียาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคไข้เลือดโดยตรง หรือแม้แต่วัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่สายพันธุ์และซิกา อีกทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจนว่า ภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีจะส่งผลกระทบต่อ การป้องกันหรือเสริมการเกิดโรคจากการติดเชื้อไวรัสซิกาในมนุษย์ ในวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ทำการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีสุขภาพดีจำนวน 61 คนที่อาศัยอยู่ในจังหวัดนครราชสีมาซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของไวรัสเดงกี พบว่าอาสาสมัครจำนวน 52 และ 51 คน มีแอนติบอดีต่อไวรัสเดงกี และไวรัสซิกาตามลำดับ โดยในจำนวน 52 คนนั้นมีทั้งสิ้น 23 คนที่เคยได้รับเชื้อไวรัสเดงกีมากกว่าหนึ่งครั้ง (Secondary infection) หรือคิดเป็นร้อยละ 44.23 โดยพบว่าประชากรกลุ่มนี้มีแอนติบอดีที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีและซิกาได้ ในอัตราสูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้เคยติดเชื้อเดงกีมาก่อนเพียงครั้งเดียว (Primary infection) ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีหลายครั้งสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสซิกาได้ นอกจากนั้นแล้วในโครงการวิจัยนี้ยังได้นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์เลือดอาสาสมัคร 40 รายซึ่งมีแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสเดงกีทั้งสี่สายพันธุ์ ไปทำการสร้างคลังแอนติบอดีบนผิวเฟจ แล้วทำการคัดเลือกแอนติบอดีชนิด scFv โดยใช้ไวรัสเดงกีสายพันธุ์ที่สอง เป็นเป้าหมายในการคัดเลือก ในการทดลองนี้ได้ค้นพบแอนติบอดีโคลน DV2H12 ซึ่งต่อมาถูกผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมให้เป็นแอนติบอดีมนุษย์ชนิดเต็มรูปแบบคือ IgG แล้วทำการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่าแอนติบอดี

DV2H12 สามารถป้องกันการติดไวรัสแดงก็ได้ทั้งสี่สายพันธุ์ในประสิทธิภาพระดับปานกลาง แต่เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในหนูทดลองชนิด AG129 พบว่าแอนติบอดีไม่สามารถป้องกันหนูจากการติดไวรัสแดงก็ได้ อีกทั้งยังส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสแดงที่สายพันธุ์สองอีกด้วย ผลจากการศึกษากลไกจับจำเพาะของแอนติบอดี (epitope mapping) ด้วยเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่แอนติบอดีอาจจะจับกับโปรตีนชนิด prM ของไวรัสแดงที่สายพันธุ์สอง เมื่อศึกษาบทบาทของ CD4⁺ T cell ในการควบคุมการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสแดงที่และซิก้าในหนูทดลอง *LysMCre⁺Ifnar1^{fl/fl}* โดยทำการกำจัดเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด CD4⁺ T cell ในหนูทดลอง พบว่าระดับของการแสดงออกและการตอบสนองของแอนติบอดีและ B cell ต่อไวรัสซิก้าลดลง ดังนั้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด CD4⁺ T มีส่วนสำคัญในการสร้างแอนติบอดีที่มีความสามารถจับจำเพาะต่อไวรัสซิก้าและแดงก็ องค์ความรู้ใหม่จากการศึกษาทั้งหมดนี้สามารถนำไปใช้เพื่อการพัฒนาวัคซีนต่อไปในอนาคต และยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อทำความเข้าใจการเกิดโรคของไวรัสแดงที่ หรือไวรัสซิก้าได้



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

SARARAT HATTAKAM : APPLICATION OF PHAGE DISPLAY
ANTIBODY TECHNOLOGY FOR THE STUDY OF HUMAN ANTI-
DENGUE MONOCLONAL ANTIBODIES. THESIS ADVISOR : PROF.
MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 160 PP.

DENGUE VIRUS/ZIKA VIRUS/PRE-EXISTING IMMUNITY/DENV-ELICITED
ANTIBODY/NEUTRALIZATION ANTIBODY/RECOMBINANT ANTIBODY

Four serotypes of Dengue virus (DENV1-4) and Zika virus (ZIKV) are antigenically related mosquito-borne flaviviruses, circulating in overlapping geographical regions that represent a significant threat to global health. Infection with one of the four DENV serotypes can cause a broad spectrum of illnesses ranging from asymptomatic, mild disease known as dengue fever (DF) to severe, life-threatening syndromes called dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS), while ZIKV infection is associated with microcephaly in fetuses of infected mothers and Guillain-Barré syndrome in adults. To date, there are no safe, effective drugs approved for clinical use, as well as the effect of prior DENV1-4 immunity on ZIKV cross-neutralization has remained unclear. Here, we conducted a ZIKV and DENV seroprevalence survey in 61 healthy participants (aged ranged 18-69 years) from a DENV-endemic area Nakhon Ratchasima, Thailand. We observed 52 and 51 with DENV and ZIKV seropositive, respectively. Notably, participants with serologically classified secondary DENV infection (23/52, 44.23%) had strikingly higher titers and broader reactivity of neutralizing antibodies against ZIKV and DENV heterotypes compared with participants with primary DENV infection. These data suggest that

multiple exposures to heterologous DENV prior to ZIKV provoke enduring DENV/ZIKV cross-neutralization antibody response. This finding was implemented for the construction of a human antibody phage display library derived from DENV immune people, of which 40 blood samples that showed seropositive for all dengue serotypes were used as templates for scFv genes. We identified a DENV cross-reactive human monoclonal antibody (mAb), DV2H12 from bio-panning using purified whole DENV2 particle as the target. The mAb DV2H12 showed moderately neutralization against DENV1-4; however, it significantly promoted antibody-dependent enhancement (ADE) of DENV2 infection in AG129 mice. The epitope mapping by bio-panning of the phage display peptide library revealed that the antibody might recognize the DENV2 prM protein. Additionally, we studied the role of CD4⁺ T cells in the regulation of anti-ZIKV/DENV production using *LysMCre⁺Ifnar1^{fl/fl}* mice. Treatment of mice with a CD4⁺ T cell-depleting Ab reduced the plasma cell, germinal center B cell, and IgG responses to ZIKV or DENV. This result demonstrates that CD4⁺ T cells are required mainly for the generation of a DENV- or ZIKV-specific humoral immune response. These findings may provide significant implications for future vaccine design and facilitate understanding of the pathogenesis of DENV and ZIKV infection.

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature

Advisor's Signature