

รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์

รหัสโครงการ P-13-50163

การพัฒนาวิธีการใหม่สำหรับตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส และอินทิเกรส ของเอชไอวี-1 เพื่อ
ประยุกต์ใช้ในการควบคุมระดับยา และการค้นหายาใหม่
Development of novel enzymatic activity assays for HIV-1 protease and integrase for
drug level control and drug discovery applications

ชื่อหัวหน้าโครงการ

ศ.ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา

แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีการใหม่สำหรับตรวจหาเอนไซม์โปรตีเอส และอินทิเกรสของเอชไอวี-1 เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมระดับยา และการค้นหายาใหม่” (Development of novel enzymatic activity assays for HIV-1 protease and integrase for drug level control and drug discovery applications) ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.) โดยมีสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เป็นผู้บริหารจัดการโครงการ ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ ศูนย์ชีวโมเลกุลเพื่อการรักษาและวินิจฉัย ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวการแพทย์ ขอขอบพระคุณหน่วยงาน Program for HIV Prevention and Treatment (PHPT) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์และสนับสนุนเกี่ยวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างและเตรียมตัวอย่าง พลาสมาที่นำมาใช้ในการทดลอง ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบพระคุณองค์การเภสัชกรรม ที่ให้การสนับสนุนยาต้านไวรัสในกลุ่มของ protease และ integrase inhibitor ขอขอบพระคุณบริษัทไอเมด ลาบอราทอรี จำกัด ในการสนับสนุนอุปกรณ์และจัดทำ strip แบบมาตรฐานให้ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ผู้ช่วยวิจัย และนักศึกษาทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือจนทำให้งานสำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย และท้ายที่สุดขอขอบพระคุณทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.) โดยมีสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เป็นผู้บริหารจัดการโครงการ ประจำปี 2557 ที่มอบทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยครั้งนี้จนประสบผลสำเร็จตามเป้าหมายที่ตั้งไว้

(ศาสตราจารย์ ดร. ชัชชัย ตะยาภินันดา)

หัวหน้าโครงการวิจัย

14 กรกฎาคม 2559

บทคัดย่อ

โรคเอดส์ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ปัจจุบันการรักษาโรคเอดส์จะใช้สูตรยาต้านไวรัสที่เรียกว่า highly active retroviral therapy หรือ HAART โดยสูตรยาดังกล่าวสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส และช่วยรักษาระดับของเซลล์ CD4+ lymphocyte ไม่ให้ลดลง การได้รับยาต้านไวรัสอย่างสม่ำเสมอทำให้สามารถควบคุมปริมาณไวรัสให้อยู่ในระดับที่ผู้ป่วยสามารถดำรงชีวิตได้อย่างปกติ แต่ในทางตรงกันข้ามหากผู้ติดเชื้อมีการรับประทานยาที่ไม่สม่ำเสมอก็จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส และจำเป็นต้องเปลี่ยนสูตรยาใหม่ซึ่งจะทำให้มีต้นทุนในการรักษาที่เพิ่มขึ้น ดังนั้น การตรวจหาระดับยาและการคัดสรรหาตัวยาด้านไวรัสตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีจะเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยทำให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการทำวิจัยนี้คือ การมุ่งเน้นที่จะสร้างชุดตรวจสอบคุณภาพของยาต้านไวรัสในกลุ่ม protease inhibitor และ integrase inhibitor แบบ in vitro biological activities ซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อน ในรูปแบบ high-throughput assay โดยจะนำไปตรวจพยากรณ์ระดับยา protease inhibitor ชนิดต่างๆ ในกระแสเลือดด้วยหลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่เข้าถึงได้ง่าย และไม่ต้องเปลี่ยนชุดตรวจเมื่อเปลี่ยนตัวยา อีกทั้งยังสามารถอ่านผลทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ทั้งนี้เพื่อติดตามความสม่ำเสมอในการรับประทานยา (drug adherence) ในขณะที่ชุดตรวจหา integrase activity แบบใหม่จะสามารถทำได้ง่ายด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์โดยไม่ต้องใช้สารรังสีตามที่เคยที่ใช้กันในอดีต ทำให้ลดปัญหาเรื่องการกำจัดขยะรังสีซึ่งมีอันตรายต่อคนและสิ่งแวดล้อม โดยผู้วิจัยหวังว่าจะนำชุดตรวจหา protease activity และ integrase activity อย่างง่ายนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองหายา หรือสมุนไพรใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอชไอวีโปรตีเอสและอินทิเกรสที่เหมาะสมกับไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ของผู้ติดเชื้อในอนาคต ซึ่งองค์ความรู้นี้จะนำไปสู่การค้นพบยาใหม่ที่ถูกคิดค้นโดยคนไทย รวมไปถึงอาจจะสามารถลดการนำเข้าของยาใหม่ และจะนำไปสู่การลดอัตราการเกิดโรคอุบัติใหม่ได้ในอนาคต

คำสำคัญ เอชไอวี-1 อินทิเกรส โปรตีเอส การติดตามการให้ได้รับยา การค้นหายาใหม่ เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ วิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี

Abstract

Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) remains a major public health problem in Thailand. Treatment of HIV-infected patient using highly active retroviral therapy (HAART) can suppress viral replication and increase maintain the level of CD4⁺ lymphocyte cells. Adherence to HAART can improve health and prolong life of HIV-infected patients. However, non-adherence to antiretroviral drugs leads to development of HIV drug-resistance strains. Therefore, the high costs of new generation antiretroviral drugs are needed. In this study, we aimed to develop a high throughput assay for examining the enzymatic activity of HIV-1 protease (PR) and integrase (IN). These assays will be applicable for assessing the level of HIV-1 protease inhibitors (PIs) and integrase inhibitors in HIV-infected patients who received antiretroviral treatment. The novel immunochromatographic (IC) strip test for determining of HIV-PR activity was developed by combining proteolysis activity of HIV-PR and an immunochromatographic reaction. This IC strip could be adapted to evaluate the biological activity of PI and also semi-quantify the level of PI in HIV-1 infected individual. Furthermore, we established a non-radioisotopic testing based on real-time polymerase chain reaction (PCR) assay to determine HIV-1 integrase activity. This assay has been shown to be effective and inexpensive for a high-throughput screening of novel IN inhibitors. The novel development of enzymatic activity assay of HIV-1 protease and integrase using immunochromatographic strip test and real-time PCR assay could provide as a high-throughput screening platform for discovering new synthetic antiretroviral agents or natural compounds from Thai medicinal plants by Thai researcher. This study might be able to reduce the importation of new generation antiretroviral drugs from other countries.

Keyword: HIV-1, Integrase, Protease, Drug monitoring, Drug discovery, Real time-PCR, Immunochromatographic strip test

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	8
สารบัญภาพ	9
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	10
บทนำ	11
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	11
การทบทวนวรรณกรรม	12
วัตถุประสงค์	14
เนื้อเรื่อง	
เครื่องมือและอุปกรณ์	15
สารเคมี	16
วิธีดำเนินการวิจัย	
1. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 โดยเทคนิค immunochromatographic (IC) strip test	18
1.1 การเตรียมเอนไซม์ protease (HIV-PRH ₆) จากแบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3)	20
1.2 การเตรียม HIV-1 protease substrate (H ₆ MA-CA)	20
1.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	20
1.4 การตรวจสอบ activity ของ HIV-1 protease โดยเทคนิค ELIS-based HIV-PR activity assay (ELIB-PA)	21
1.5 หาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำไปติดฉลากกับ colloidal gold	21
1.6 การทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก anti-MA mAb ด้วย colloidal gold และประสิทธิภาพในการจับของแอนติบอดี	21
1.7 การทดสอบระบบการทำ immunochromatographic strip test โดยระบบ Pilot test	22
1.8 การทดสอบ IC strip แบบ pilot test เพื่อหา sensitivity โดยใช้ยา LPV ในทดสอบ	22

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1.9 การทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip ด้วยยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease	22
1.10 การประกอบและทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ IC strip แบบมาตรฐาน	23
1.11 การประเมินประสิทธิภาพของ IC strip test ในการตรวจระดับยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ในพลาสมา	23
1.12 การเปรียบเทียบมาตรฐานระหว่างชุดทดสอบ protease activity strip กับวิธีมาตรฐาน	23
1.13 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพร	23
1.14 การเปรียบเทียบผลของระดับยาต้านการทำงานของ protease แบบยาเดี่ยวและยาที่ใช้ร่วมกัน	24
1.15 ทดสอบเพื่อประเมินผลของยาในพลาสมาของคนปกติและพลาสมาของผู้ป่วยเอชไอวีที่ได้รับยา	24
2. การตรวจหา activity ของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real-time PCR	25
หลักการ	25
2.1 การผลิตเอนไซม์ integrase และการทำให้บริสุทธิ์	26
2.2 การเตรียม HIV- DNA substrate	27
2.3 การเตรียม avidin-coated PCR tube	27
2.4 การตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค PCR	27
2.5 การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real time-PCR	28
2.6 การทดสอบฤทธิ์ของยาในการต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real time- PCR	28
ผลการวิจัย	
1. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 โดยเทคนิค immunochromatographic (IC) strip test	29
1.1 การเตรียมเอนไซม์ protease (HIV-PRH ₆) จากแบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3)	29
1.2 การเตรียม HIV-1 protease substrate (H ₆ MA-CA)	30
1.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	31
1.4 การตรวจสอบ activity ของ HIV-1 protease โดยเทคนิค ELIS-based HIV-PR activity assay (ELIB-PA)	31
1.5 หาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำไปติดฉลากกับ colloidal gold	32
1.6 การทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก anti-MA mAb ด้วย colloidal gold และประสิทธิภาพในการจับของแอนติบอดี	32

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1.7 การทดสอบระบบการทำ immunochromatographic strip test โดยระบบ Pilot test	34
1.8 การทดสอบ IC strip แบบ pilot test เพื่อหา sensitivity โดยใช้ยา LPV ในทดสอบ	36
1.9 การทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip ด้วยยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease	37
1.10 การประกอบและทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ IC strip	39
1.11 การประเมินประสิทธิภาพของ IC strip test ในการตรวจระดับยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ในพลาสมา	41
1.12 การเปรียบเทียบมาตรฐานระหว่างชุดทดสอบ IC strip กับวิธีมาตรฐาน HPLC	43
1.13 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการทำงานของ HIV-PRH ₆	43
1.14 การเปรียบเทียบผลของระดับยาต้านการทำงานของ protease แบบยาเดี่ยวและยาที่ใช้ร่วมกัน	44
1.15 การทดสอบเพื่อประเมินผลของยาในพลาสมาของคนปกติและพลาสมาของผู้ป่วยเอชไอวีที่ได้รับยา	46
2.1 การผลิตเอนไซม์ integrase และการทำให้บริสุทธิ์	48
2.2 การเตรียม avidin-coated PCR tube	49
2.3 การตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค PCR	50
2.4 การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real-time PCR	51
2.5 การทดสอบฤทธิ์ของยาในการต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real time -PCR	52
ข้อวิจารณ์	54
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	60
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	60
ประโยชน์ที่ได้รับ	62
แนวทางในการประยุกต์ใช้ผลงานวิจัยเพื่อต่อยอด	62
แนวทางการพัฒนาและการใช้ประโยชน์จากโครงการวิจัย พัฒนา และวิศวกรรม	62
เอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก	68

สารบัญตาราง

ตารางที่

	หน้า
1 ความเข้มข้นของยาต้านการทำงานของ PR ที่ใช้ในการทดลอง	24
2 ผลการทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของ IC strip กับวิธีมาตรฐาน HPLC	43
3 การเปรียบเทียบผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบกับวิธีมาตรฐาน HPLC	47

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	หลักการของ immunochromatographic (IC) strip test สำหรับการตรวจหา HIV-PRH ₆ activity	19
2	การตรวจหา integrase activity โดยระบบ real time-PCR	26
3	การสร้างโปรตีน HIV-PRH ₆ ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3)	29
4	ตรวจสอบโปรตีน H ₆ MA-CA ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ ในเจล SDS-PAGE ด้วยการย้อมด้วยสี page blue protein staining	30
5	ผลการทดสอบ activity ของ HIV-PRH ₆ ในการตัดโปรตีน H ₆ MA-CA ด้วยเทคนิค ELIB-PA	31
6	ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti-MA mAb HB-8975 ที่จะนำไปใช้ในการติดฉลากกับ colloidal gold	32
7	ทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก anti-MA mAb ด้วย colloidal gold	33
8	แสดงระบบการทดสอบการทำงานของ HIV-PRH ₆ โดยระบบ sandwich dot blot	34
9	การทดสอบการทำงานของ HIV-PRH ₆ โดย immunochromatographic strip test	35
10	sensitivity ของ immunochromatographic strip test	36
11	ทดสอบประสิทธิภาพของ immunochromatographic strip test ด้วยยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ได้แก่ ยา LPV, RTV, ATV และ IDV ที่ได้รับมาจากองค์กรเภสัชกรรม	38
12	การทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip ที่ผลิตได้	40
13	การประเมินประสิทธิภาพของ IC strip ในการตรวจระดับยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ในพลาสมา	42
14	การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการทำงานของ HIV-PRH ₆	44
15	ผลการทดสอบระดับยาต้านการทำงานของ protease แบบยาเดี่ยวและยาที่ใช้ร่วมกัน	45
16	การทำ SDS PAGE ของเอนไซม์ integrase ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์	48
17	ผลการทดสอบ EISA ของเอนไซม์ integrase ที่ติดตามด้วย anti-His monoclonal antibody และ anti-HIV 1 integrase monoclonal antibody	49
18	ผลการทดสอบการเคลือบหลอด PCR ด้วย avidin โดยการติดตามด้วย Biotin-HRP	50
19	การตรวจหา activity ของเอนไซม์ integrase ด้วยเทคนิค PCR	51
20	การตรวจหา integrase activity โดยระบบ real time PCR	52
21	การตรวจหา integrase activity และฤทธิ์ของสารที่ต้านการทำงานของ integrase โดยระบบ real time- PCR	53

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

HIV-1	Human deficiency virus-1
PR	Protease
IN	Integrase
LPV	Lopinavir
IDV	Indinavir
RTV	Ritonavir
ATV	Atazanavir
RAL	Raltigavir
ELIB-PA	ELIS-based HIV-PR activity assay
PI	Protease inhibitor
IC strip test	Immunochromatography strip test
MEC	Minimum effective concentration
HPLC	High performance liquid chromatography

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเอดส์นั้นบ่งชี้ว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญตั้งแต่ระดับครอบครัว ชุมชน สังคม ทั้งในระดับประเทศ และระดับโลก โดยไวรัสเอชไอวีจะเข้าไปทำลายเม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) หรือเม็ดเลือดขาว ซีดี4 ทำให้มีจำนวนลดลงไปเรื่อยๆ ซึ่งจะส่งผลต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ลดน้อยลง จนไม่สามารถที่จะปกป้องร่างกายจากการติดเชื้อได้ จึงทำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่าย ไม่ว่าจะเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาส หรือโรคอุบัติใหม่ เกิดภาวะแทรกซ้อน และถึงแก่ชีวิตในที่สุด ปัจจุบันถึงแม้ว่าจะมียาต้านไวรัสใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยสามารถลดจำนวนไวรัสและช่วยรักษาระดับของเซลล์ CD4+ lymphocyte ไม่ให้ลดลงในกระแสเลือดได้ ซึ่งยืดอายุผู้ติดเชื้อให้มีชีวิตที่ยืนยาวได้ โดยปกติจะต้องใช้สูตรยาต้านเชื้อไวรัสเอชไอวีประกอบไปด้วยอย่างน้อย 3 ชนิด เพื่อให้เกิดผลในการรักษาที่ดี ผู้ติดเชื้อต้องกินยาตรงเวลาและสม่ำเสมอทุกวัน มิฉะนั้นจะเกิดปัญหาเรื่องไวรัสดื้อยา หากเกิดการดื้อยาแล้ว ผู้ป่วยจะต้องเปลี่ยนไปใช้ยาชนิดอื่นๆ ที่ให้ผลการรักษาเท่าเทียมกันหรือดีกว่า แต่จะมีค่าใช้จ่ายที่เพิ่มสูงกว่ากันมาก และยังมีอาการอื่นไม่พึงประสงค์ หรือผลข้างเคียงจากยาชนิดใหม่ได้ การเปลี่ยนยาชนิดใหม่ๆ ยังทำให้ต้นทุนในการรักษาเพิ่มขึ้น เป็นการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศมากขึ้นเพราะยาส่วนใหญ่ถูกจดลิขสิทธิ์ในต่างประเทศ

ในการศึกษาวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนาชุดตรวจอย่างง่ายในการตรวจหาปริมาณยาในกระแสเลือดแบบ biological assay เพื่อติดตามความสม่ำเสมอในการรับประทานยา (drug adherence) ว่าระดับยาอยู่ในระดับรักษาหรือไม่ ซึ่งชุดตรวจนี้จะเป็นการตรวจโดยอาศัย enzymatic activity ของเอนไซม์ integrase และ protease ซึ่งมีความใหม่ของเทคโนโลยีที่ต่างไปจากเดิม โดยวิธีเดิมเป็นเพียงแค่การวัดหาปริมาณทางเคมีเท่านั้น ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าปริมาณยาที่มีมากน้อยอยู่่นั้นมีประสิทธิภาพในการต้านไวรัสแค่ไหน แต่ชุดตรวจที่จะพัฒนาขึ้นนี้จะทราบถึง biological activity ของตัวยา และมีความสามารถในการตรวจที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง รวมถึงไม่จำเป็นต้องใช้สารรังสีตามที่เคยที่ใช้กันในอดีต ทำให้ลดปัญหาเรื่องการจัดขยะรังสีซึ่งมีอันตรายต่อคนและสิ่งแวดล้อม ซึ่งองค์ความรู้นี้จะนำไปสู่การค้นพบยาใหม่ที่ถูกคิดค้นโดยคนไทย รวมไปถึงอาจจะสามารถลดการนำเข้าของยาใหม่ และจะนำไปสู่การลดอัตราการเกิดโรคอุบัติใหม่ได้ในอนาคต นอกจากนี้ในการพัฒนาเทคนิคนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับโรคติดเชื้ออื่นๆ

การทบทวนวรรณกรรม

เชื้อ HIV-1 จัดอยู่ใน family *Retroviridae* และ subfamily *lentivirinae* หลังจากที่เชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ เอ็นไซม์ reverse transcriptase จะสังเคราะห์สาย double-stranded DNA (ds-DNA) และขั้นตอนหนึ่งในวงจรชีวิตของเชื้อ HIV-1 หนึ่งที่สำคัญคือ กระบวนการเชื่อมสาย ds-DNA ของเชื้อ HIV-1 เข้ากับโครโมโซมของมนุษย์ โดยที่ปลายดีเอ็นเอสายคู่ของเอชไอวีจะถูกตัดออกไป 2 เบส (TG) เรียกว่า กระบวนการตัดปลายสามไพร่ เพื่อเป็นการเตรียมดีเอ็นเอก่อนการเชื่อม ลำดับต่อมาโมเลกุลของเอนไซม์ integrase และดีเอ็นเอของเชื้อ HIV-1 จะเข้าไปยังนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้านและจะเกิดการเชื่อมเอชไอวีดีเอ็นเอเข้ากับโครโมโซมของมนุษย์ [1, 2] เพื่อผลิตไวรัสลูกหลาน ไวรัสที่ถูกสร้างออกมาใหม่จะถูกเอนไซม์ protease (PR) ทำการตัดโปรตีนโครงสร้าง Gag และ GagPol precursor proteins เพื่อพัฒนาให้เป็นไวรัสตัวเต็มวัย (mature virion) [3] ดังนั้นการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ IN และ PR จัดเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการลดการสร้างไวรัสตัวใหม่ และสามารถช่วยรักษาผู้ติดเชื้อได้

ปัจจุบันการรักษาโรคเอดส์จะใช้สูตรยาต้านไวรัสมาตรฐาน highly active antiretroviral therapy (HAART) [4, 5] และประเทศไทยยังได้บรรจุการรักษาผู้ป่วยโรคนี้ในโครงการประกันสุขภาพแห่งชาติ ส่งผลให้ผู้ป่วยได้เข้าถึงยาต้านเชื้อไวรัสที่มากขึ้น ทำให้ลดอุบัติการณ์เกิดผู้ติดเชื้อเอชไอวีรายใหม่ให้ลดลงกว่าในอดีตได้ โดยยาสามารถลดปริมาณไวรัสในกระแสเลือด และเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดขาวซีดี4 ได้ ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และทำให้ผู้ติดเชื้อมีชีวิตที่ยืนยาว [6, 7] อย่างไรก็ตามการรักษาจะให้ประสิทธิภาพดีนั้นยังขึ้นกับระดับยาในกระแสเลือดด้วย หากผู้ติดเชื้อเข้าถึงยาตลอดหรือทานยาไม่สม่ำเสมอ จะมีโอกาสทำให้เชื้อดื้อยาได้ ผลกระทบที่สำคัญคือทำให้ต้องมีการพัฒนายาใหม่ขึ้นเพื่อการยับยั้งเชื้อดื้อยาเหล่านั้น ทำให้มีต้นทุนการรักษาที่สูงขึ้น และสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ ยาต้านไวรัสกลุ่ม protease inhibitor และ integrase inhibitor เป็นยาใหม่ทางเลือกหนึ่งซึ่งมีราคาแพงและเริ่มมีการใช้ที่มากขึ้น [8] อย่างไรก็ตามก็มีรายงานของไวรัสดื้อยาแล้ว [9, 10]

การวัดระดับยาในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อในระบบประจำวันสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เทคนิคนี้ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงและผู้ชำนาญและเชี่ยวชาญในการตรวจ โดยที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยเองได้พัฒนาวิธีที่ง่ายที่สะดวก รวดเร็ว ต้นทุนต่ำแต่ยังคงซึ่งมีความไวและความจำเพาะต่อการทดสอบ โดยใช้เทคนิค competitive immunochromatographic (IC) strip test ในการตรวจประเมินหายาด้านไวรัส Nevirapine (NVP) ในผู้ป่วยที่ได้รับยา พบว่าชุดตรวจอย่างง่ายให้ผลที่ชัดเจนในการตรวจติดตามดูปริมาณยาในซีรัมของผู้ป่วยได้ ซึ่งสามารถใช้ได้สะดวกกว่าวิธีมาตรฐาน HPLC [11, 12]

นอกจากการรักษาผู้ติดเชื้อด้วยยาต้านไวรัสแล้ว วัคซีนได้ถูกวิจัยเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคเอดส์ในอนาคต เมื่อหลายปีที่ผ่านมารัฐบาลไทยมีความร่วมมือกับต่างประเทศในการทดสอบและพัฒนาวัคซีน ผลพบว่าการวิจัยในการใช้วัคซีนเอดส์ทดลองยังไม่ค่อยได้ผลดีในระดับที่น่าพอใจนัก [13] จึงมีการมองหาแนวทางการรักษาโรคเอดส์แบบทางเลือกอื่น เช่น ยีนบำบัดโดยอาศัยโมเลกุลของโปรตีนอื่นในการยับยั้งในระยะต่างๆ ในวงจร

ชีวิตของไวรัส เช่น ซิงค์ฟิงเกอร์โปรตีน [14] หรือ แองไครน [15] โดยโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ยังอยู่ในระดับของการศึกษาวิจัยและยังไม่สามารถนำมาใช้รักษาได้จริงในปัจจุบัน ซึ่งต้องรอการวิจัยที่มากขึ้นและทำทดสอบความปลอดภัยต่อไป อย่างไรก็ตาม สมุนไพรในประเทศไทยมีมากมาย อาจเหมาะสมที่จะมีคุณสมบัติและมีฤทธิ์เป็นยาต้านไวรัส ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ สุภิญญา และคณะ [16] ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ HIV-1 PR ด้วยสารสกัดของพืชในตระกูล *Caesalpinaceae* และ *Papilionaceae* โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากแก่นแสมสาร มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ protease ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ สารสกัดด้วยเอทานอลจากแก่นแสมสาร (*Cassia garrettiana*) และสารสกัดด้วยเอทานอลจากแก่นฝาง (*Caesalpinia sappan*) [17] นอกจากนี้ มีการศึกษาของ hydroxy panduratin A (3) และ panduratin A (2) เป็นสารสกัดที่ได้มาจากกระชาย (*Boesenbergia pandurata* Holtt.) มีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ของ protease ได้เช่นกัน [16] รวมถึง curcumin ก็มีรายงานฤทธิ์ในการต้าน integrase เช่นกัน [18] อย่างไรก็ตามการพัฒนาสมุนไพรยังติดปัญหาเรื่องความสามารถในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในปริมาณมาก (high-throughput screening system) เนื่องจากขาดชุดทดสอบฤทธิ์การต้านไวรัสที่ดีและไม่ยุ่งยาก ดังนั้นหากมีชุดทดสอบ bioactivity ที่ดีก็จะส่งผลถึงประสิทธิภาพในการคัดสรรตัวยาและการพัฒนาสมุนไพรจะสามารถทำได้รวดเร็วเช่นกัน

ในอดีตการวัด enzymatic activity ของ HIV-1 protease ทำได้โดยเทคโนโลยีขั้นสูง fluorescence resonance energy transfer (FRET) ซึ่งถูกนำมาประยุกต์ใช้เช่นกันในการตรวจติดตามการทำงานของเอนไซม์ protease การคัดเลือกยาต้านไวรัสกลุ่ม PI และตรวจหา drug resistance strain [19] ในปีที่ผ่านมาคณะผู้วิจัยเองได้พัฒนาเทคนิคการตรวจ enzymatic activity ของ HIV-1 protease อย่างง่ายที่เรียกว่า ELIS-based HIV-PR activity assay (ELIB-PA) ซึ่งอาศัยหลักการการทำงานของ HIV-1 protease ในการตัดโปรตีนตั้งต้น (protease substrate) คือ His₆ Matrix-Capsid (H₆MA-CA) แล้วตรวจติดตามการทำงานในการตัดอย่างจำเพาะของ protease ด้วยการใช้โมโนโคลนอลที่จำเพาะกับ CA domain และ C-terminal domain ของ MA วิธีนี้เคยได้ทดสอบกับ PI หลายชนิดแล้ว และให้ผลทดสอบที่เห็นได้ค่อนข้างชัดเจน [20] อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังต้องการเครื่องมือในการอ่านผลคือ ELISA reader ซึ่งมีใช้และทำได้ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น หากมีการพัฒนาวิธีการตรวจให้ง่ายและสะดวกต่อผู้ใช้งานให้สามารถนำไปตรวจได้เองและสามารถอ่านผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ก็จะสามารถทำให้การคัดสรรยาหรือสมุนไพรตัวใหม่เป็นไปได้เร็วขึ้น

ในส่วนของการหา integrase activity มีรายงานว่ามีการวัด 3' processing และ stand transfer activities ในหลอดทดลอง [21] โดยวิธีที่ใช้มายาวนานนั้น เป็นวิธีที่ทำได้ยากและช้า (low-throughput) คือวิธี gel-based โดยใช้การติดฉลากสารรังสีกับดีเอ็นเอ (radioisotope-labelled oligonucleotides) วิธีการตรวจหาเหล่านี้ถึงแม้ว่าจะใช้กันปกติแต่ก็เป็นวิธีที่ทำได้ยาก ใช้เวลาในการทำงานและสารรังสีที่ใช้นั้นยังเป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดหา enzymatic activity ของ integrase ด้วยหลักการและวิธีต่างๆ [22-25] รวมถึงเร็วๆนี้ มีรายงานในการพัฒนาวิธีการตรวจ HIV-1 integrase 3'-processing activity ซึ่งติดตามโดยใช้สารเรืองแสง (time-resolved fluorescence) [26] อย่างไรก็ตามวิธีใหม่

นี้ยังมีความจำเป็นที่จะต้องใช้สารเรืองแสง รวมถึงสารรังสี γ -[32 P]-ATP และเครื่องอ่านปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะ และราคาแพงและไม่สะดวกต่อการใช้งาน ดังนั้นหากมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดหา integrase activity ที่ไม่ต้องใช้สารรังสีและอุปกรณ์การตรวจวัดที่หายากราคาแพงก็จะยังประโยชน์ต่อการคัดสรรหาตัวยาด้าน integrase ตัวใหม่ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปัญหาในการทดสอบทาง bioactivity ยังคงเป็นเรื่องยากจากประสบการณ์ของคณะผู้วิจัยเอง เพราะต้องใช้งบประมาณของค่าใช้จ่ายในห้องปฏิบัติการที่สูง ทำให้ยากและต้องใช้นักวิจัยที่มีความชำนาญในการเพาะเลี้ยงไวรัสเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของยาในการยับยั้งไวรัส ซึ่งต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐานความปลอดภัยสูง ในอดีตการทดสอบฤทธิ์ยาในการยับยั้งการติดเชื้อและการเพิ่มจำนวนเชื้อ รวมถึงการวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัยเองในการแย่งจับ MA-CA ด้วยโมเลกุลของ Ankyrin และไปดบังการทำงานของเอนไซม์ protease ก็ใช้วิธีการวัดหา p24 Ag ที่อยู่ใน culture supernatant เพื่อดูฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสลูกหลาน [15] ในขณะที่การทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ integrase จะดูการยับยั้งการฝังตัวของเอชไอวีตีเอ็นเอในโครโมโซมมนุษย์โดยวิธี *Alu-gag* qPCR [14, 27] ซึ่งวิธีการดังกล่าวเหล่านี้ทำให้การตอบโต้การทำงานทางด้านการตรวจหาฤทธิ์ของสมุนไพรในปริมาณมากหรือสมุนไพรเป็นไปได้อย่างยากและไม่คล่องตัว ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหา enzymatic activity แบบที่รวดเร็วและทำได้ง่าย (high throughput) สำหรับ integrase และ protease จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจกรอง (screening assay) ในการหาปริมาณยาในกระแสเลือด ยังโอกาสให้การเข้าถึงยาได้ดีขึ้นและลดการเกิดเชื้อดื้อยา อีกทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดสรรตัวยาลูกจากสารสกัดสมุนไพรตัวใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 integrase และ protease

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อสร้างชุดตรวจสอบคุณภาพของยาด้านไวรัสในกลุ่ม protease และ integrase inhibitor แบบ *in vitro* biological activities ซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อน ในรูปแบบ high throughput assay
2. เพื่อพัฒนาชุดตรวจพยากรณ์ระดับยา protease inhibitor ชนิดต่างๆ ในกระแสเลือดด้วยหลักการ immunochromatography ที่เข้าถึงได้ง่าย และไม่ต้องเปลี่ยนชุดตรวจเมื่อเปลี่ยนตัวยาล
3. เพื่อพัฒนาชุดตรวจหา integrase activity แบบใหม่ที่ทำได้ง่าย ด้วยระบบ real time-PCR
4. เพื่อประเมินความถูกต้อง (ความไว, ความจำเพาะเจาะจง, และค่าพยากรณ์ผลบวก/ผลลบ) ของชุดตรวจหา protease activity และ integrase activity ในการหาระดับยา protease และ integrase inhibitor ในตัวอย่างพลาสมาของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยา
5. เพื่อนำชุดตรวจหา protease activity และ integrase activity อย่างง่ายในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองหายา หรือสมุนไพรตัวใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 protease และ integrase ที่เหมาะกับ viral strains ต่างๆของผู้ติดเชื้อ

เครื่องมือและอุปกรณ์

Agilent 1260 Infinity HPLC system with binary pump with ChemStation software ÄKTAprime™ plus system	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ
Amicon Ultra centrifugal filter units	Millipore, Cork, Ireland
A-Point Programmable Guillotine Cutter	A-Point Technologies Inc., NJ, USA
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
CFX96 Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Laminar Flow Biological Safety	NUAIRE, Plymouth, MN, USA Cabinet
Gel documentation	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MRX-150 Refrigerated microcentrifuge	Tomy Tech USA Inc., CA, USA
MTP-120 microplate reader	Biodirect, MA, USA
Precision Laminator	Zeta Corporation, Korea
Shaking incubator	JS Research Inc., Gongju-city, Korea
Ultrasoni	Hielscher, Ultrasound Technology, NJ, USA
UV spectrophotometer	Shimadzu, Columbia, MD, USA

สารเคมี

Agarose (electrophoresis grade)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti His ₆ tag antibody	ABM Inc., Richmond, BC, Canada
BCML (N,N-bis(carboxymethyl) lysine hydrate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BCA protein assay	Pierce, Rockford, IL, USA
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNase/RNase-free water	Amresco, OH, USA
Fetal bovine serum	HyClone™, Cramlington, UK
Glycerol	Merck, Darmstadt, Germany
Goat anti-mouse Igs	KPL, MD, USA
Grace's insect medium	Gibco BRL, Gaithersburg, MD
HAuCl ₄ ·3H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)	Gibco BRL, Gaithersburg, MD
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)	Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Germany
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Germany
NaCl	Merck, Darmstadt, Germany
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Germany
Nitrocellulose membrane	Schleicher and Schuell, Germany
Potassium carbonate (K ₂ CO ₃)	Univar, New South Wales, Australia
Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane	GE Healthcare, Germany
Probe	TIB Molbiol, Berlin, Germany
Sodium citrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodium borate	Merck, Darmstadt, Germany
Serum-free hybridoma medium	Gibco BRL, Gaithersburg, MD
Trypton	Merck, Darmstadt, Germany

สารเคมี

TMB membrane peroxidase substrate	KPL, MD, USA
THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	Toyobo, Japan
Yeast extract	Merck, Darmstadt, Germany
3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB) membrane peroxidase substrate	KPL, MD, USA
5' Prime Master Mix (2.5X)	5' Prime, Gaithersburg, MD, USA

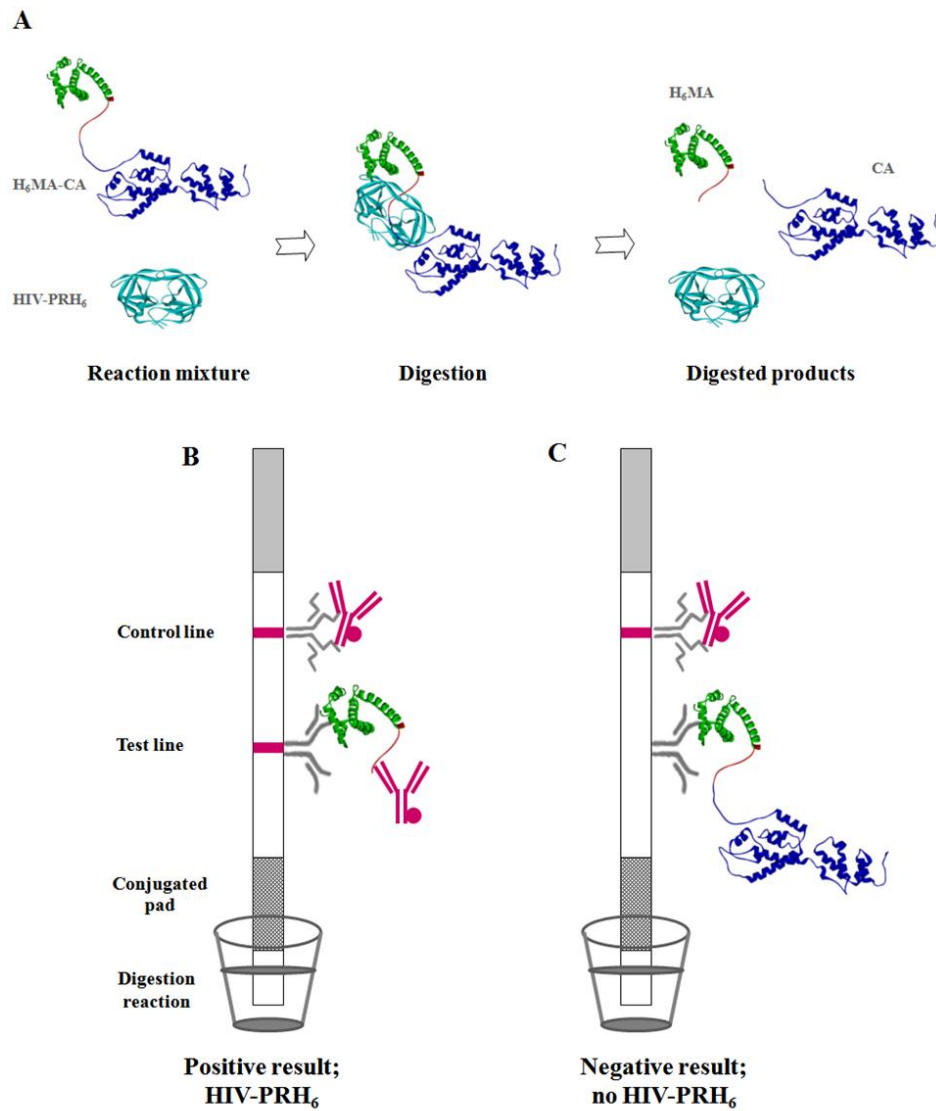
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 โดยเทคนิค immunochromatographic (IC) strip test

หลักการ

วิธีทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 (HIV-PR) ได้ถูกพัฒนาขึ้นในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (20) โดยทำการสร้างวิธีทดสอบการทำงานของ HIV-PR อย่างง่าย โดยใช้โมเลกุลตั้งต้นที่จำเพาะคือ โปรตีนแมทริก (MA) และแคปสิด (CA) ของเชื้อเอชไอวีที่เชื่อมกับกรดอะมิโนฮิสติดีน (H_6MA-CA) โดย H_6MA-CA เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนส่วนหนึ่งของ gag protein ของเชื้อเอชไอวี ซึ่งทางผู้วิจัยได้ทำสร้างระบบการผลิตโปรตีนในเซลล์แมลง โดยโปรตีนดังกล่าวมีตำแหน่งจำเพาะที่ HIV-PR สามารถตัดได้ และการใช้ HIV-PR H_6 ที่ผลิตได้จากระบบแบคทีเรีย เป็นตัวแทนของ HIV-PR ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งการตรวจติดตามผลการตัดของ HIV-PR H_6 กับ H_6MA-CA จะใช้แอนติบอดี anti-MA mAb HB-8975 โดยวิธีนี้อาศัยหลักการทดสอบแบบอิลูซาจึงเรียกว่า ELIS based HIV-PR activity assay หรือ ELIB-PA ซึ่งวิธีการนี้ นำมาสู่การพัฒนาเป็นชุดตรวจที่ใช้หลักการ immunochromatography strip test ที่เข้าถึงได้ง่าย สะดวก และไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังไม่ต้องเปลี่ยนชุดตรวจเมื่อเปลี่ยนตัวอย่างทดสอบด้วย

หลักการของเทคนิคนี้ คือ antigen-antibody complex ของ anti-MA mAb HB-8975 ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคของ colloidal gold มีสีม่วงแดง กับ H_6MA-CA ที่ถูกตัดด้วย HIV-PR โดย anti-MA mAb HB-8975 นั้น มีคุณสมบัติจับได้อย่างจำเพาะกับกรดอะมิโนด้านปลายคาร์บอกซีของโปรตีน MA ซึ่งจะเผยออกมาเมื่อถูกตัดด้วย HIV-PR H_6 เท่านั้น เมื่อ antigen-antibody complex ดังกล่าวเคลื่อนที่ไปจับกับ anti-MA mAb G53 บน test line เกิดการจับกันแบบ sandwich antibody ผลการทดสอบจะเกิดแถบสีม่วงแดงเกิดขึ้นบริเวณ test line ในทางตรงกันข้ามหาก H_6MA-CA ไม่ถูกตัดด้วย HIV-PR H_6 จะไม่เกิดแถบสีม่วงแดงบนบริเวณ test line เนื่องจากไม่มีการจับกันแบบ sandwich complex ซึ่งหลักการของ immunochromatographic (IC) strip test แสดงดังรูปที่ 1 นอกจากนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบด้วยมาตรฐานการทำงานของ HIV-PR H_6 ด้วย HIV protease inhibitor (PI) โดยทำการ incubate ร่วมกับ HIV-PR H_6 และ H_6MA-CA ก่อนจะนำ IC strip ไปจุ่มทดสอบ



รูปที่ 1 หลักการของ immunochromatographic (IC) strip test สำหรับการตรวจหา HIV-PRH₆ activity เมื่อเติม H₆MA-CA ร่วมกับ HIV-PRH₆ จะสังเกตเห็นเส้นสีม่วงแดงที่ test lines และ control lines (ผลการทดสอบเป็นบวก, B) แต่ถ้าในระบบมีเพียง H₆MA-CA จะสังเกตเห็นเส้นสีม่วงแดงที่ control lines เท่านั้น (ผลการทดสอบเป็นลบ, C)

1.1 การเตรียมเอนไซม์ protease (HIV-PRH₆) ในระบบแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ทำการสร้างยีนที่กำหนดการสร้าง HIV-PRH₆ ได้มีการอธิบายโดย กิตติและคณะ (20) โดยการสร้างยีนที่กำหนดการสร้าง HIV-PRH₆ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ pET14bELP105Knew/Tat vector ด้วย specific primer ได้แก่ HIV-PR NheI และ HIV-PR HindIII Rev ซึ่ง reverse primer นั้นได้ถูกออกแบบให้เพิ่มยีนที่กำหนดการสร้าง Histidine จำนวน 6 กรดอะมิโน เพื่อใช้ในการตรวจติดตาม จากนั้นทำตัดชิ้นส่วนยีน HIV-PR และเวกเตอร์ pET21a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำไปเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase จากนั้นนำ ligation product ที่ได้เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ XL-1 Blue แล้วทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่รับเวกเตอร์โดยการเลี้ยงบน LB agar ที่เติมยา ampicillin ทำการสกัดพลาสมิด pET21-HIV-PRH₆ จากแบคทีเรียโดยใช้ Plasmid miniprep kit แล้วนำไปทำ DNA sequencing เพื่อตรวจสอบลำดับของ DNA ที่ถูกต้องเมื่อได้โคลนที่มีลำดับที่ถูกต้อง แล้วนำพลาสมิดที่ได้เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ BL21 (DE3) จากนั้นทำการสร้างโปรตีน HIV-PRH₆ ภายในไซโทพลาสซึมของแบคทีเรียสายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีเวกเตอร์ pET21- HIV-PR-His₆ แล้วกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย 0.1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียเพื่อแตกเซลล์แล้วเก็บส่วนไซ (cell lysate) จากนั้นตรวจการสร้าง HIV-PRH₆ ด้วยเทคนิค western immunoblotting และทำการตรวจติดตามการแสดงออกของโปรตีนที่ผลิตโดยใช้ anti-His mAb

1.2 การเตรียม HIV-1 protease substrate (H₆MA-CA)

ทำการเตรียมโปรตีนสารตั้งต้น H₆MA-CA ในระบบการสร้างโปรตีนในเซลล์ Sf9 ได้มีการอธิบายโดย กิตติและคณะ [28] โดยทำให้การ transduction recombinant baculovirus ที่มียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน H₆MA-CA เข้าสู่เซลล์แมลง Sf9 หลังจากนั้นทำการเก็บ Sf9 ที่ติดเชื้อ นำมาทดสอบการสร้างโปรตีนด้วย western immunoblotting และทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap column (GE healthcare) แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE โดยย้อม page blue protein staining จากนั้นทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นโดยใช้ Centricon (30 kDa, Millipore) และวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย BCA protein assay kit

1.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) โคลน G53 ที่จับได้อย่างจำเพาะต่อโปรตีนแมทริก (MA) และแคปสิด (CA) ของเชื้อเอชไอวีทั้งรูปของ H₆MA-CA และ H₆MA และ anti-MA mAb โคลน HB-8975 ที่จับได้อย่างจำเพาะกับกรดอะมิโนด้านปลายคาร์บอกซีของโปรตีน MA ซึ่งจะเผยออกมาเมื่อถูกตัดด้วย HIV-PRH₆ เท่านั้น เพื่อนำไปตรวจติดตามความสามารถในการตัดของ HIV-PR ต่อโปรตีนสารตั้งต้น H₆MA-CA ในระบบการพัฒนาโดยเทคนิค immunochromatographic (IC) strip test ได้มีการอธิบายโดย กิตติและคณะ (20,29)

ทำการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) โคลน G53 ที่จับได้อย่างจำเพาะต่อโปรตีนแมทริก (MA) และแคปสิด (CA) ของเชื้อเอชไอวีทั้งรูปของ H₆MA-CA และ H₆MA โดยทางคณะผู้วิจัยได้สร้างด้วยวิธีมาตรฐาน

hybridoma technique สำหรับ anti-MA mAb โคลน HB-8975 ที่จับได้อย่างจำเพาะกับกรดอะมิโนด้านปลายคาร์บอกซีของโปรตีน MA ซึ่งจะเผยออกมาเมื่อถูกตัดด้วย HIV-PRH₆ เท่านั้น แอนติบอดีโคลนนี้ได้รับมาจาก American Type Culture Collection (ATCC)

ทำการเลี้ยง hybridomal cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ทำการ supplementation ด้วย serum เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ เพื่อไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiTrapTM protein G HP column จากนั้นทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA

1.4 การตรวจสอบ activity ของ HIV-1 protease โดยเทคนิค ELIS-based HIV-PR activity assay (ELIB-PA)

เติมโปรตีน H₆MA-CA ซึ่งผลิตโดยใช้ระบบ Baculovirus ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วใน Ni²⁺ coated-plate จากนั้น incubate ที่ 4 °C นาน 18 ชั่วโมง ทำการล้าง unbound protein ด้วย washing buffer 4 รอบ ที่ประกอบด้วย NaCl/Tris-HCl/urea ที่มี imidazole ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 4 ระดับ (จากนั้นล้าง washing buffer แล้วเติม HIV-PRH₆ ที่มีการเติมและไม่เติมยาต้านการทำงานของเอนไซม์ คือ lopinavir (LPV) จากนั้น incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย high-stringency washing buffer จากนั้นเติม anti-MA G53 และ anti-MA mAb HB-8975 จากนั้นเติม HRP-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin antibody ที่เจือจางใน 0.5%BSA/TBS แล้ว incubate 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้างเพลทแล้วเติม TMB substrate ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 1 N HCl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD450 โดยใช้เครื่อง microplate reader (20)

1.5 หาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำไปติดฉลากกับ colloidal gold

นำแอนติบอดี ได้แก่ anti-MA mAb HB-8975 มาเจือจางเพื่อทำไตเตรตหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการ conjugate กับ colloidal gold ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ anti-MA mAb โดยจะได้ค่าปริมาณของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการติดฉลากกับ colloidal gold จากนั้นทำการ conjugate แอนติบอดีตามที่ได้หาความเหมาะสมกับ colloidal gold ในปริมาณมากเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

1.6 การทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก anti-MA mAb ด้วย colloidal gold และประสิทธิภาพในการจับของแอนติบอดี

ทำการทดสอบการติดฉลากของ anti-MA mAb กับ colloidal gold โดยทำ incubate โปรตีนเป้าหมาย H₆MA-CA ร่วมกับเอนไซม์ protease แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นหยด (dot) ลง nitrocellulose membrane พร้อมกับหยด goat anti -mouse IgG และสารละลายบัฟเฟอร์ PBS เพื่อเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกและผลลบตามลำดับ ทำการ block ด้วย 5% BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ PBS จากนั้นเติม anti-MA mAb HB-8975-CGC ที่ต้องการทดสอบ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 สังเกตผลที่เกิดขึ้นทดสอบประสิทธิภาพในการ

จับของแอนติบอดี โดยหยด anti-MA mAb G53 ลง nitrocellulose membrane พร้อมกับหยด goat anti-mouse immunoglobulins และสารละลายบัฟเฟอร์ PBS เพื่อเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกและผลลบตามลำดับ ทำการ block ด้วย 5% BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ PBS แล้วเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆, ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆ และมียาต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ คือ LPV ลงไปในแต่ละช่องของเมมเบรน นาน 1 ชั่วโมง หลังจากล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ PBS แล้วเติม anti-MA mAb HB-8975-CGC ที่ต้องการทดสอบ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเมมเบรนสารละลายบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 สังเกตผลที่เกิดขึ้น

1.7 การทดสอบระบบการทำ immunochromatographic strip test โดยระบบ Pilot test

เมื่อระบบการทดสอบเบื้องต้นสำเร็จ จึงมาทำการพัฒนา immunochromatographic strip test โดยนำ anti-MA mAb HB-8975-CGC เจือจางในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วหยดลงบน conjugate pad แล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำมาประกอบเป็น strip โดยทำการหยดด้วย anti-MA mAb G53 ซึ่งเป็นตัวแทนของ test line และ anti-mouse IgS ที่บริเวณ control line แล้วทำการทดสอบ strip ที่เตรียมได้กับตัวอย่างต่างๆ ที่ต้องการทดสอบกับตัวอย่าง ได้แก่ ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆, ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆ และมียาต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ ได้แก่ LPV ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml

1.8 การทดสอบ IC strip แบบ pilot test เพื่อหา sensitivity โดยใช้ยา LPV ในทดสอบ

เมื่อการทดสอบ IC strip แบบ pilot test เบื้องต้นสำเร็จแล้ว จึงได้ทำการทดสอบเพื่อหา sensitivity โดยใช้ protease inhibitor ได้แก่ ยา LPV มาใช้ในทดสอบ นำ anti-MA mAb HB-8975-CGC เจือจางในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วหยดลงบน conjugate pad แล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำมาประกอบเป็น strip โดยทำการหยดด้วย anti-MA mAb G53 ซึ่งเป็นตัวแทนของ test line และ goat-anti-mouse IgS ที่บริเวณ control line แล้วทำการทดสอบ strip ที่เตรียมได้กับตัวอย่างต่างๆ ที่ต้องการทดสอบกับตัวอย่าง ได้แก่ ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆, ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆ และมี LPV ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในแต่ละชุดทดสอบตั้งแต่ 0.05 ng/ml-10,000 ng/ml สังเกตผลที่เกิดขึ้นโดยอ่านผลด้วยตาเปล่า หลังการจุ่ม strip ที่ 5 นาที

1.9 การทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip ด้วยยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip ด้วยยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease (Protease inhibitors, PIs) ได้แก่ lopinavir (LPV), ritonavir (RTV), atazanavir (ATV) และ indinavir (IDV) ที่ได้รับมาจากองค์กรเภสัชกรรม โดยนำ anti-MA mAb HB-8975-CGC เจือจางในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วหยดลงบน conjugate pad แล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำมาประกอบเป็น strip โดยทำการหยดด้วย anti-MA mAb G53 ซึ่งเป็นตัวแทนของ test line และ goat anti-mouse IgS ที่บริเวณ control line แล้วทำการทดสอบ strip ที่เตรียมได้กับตัวอย่างต่างๆ ที่ต้องการทดสอบกับตัวอย่าง ได้แก่ ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆, ชุด

ของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆ และมี LPV, RTV, ATV และ IDV ที่ความเข้มข้น 1,000, 100, 10 ng/ml สังเกตผลที่เกิดขึ้นโดยอ่านผลด้วยตาเปล่า หลังการจุ่ม strip ที่ 5 นาที

1.10 การประกอบและทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ IC strip แบบมาตรฐาน

นำ anti-MA mAb HB-8975-CGC เจือจางในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วพ่นลงบน conjugate pad แล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำมาประกอบเป็น strip โดยทำการพ่นด้วย anti-MA mAb (G53) ซึ่งเป็นบริเวณ test line และ goat anti-mouse IgS ที่บริเวณ control line จากนั้นนำไปอบที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วทำทดสอบ strip ที่เตรียมได้กับตัวอย่างต่างๆ สารละลายที่ต้องการทดสอบกับตัวอย่างหลายชุด ได้แก่ ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับเอนไซม์ HIV-PRH₆, ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับเอนไซม์ HIV-PRH₆ และมียาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ได้แก่ LPV, ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ BL21(DE3) lysate และชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ BL21(DE3) lysate และยา LPV สังเกตผลที่เกิดขึ้นโดยอ่านผลด้วยตาเปล่า หลังการจุ่ม strip ที่ 5 นาที

1.11 การประเมินประสิทธิภาพของ IC strip test ในการตรวจระดับยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ในพลาสมา

ทำการทดสอบหา detection limit และผลของพลาสมาในการตรวจระดับยาต้านการทำงานของ protease ของ IC strip test โดยทำการเติมยา LPV ที่ความเข้มข้นระหว่าง 100 ng/ml – 50,000 ng/ml ในพลาสมาคนปกติ จากนั้นนำพลาสมาที่มีการเติมยาดังกล่าวมา incubate ร่วมกับ H₆MA-CA และ HIV-PRH₆ และมีสารละลาย PBS และพลาสมาที่ไม่เติมยาเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ ทำการจุ่ม strip และสังเกตผลที่เกิดขึ้นอ่านผลด้วยตาเปล่าที่ 5 นาที

1.12 การเปรียบเทียบมาตรฐานระหว่างชุดทดสอบ protease activity strip กับวิธีมาตรฐาน

ทำการเตรียมชุดทดสอบที่มีการเติมยาต้านการทำงานของ protease 2 ชนิด ได้แก่ ยา LPV และ ATV ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 100, 1,000 และ 10,000 ng/ml โดยเติมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปในพลาสมาของคนปกติ จากนั้นทำการเตรียมพลาสมาที่มีการเติมยาเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 พลาสมาที่มีการเติมยาทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ มา incubate ร่วมกับ H₆MA-CA และ HIV-PRH₆ แล้วนำ IC strip มาจุ่มเพื่อดูประสิทธิภาพของชุด IC strip test และกลุ่มที่ 2 นำพลาสมาที่มีการเติมยามาทำการวัดระดับยาด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC

1.13 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพร

ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพร จำนวนทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ซึ่งสารสกัดเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Khalijah Awang จาก Department of Chemistry Faculty of Science University of Malaya ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ มาละลายในสารละลาย DMSO ซึ่งการทดสอบแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่มีการเติมสารสกัดสมุนไพร ในปฏิกิริยามีเฉพาะ H₆MA-CA และ HIV-PRH₆ ร่วมกัน กลุ่มที่ 2 จะเป็นชุดทดสอบที่มีการ incubate สารสกัดร่วมกับ H₆MA-CA และ HIV-PRH₆ โดยสาร

สกัดสมุนไพรแต่ละตัว จะใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mg/ml และจะมีกลุ่มที่ 3 คือปฏิกิริยาที่มีเฉพาะ H₆MA-CA และ HIV-PRH₆ ร่วมกัน DMSO ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ทำการจุ่ม strip และสังเกตผลที่เกิดขึ้น

1.14 การเปรียบเทียบผลของระดับยาต้านการทำงานของ protease แบบยาเดี่ยวและยาที่ใช้

ร่วมกัน

ทำการเปรียบเทียบผลของยาต้านการทำงานของ protease ได้แก่ LPV, RTV, และ LPV/RTV โดยการทดสอบแบ่งกลุ่มการทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ทดสอบกับยา RTV อย่างเดียวที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของยาต้านการทำงานของ PR ที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นของยาต้านการทำงานของ PR ที่ใช้ในการทดลอง (ng/ml)		
กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
RTV	LPV	LPV/RTV
50	100	100/50
150	1,000	1,000/150
300	4,000	4000/150
500	8,000	8,000/500
1,000	15,000	15,000/1,500
1,500		

จากนั้นนำพลาสมาที่มีการเติมยาดังกล่าวมา incubate ร่วมกับ H₆MA-CA และ HIV-PRH₆ และ และชุดของ incubate ร่วมกับ H₆MA-CA และ HIV-PRH₆ จากนั้นทำการจุ่ม strip และสังเกตผลที่เกิดขึ้น

1.15 ทดสอบเพื่อประเมินผลของยาในพลาสมาของคนปกติและพลาสมาของผู้ป่วยเอชไอวีที่

ได้รับยา

การทดสอบนี้จะเป็นการวิเคราะห์ย้อนหลังจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นพลาสมาที่ถูกส่งมาที่ห้องปฏิบัติการ PHPT pharmacology คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อติดตามผลการรักษาด้วยยาต้านไวรัส การศึกษานี้จะเลือกเฉพาะสิ่งส่งตรวจที่มียาในระดับที่ได้รับจากการตรวจด้วยวิธี HPLC เท่านั้น มาใช้ในการทดสอบด้วย IC strip

โดยจะแบ่งกลุ่มการทดสอบ ซึ่งการทดสอบจะแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

- ตัวอย่างที่ปกติ : ตัวอย่างพลาสมาจากคนปกติ
- ตัวอย่างที่ไม่มี PI : ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาแบบ HAART ที่ไม่ใช้ PI

- ตัวอย่างที่มี PI : ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยา PI ในการรักษาแบบ HAART

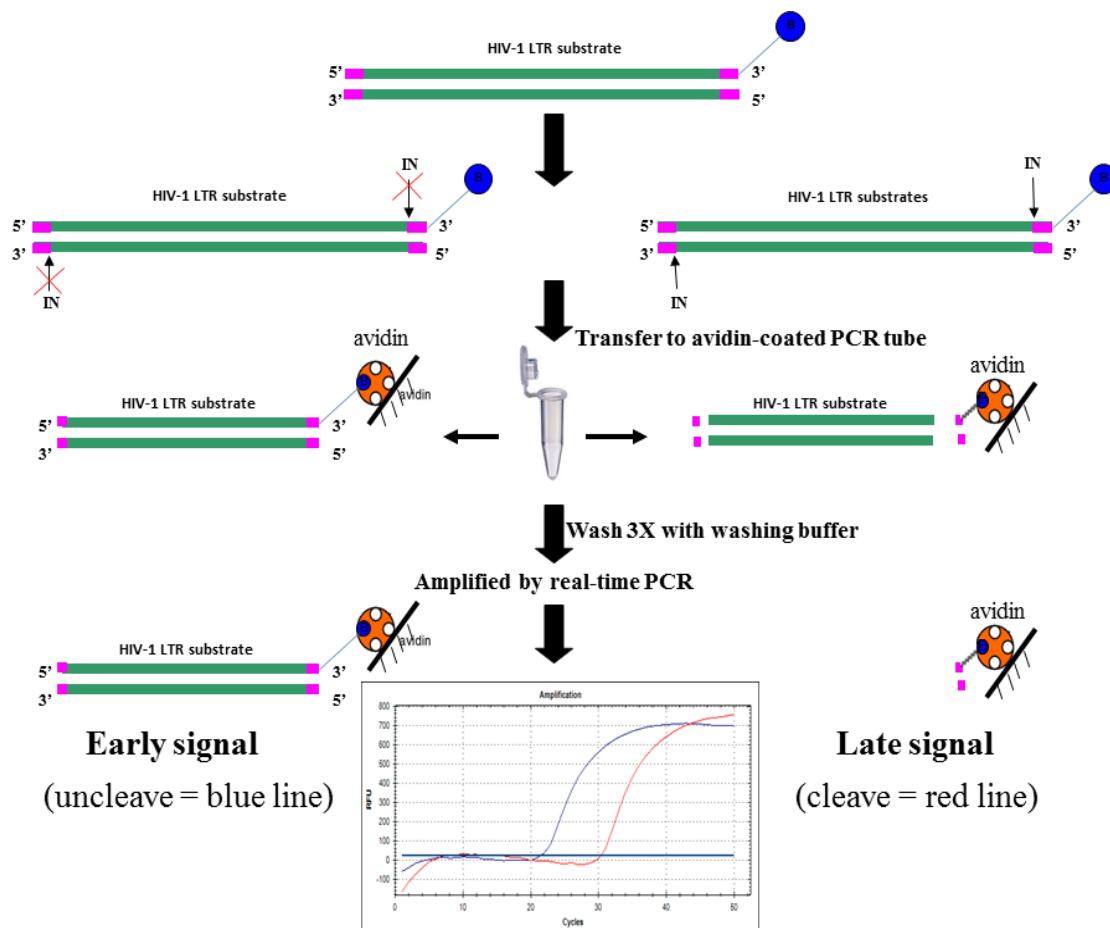
จำนวนตัวอย่าง: ตัวอย่างจำนวน 90 ราย (ตัวอย่างพลาสมาจากคนปกติ จำนวน 30 ราย ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา HAART ที่ไม่ใช้ PI จำนวน 30 ราย และตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยที่ได้รับยา PI จำนวน 30 ราย) โดยสิ่งส่งตรวจมีอยู่ในระดับที่ตรวจสอบได้โดยวิธี HPLC และมีข้อมูลการรักษาของคนไข้ แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูล: วิเคราะห์หาความไว, ความจำเพาะเจาะจง, ค่าพยากรณ์ผลบวกและลบ และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

จากนั้นนำพลาสมาในกลุ่มต่างๆ ดังกล่าว มา incubate ร่วมกับ H_6MA-CA และ HIV-PRH₆ และมีชุดควบคุมคือ ชุดที่มีการ incubate ยา LPV 1,000 ng/ml ร่วมกับ HIV-PRH₆ เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกและพลาสมาที่ไม่เติมยาเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ ทำการจุ่ม strip และสังเกตผลที่เกิดขึ้น

2. การตรวจหา activity ของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real-time PCR

หลักการ

การทดสอบฤทธิ์การต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real-time PCR ได้พัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบยาต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase (30) หลักการของการทดสอบนี้ คือ ทำการสังเคราะห์ biotinylated DNA substrate ขนาด 100 bp ซึ่งออกแบบให้ตำแหน่งบริเวณปลายทั้งสองด้านของ template DNA ถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ integrase โดยที่ปลาย 3' มีการติดด้วย biotin และเตรียม HIV integrase ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้จากระบบแบคทีเรียซึ่งเป็นตัวแทนของเอนไซม์ integrase ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี ในการทดสอบเพื่อตรวจหา activity ของเอนไซม์ integrase ในภาวะที่ไม่มีการทำงานของเอนไซม์ integrase หรือมียาต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase จะทำให้ DNA substrate จะยังคงมี biotin ติดอยู่เช่นเดิม เมื่อนำเอาส่วนผสมเติมลง avidin tube จะทำให้ biotin จับกับ avidin แล้วเมื่อนำไปทำ real time-PCR ด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะ จะสามารถวัดสัญญาณได้เร็ว แต่ถ้าในปฏิกิริยาเอนไซม์ integrase ทำงานได้หรือภาวะที่ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ integrase ได้ จะทำให้ DNA substrate ที่บริเวณปลาย 3' ที่มี biotin นั้นถูกตัดโดยเอนไซม์ integrase เหลือ biotinylated DNA ขนาดสั้นและเมื่อนำส่วนผสมทั้งหมดลงใน avidin tube ส่วนของ DNA ที่ไม่มี biotin ติดอยู่จะถูกล้างออกไป ส่วน DNA ขนาดสั้นที่มี biotin จะจับกับ avidin และเมื่อนำไปทำ real time-PCR ไพรเมอร์และโพรบจะไม่สามารถจับได้จึงทำให้สัญญาณเกิดขึ้นได้ช้า ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ 2 การตรวจหา integrase activity โดยระบบ real time PCR จากภาพเส้นกราฟที่เส้นสีแดงแสดงถึงภาวะที่มีเอนไซม์ integrase ทำงาน และในขณะที่เส้นกราฟเส้นน้ำเงินแสดงถึงภาวะที่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ integrase

2.1 การผลิตเอนไซม์ integrase และการทำให้บริสุทธิ์

นำพลาสมิด pINSD.His.sol ที่มีกำหนดมียีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ HIV integrase (ซึ่งพลาสมิดได้รับความอนุเคราะห์จาก NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, USA) เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อผลิต HIV-1 integrase จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ super broth ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ug/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 rpm จากนั้นทำการกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ integrase ด้วย isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียแล้วแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วเก็บเซลล์แบคทีเรียไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสแล้วละลายแล้วจึงใส่ lysis buffer ทำการ incubate ที่ 4 °C นาน 30 นาที จากนั้นแตกเซลล์โดยใช้เครื่อง sonicator จากนั้นนำไปปั่นเพื่อเก็บส่วนใสที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 30 นาที จากนั้นเก็บส่วน

ใส่ที่มีเอนไซม์ integrase มากรองด้วยตัวกรองที่ 0.25 μM แล้วนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยผ่าน HisTrap column และทำการชะโปรตีนออกด้วย imidazole แล้วทำการ dialysis ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และการแสดงออกของเอนไซม์ integrase ที่เตรียมทำได้โดยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ ELISA ทำการติดตามการแสดงออกของ integrase ด้วยการใช anti-his monoclonal antibody และ anti-HIV-1 integrase monoclonal antibody

2.2 การเตรียม HIV- DNA substrate

ทำการเตรียม Double-stranded DNA ที่มีลำดับเบส HIV-1U5 sequence ขนาด 100 bp เพื่อนำมาใช้ในเป็น substrate ของเอนไซม์ HIV-1 IN (IN recognition sequence) ซึ่งได้อธิบายการเตรียมโดย ศักดิ์จักรภพ และคณะ (30) ทำสังเคราะห์ 100-mer oligonucleotides (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) โดยบริเวณเส้น sense stranded จะมีลำดับเบส ดังนี้ (sense LTR-B) 5'-ACTGGATGGG TGGTTAGACC AGATCTGAGC CTTGTTGTGT GACTCTGGTA CCTAGAGATC CCTCAGACCC TTTTAGTCAG TGTGGAAAAT CTCTAGCAGT-biotin-3' และ antisense LTR จะมี complementary sequence กับเส้น sense ดังกล่าวในข้างต้น แต่จะไม่มีติดฉลากด้วย biotin จากนั้นทำการ annealing HIV-LTR substrates โดยเติม sense LTR-B และ antisense LTR ใน DNase/RNase-free water ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 ไมโครโมลลาร์ จากนั้นให้ความร้อน mixture โดยใช้อุณหภูมิที่ 95 °C นาน 5 นาที และลดความอุณหภูมิลงจนอุณหภูมิเท่ากับ อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

2.3 การเตรียม avidin-coated PCR tube

ทำการเคลือบสารละลาย glutaraldehyde solution ลงในหลอด PCR จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อโรคและเติม avidin ที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 1, 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นทำการล้างเพื่อกำจัดสารเคมีส่วนเกินออกด้วย washing buffer แล้ว block หลอดด้วย blocking solution แล้วล้างด้วย washing buffer จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของหลอดที่เคลือบด้วย avidin ด้วยการติดตามด้วย biotin-HRP

2.4 การตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค PCR

ทำการเคลือบหลอด PCR ด้วยวิธีข้างต้น จากนั้นทำการตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ integrase โดยการนำ DNA substrate (IN recognition sequence) ซึ่งออกแบบให้มีตำแหน่งที่จะถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ integrase โดยปลาย 3' จะมีการติดฉลากด้วย biotin ที่จะไปจับได้กับ avidin ที่เคลือบไว้บนหลอด PCR ทำการเติมเอนไซม์ integrase ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อดูผลของ integrase activity ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาเติมลงในหลอด PCR ที่เคลือบด้วย avidin จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที แล้วล้างหลอดทดลองด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติม master mix สำหรับทำ PCR ลงไป โดยใน master mix ประกอบไป 5 Prime MasterMix (5 Prime, Hamburg, Germany) และ primer ที่มีความจำเพาะต่อ IN recognition sequence primers SS-F4 (5'-TGGTTAGACCAGATCTGAGCCT-3') และ

LTR Rev (5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACACTGACTA-3') หากในปฏิกิริยามี integrase activity อยู่จริง ผลที่ได้จะไม่สามารถเห็น PCR product บน agarose gel electrophoresis ได้ และทดสอบผลของ NaN_3 และยา Raltigavir (RAL) ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ integrase ก็ยังสามารถเห็น band บนเจลได้

2.5 การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real time-PCR

ทำการเตรียม avidin coated- tube โดยเคลือบสารละลาย glutaraldehyde ลงในหลอด real time - PCR จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อโรคและเติม avidin ที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จากนั้นทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วนำล้างเพื่อกำจัดสารเคมีส่วนเกินออกด้วย washing buffer แล้ว block หลอดด้วย blocking solution แล้วล้างด้วย washing buffer

ทำการตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ integrase โดยการนำ biotinylated DNA substrate ซึ่งออกแบบให้มีตำแหน่งที่จะถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ integrase โดยจะมีการติดฉลากด้วย biotin ที่ปลาย 3' ที่จะไปจับได้กับ avidin ที่เคลือบไว้บนหลอด real-time PCR (ดังวิธีข้างต้น) ทำการเติมเอนไซม์ integrase ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อดูผลของ integrase activity ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาเติมลงในหลอด PCR ที่เคลือบด้วย avidin จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วล้างหลอดทดลองด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติม master mix สำหรับทำ real-time PCR ลงไป โดยใน master mix ประกอบไปด้วย the THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (Toyobo, Japan) primer ที่มีความจำเพาะต่อ IN recognition sequence (SS-F4 and LTR Rev ที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 2.3) และ probe : SuplNprobe (5'-6FAM-CTggTACCTAgAgATCCCTCAgAC-BBQ-3') โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาใน CFX96 Real-Time System

2.6 การทดสอบฤทธิ์ของยาในการต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real time-PCR

ทำการเตรียม avidin coated- tube โดยเคลือบสารละลาย glutaraldehyde ลงในหลอด real time - PCR จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อโรคและเติม avidin ที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จากนั้นทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วนำล้างเพื่อกำจัดสารเคมีส่วนเกินออกด้วย washing buffer แล้ว block หลอดด้วย blocking solution แล้วล้างด้วย washing buffer

ทำการตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ integrase และทดสอบยาและสารที่มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์อินทิเกรส โดยการนำ biotinylated DNA substrate ซึ่งออกแบบให้มีตำแหน่งที่จะถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ integrase โดยจะมีการติดฉลากด้วย biotin ที่จะไปจับได้กับ avidin ที่เคลือบไว้บนหลอด real-time PCR (ดังวิธีข้างต้น) ชุดการทดสอบที่ 1 ไม่มีการเติมเอนไซม์ integrase ชุดการทดสอบที่ 2 มีการเติมเอนไซม์ integrase ชุดการทดสอบที่ 3 มีการเติมเอนไซม์ integrase และสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ integrase ได้หรือไม่ ได้แก่ unlabelled competitive LTR และ Raltigavir (RAL) และ sodium azide (NaN_3) ใช้เป็นสารควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก จากนั้นนำชุดทดสอบแต่ละชุดบ่มร่วมกับ biotinylated DNA substrate ที่อุณหภูมิ

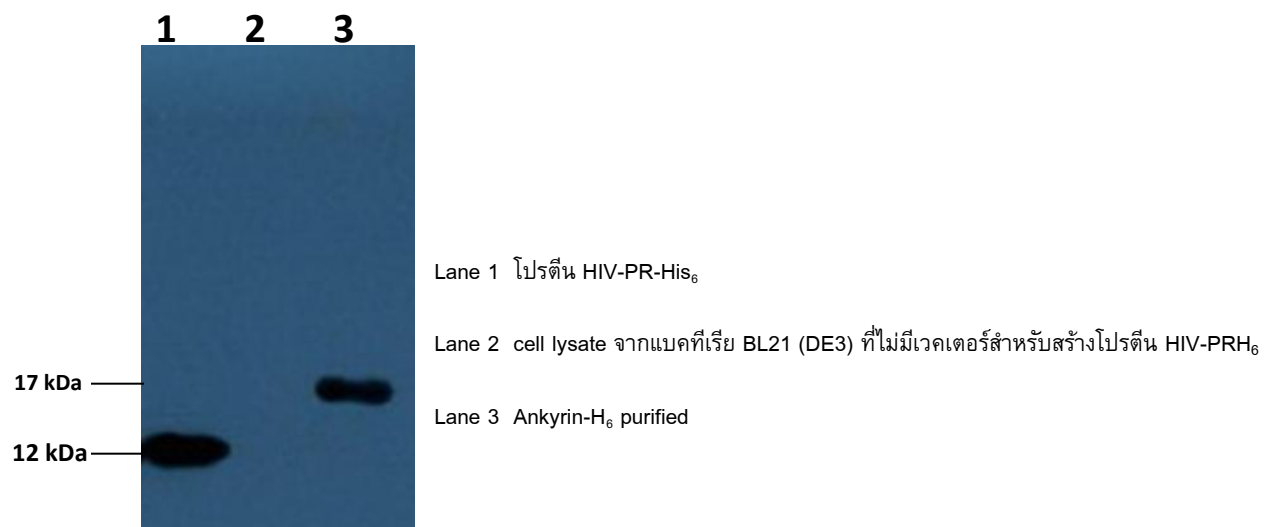
37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาเติมลงในหลอด real-time PCR ที่เคลือบด้วย avidin แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นล้างหลอดทดลองด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติม master mix สำหรับทำ real-time PCR ลงไป โดยใน master mix ประกอบไปด้วย primer ที่มีความจำเพาะต่อ IN recognition sequence และ specific probe

ผลการวิจัย

1. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 โดยเทคนิค immunochromatographic (IC) strip test

1.1 การเตรียมเอนไซม์ protease (HIV-PR_{H6}) จากแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

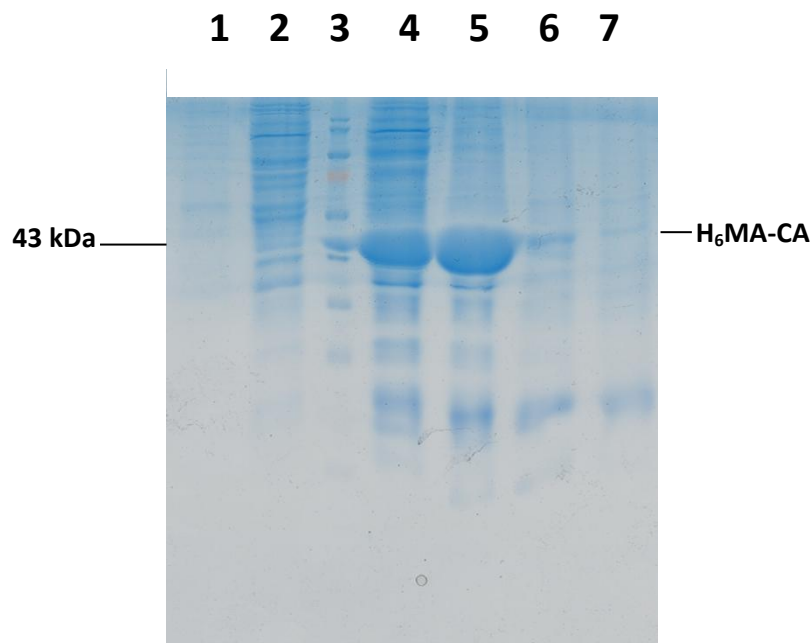
จากการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน HIV-PR_{H6} ด้วยวิธี Western blot ด้วย anti-His mAb และติดตามสัญญาณด้วย goat anti-mouse IgG ที่ติดฉลากด้วย HRP ลงไป เมื่อเติม chemiluminescence substrate และทำการประกบฟิล์ม ดังรูปที่ 3 พบว่าใน lane ที่มีแบคทีเรีย BL21 (DE3) ที่ไม่มีเวกเตอร์สำหรับสร้างโปรตีน HIV-PR_{H6} ไม่พบการสร้างโปรตีน (lane ที่ 2) สำหรับ lane ที่มี Ankyrin-H₆ purified ซึ่งใช้เป็น positive control ในการทดสอบนี้ เกิดแถบขึ้นที่ขนาดประมาณ 17 kDa (lane ที่ 3) ซึ่งเป็นขนาดของ Ankyrin-H₆ purified จริง และใน lane ที่ 1 พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 12 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีน HIV-PR_{H6} แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างโปรตีนดังกล่าวได้จริง



รูปที่ 3 แสดงการสร้างโปรตีน HIV-PR_{H6} ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

1.2 การเตรียม HIV-1 protease substrate (H₆MA-CA)

เมื่อทำการแตกเซลล์ Sf9 ทำให้ติดเชื้อด้วย recombinant baculovirus พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการแสดงออกของโปรตีน H₆MA-CA จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยผ่าน HisTrap column จากรูปที่ 4 พบแถบโปรตีนขนาด 43 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีน H₆MA-CA ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้งาน และเมื่อทำให้โปรตีนเข้มข้น พบว่าสามารถเตรียมโปรตีนที่บริสุทธิ์ได้ด้วยความเข้มข้น 10 mg โดยมีปริมาณเพียงพอที่จะนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป



Lane 1 unbound protein จากขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

Lane 2 crude extract จากเซลล์ sf9 ที่มียืนยันกำหนดการสร้างโปรตีน H₆MA-CA

Lane 3 protein marker

Lane 4-7 โปรตีน H₆MA-CA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

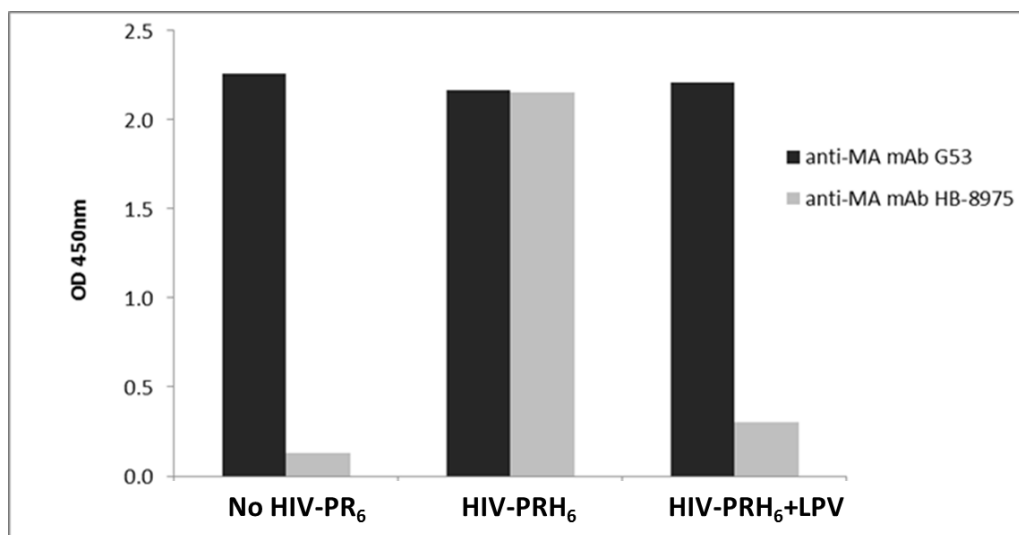
รูปที่ 4 ตรวจสอบโปรตีน H₆MA-CA ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ ในเจล SDS-PAGE ด้วยการย้อมด้วยสี page blue protein staining

1.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สามารถผลิตโมโนโคลนอล G53 และ anti-MA mAb HB-8975 ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน MA และ MA- C-terminal ที่มีความบริสุทธิ์ในปริมาณมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในตรวจหาประสิทธิภาพของ HIV-PRH₆ ในการตัดโปรตีน H₆MA-CA ต่อไป

1.4 การตรวจสอบ activity ของ HIV-1 protease โดยเทคนิค ELIS-based HIV-PR activity assay (ELIB-PA)

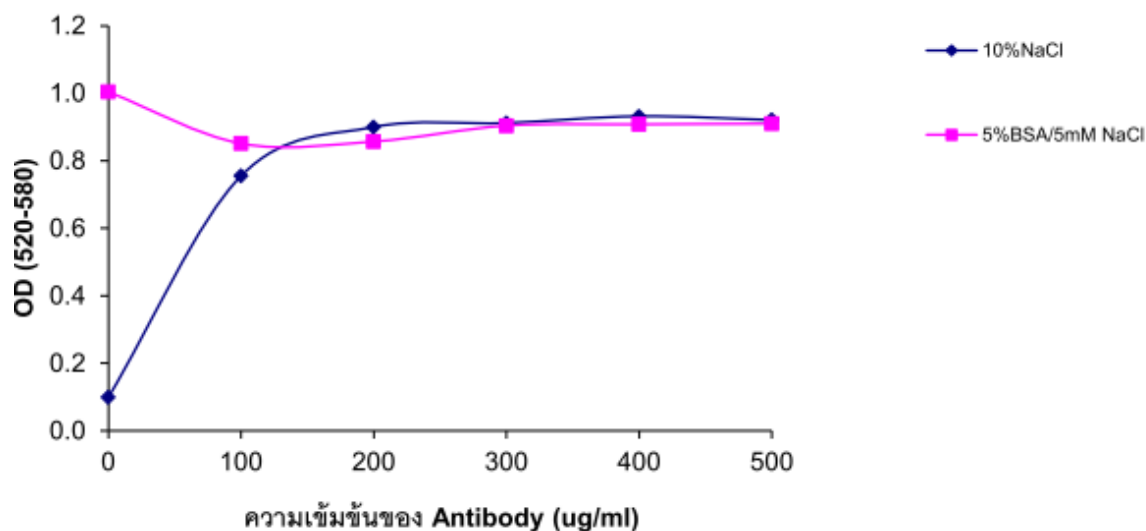
จากการทดสอบ activity ของเอนไซม์ HIV-PRH₆ ด้วยวิธี ELIB-PA โดยใช้ anti-MA mAb G53 และ anti-MA mAb HB-8975 (รูปที่ 5) ในปฏิกิริยาที่มี HIV-PRH₆ เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มี HIV-PRH₆ พบว่าค่า การดูดกลืนแสงในหลุมที่ตรวจสอบด้วย anti-MA mAb G53 มีค่าที่ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่หลุมที่ใช้ anti-MA mAb HB-8975 มีค่าที่เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากในปฏิกิริยาที่มี HIV-PRH₆ แสดงให้เห็นว่า anti-MA mAb G53 สามารถจับได้กับจับโปรตีนแมทริก (MA) ของเชื้อเอชไอวีทั้งรูปของ H₆MA-CA และ H₆MA ในขณะที่ anti-MA mAb HB-8975 นั้นจะจับได้อย่างจำเพาะกับกรดอะมิโนด้านปลายคาร์บอกซีของโปรตีน H₆MA ซึ่งจะเผยออกมาเมื่อถูกตัดด้วย HIV-PRH₆ เท่านั้น จึงทำให้สามารถนำแอนติบอดีทั้งสองตัวนี้ไปพัฒนาเป็น immunochromatographic (IC) strip test ต่อไปได้



รูปที่ 5 ผลการทดสอบ activity ของ HIV-PRH₆ ในการตัดโปรตีน H₆MACA ด้วยเทคนิค ELIB-PA

1.5 หาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำไปติดฉลากกับ colloidal gold

จากรูปที่ 6 ความเข้มข้นของ anti-MA mAb HB-8975 ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการติดฉลากกับ colloidal gold คือ 200 ug/ml (ดังรูปที่ 6) จากนั้นทำการ conjugate แอนติบอดีตามที่ได้หาความเหมาะสมกับ colloidal gold เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 6 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti-MA mAb HB-8975 ที่จะนำไปใช้ในการติดฉลากกับ colloidal gold

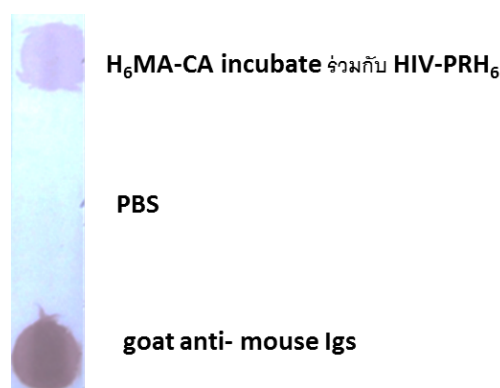
1.6 การทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก anti-MA mAb ด้วย colloidal gold และประสิทธิภาพ

ในการจับของแอนติบอดี

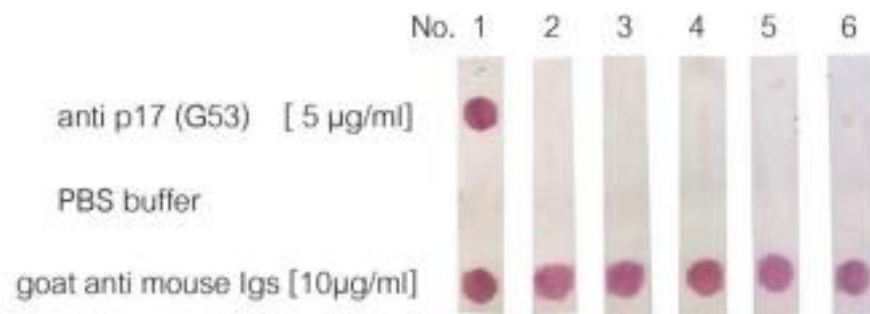
จากผลการทดสอบ ดังรูปที่ 7 สังเกตเห็นจุดทดสอบได้อย่างชัดเจนบริเวณที่เป็นชุดควบคุมที่ให้เป็นผลบวก คือ goat anti-mouse IgS แสดงว่ามีแอนติบอดีที่สามารถจับกับ colloidal gold ได้ และบริเวณที่มีการ dot ด้วย H₆MA-CA ที่ incubate ด้วย เอนไซม์ protease ก็สังเกตเห็นจุดทดสอบเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า anti-MA mAb HB-8975 สามารถติดฉลากด้วย colloidal gold ได้จริง

ในรูปที่ 8 สังเกตเห็นจุดทดสอบเข้มในบริเวณ test line ที่มีการ dot anti-MA mAb G53 ในชุดทดสอบ ที่มี HIV-PR-His₆ และ H₆MA-CA (strip หมายเลข 1) ขณะที่ strip ที่ 2 นั้น มี HIV-PRH₆ และ H₆MA-CA และยาต้านการทำงานของเอนไซม์ HIV-PRH₆ คือ LPV จะไม่สังเกตเห็นจุดทดสอบบริเวณ test line (anti-MA mAb

G53) สำหรับบริเวณที่เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ คือ goat anti-mouse IgS สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบได้อย่างชัดเจน และในชุดที่เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ ได้แก่ strip หมายเลข 3-5 ไม่เกิดจุดทดสอบใดๆ แสดงว่า anti MA mAb HB-8975 ที่ติดฉลากด้วย colloidal gold สามารถจับได้กับส่วนของ H₆MA-CA ที่ถูก cleave ด้วย HIV-PRH₆ แล้วเท่านั้น จึงจะให้ผลการเกิดสีของ colloidal gold บริเวณ test line โดยที่ไม่มีผลรบกวนจาก nonspecific จากตัวแปรอื่นๆ เช่น บัฟเฟอร์ PBS ที่ใช้ หรือ โปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรียที่ใช้สร้าง HIV-PRH₆ ออกมา เป็นต้น และพบว่ายา LPV สามารถต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ ได้จริง จากระบบการทดสอบข้างต้น แสดงว่าการทดสอบนี้ประสบความสำเร็จในการทดสอบ immunochromatographic strip test จึงนำระบบดังกล่าวไปพัฒนาเป็น strip ต่อไป



รูปที่ 7 ทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก anti-MA mAb ด้วย colloidal gold



หมายเลข 1 คือ HIV-PRH₆ 3 mg/ml+ H₆MA-CA 5 ug/ml

หมายเลข 2 คือ HIV-PRH₆ 3 mg/ml+ H₆MA-CA 5 ug/ml+ LPV 1 ug/ml

หมายเลข 3 คือ BL21-DE3 lysate 3 mg/ml+ H₆MA-CA 5 ug/ml

หมายเลข 4 คือ BL21-DE3 lysate 3 mg/ml+ H₆MA-CA 5 ug/ml+ LPV 1 ug/ml

หมายเลข 5 คือ H₆MA-CA 15 ug/ml ไม่มี HIV-PRH₆

หมายเลข 6 คือ PBS buffer

รูปที่ 8 แสดงระบบการทดสอบการทำงานของ HIV-PRH₆ โดยระบบ sandwich dot blot

1.7 การทดสอบระบบการทำ immunochromatographic strip test โดยระบบ Pilot test

จากผลการทดสอบ พบว่าชุดควบคุมที่ให้ป็นผลบวก (strip หมายเลข 1) คือ goat anti-mouse IgS สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบได้อย่างชัดเจน แสดงว่าสารละลายสามารถเคลื่อนที่และพา anti-MA mAb HB-8975-CGC ที่บริเวณ conjugate pad ไปจับการ control line บน strip test ได้จริง

สำหรับชุดทดสอบที่มี H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆ (strip หมายเลข 3) เท่านั้นที่สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบสีม่วงแดงที่บริเวณ test line ในชุดทดสอบหมายเลขอื่นๆ ไม่เห็นจุดทดสอบ (strip หมายเลข 2 5 6 และ 7) และ strip หมายเลข 4 ที่มียาต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ คือ lopinavir ก็ไม่เกิดจุดทดสอบใดๆ ดังแสดงดังรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่า immunochromatographic strip test ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปประยุกต์สำหรับการตรวจหา HIV protease activity ได้



1 control line จุ่มทดสอบกับ PBS buffer

2 test line จุ่มทดสอบกับ H₆MA-CA 5 ug/ml ไม่มี HIV-PRH₆

3 test line จุ่มทดสอบกับ HIV-PRH₆ 3 mg/ml+ H₆MA-CA 5 ug/ml

4 test line จุ่มทดสอบกับ HIV-PRH₆ 3 mg/ml+ H₆MA-CA 5 ug/ml+LPV 1 ug/ml

5 test line จุ่มทดสอบกับ BL21-DE3 lysate 3 mg/ml+ H₆MA-CA 5 ug/ml

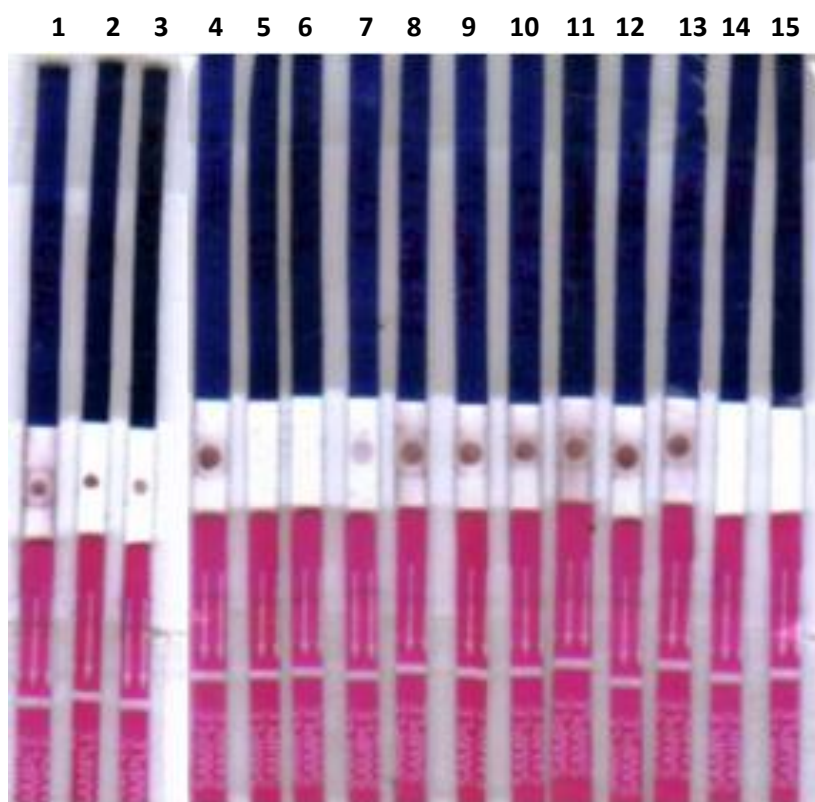
6 test line จุ่มทดสอบกับ BL21-DE3 lysate 3 mg/ml+ H₆MA-CA 5 ug/ml+LPV 1 ug/ml

7 test line จุ่มทดสอบกับ คือ PBS buffer

รูปที่ 9 การทดสอบการทำงานของ HIV-PRH₆ โดย immunochromatographic strip test

1.8 การทดสอบ IC strip แบบ pilot test เพื่อหา sensitivity โดยใช้ยา LPV ในทดสอบ

เมื่อทดสอบว่า IC strip สามารถนำมาใช้งานได้จริง จึงได้นำ ICT strip test มาทดสอบเพื่อหา sensitivity ของ IC strip ที่เตรียมได้ ดังแสดงในรูปที่ 10 ชุดควบคุมที่ให้ป็นผลบวก (strip หมายเลข 1-3) คือ goat anti-mouse IgS สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบได้อย่างชัดเจน สำหรับการทดสอบกับยา LPV ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.05 ng/ml-10,000 ng/ml ซึ่งค่าระดับยาที่มีผลในการรักษา (therapeutic concentration) ของ LPV อยู่ที่ 1,000 ng/ml จากการทดลองพบว่า ไม่พบจุดทดสอบการเกิดบริเวณ test line (strip หมายเลข 5 และ 6) ที่ความเข้มข้น LPV 10,000 ng/ml และ 4,000 ng/ml แต่เมื่อลดความเข้มข้นของ LPV ลงมาที่ 1,000 ng/ml (strip หมายเลข 7) พบจุดทดสอบจางๆ และเมื่อลดความเข้มข้นของ LPV ลงไปตั้งแต่ 500 ng/ml เป็นต้นไป สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบเข้มบริเวณ test line ดังนั้นสรุปได้ว่าค่า sensitivity ของ IC strip ในการตรวจหาความเข้มข้นของ LPV นั้นคือ 1,000 ng/ml

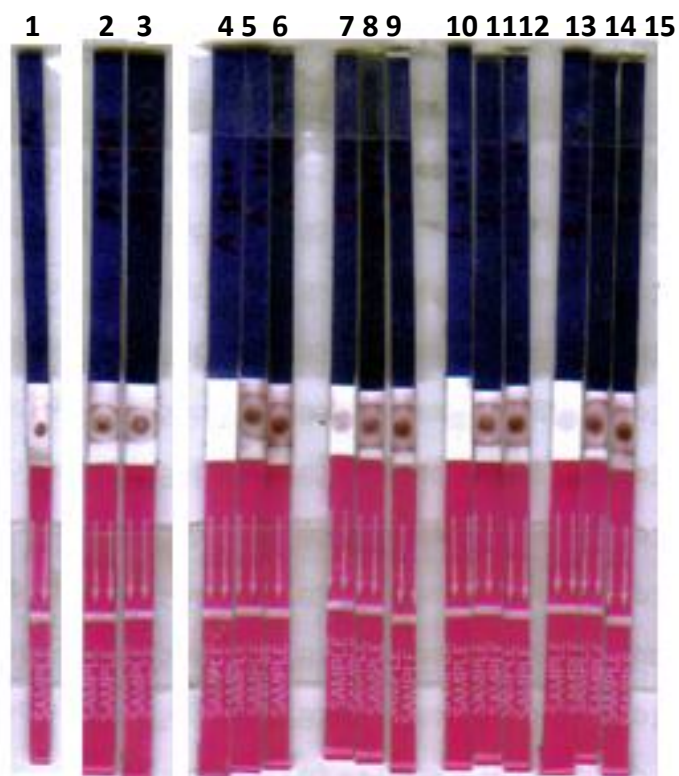


1. control line จุ่มทดสอบกับ PBS+ H₆MA-CA 5 µg/ml
2. control line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 10 ng/ml
3. control line จุ่มทดสอบกับ PBS buffer
4. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml
5. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml+ LPV 10,000 ng/ml
6. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml+ LPV 4,000 ng/ml
7. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml+ LPV 1,000 ng/ml
8. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml+ LPV 500 ng/ml
9. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml+ LPV 100 ng/ml
10. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 50 ng/ml
11. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 5 ng/ml
12. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 0.5 ng/ml
13. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 0.05 ng/ml
14. test line จุ่มทดสอบกับ PBS buffer
15. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ H₆MA-CA 5 µg/ml ไม่มี HIV-PRH₆

รูปที่ 10 sensitivity ของ immunochromatographic strip test

1.9 การทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip ด้วยยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease

เมื่อทดสอบว่า immunochromatographic strip test สามารถนำมาใช้งานได้จริง จึงได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับยาต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ ได้แก่ ยา LPV RTV ATV และ IDV ที่ได้รับมาจากองค์การเภสัชกรรม ดังแสดงในรูปที่ 11 ชุดควบคุมที่ให้ป็นผลบวก (strip หมายเลข 1) คือ goat anti-mouse IgS สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบได้อย่างชัดเจน สำหรับการทดสอบกับยาต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ ที่ระดับความเข้มข้น 1000, 100, และ 10 ng/ml พบว่าไม่พบจุดทดสอบการเกิดบริเวณ Test line เมื่อใช้ยา ATV และ LPV ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml (strip หมายเลข 4 และ 10) แต่เมื่อลดความเข้มข้นของ LPV ที่ 100 และ 10 ng/ml พบจุดทดสอบขึ้น (strip หมายเลข 5-6 และ 8-9) ในขณะที่ยา IDV และ RTV สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบขึ้นจางๆ บริเวณ test line ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml (strip หมายเลข 7 และ 13) เมื่อลดความเข้มข้นของยาทั้งสองมาที่ 100 และ 10 ng/ml เห็นจุดทดสอบขึ้นชัดเจน ดังนั้นสรุปได้ว่าชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถช่วยทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ ได้ และยังช่วยให้เห็นประสิทธิภาพของยา PIs ที่มีความแตกต่างกันอีกด้วย



1. control line จุ่มทดสอบกับ PBS + HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
2. test line จุ่มทดสอบกับ PBS + HIV-PR-His₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
3. test line จุ่มทดสอบกับ methanol + HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
4. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + ATV 1,000 ng/ml
5. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + ATVr 100 ng/ml
6. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + ATV 10 ng/ml
7. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + IDV 1,000 ng/ml
8. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + IDV 100 ng/ml
9. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + IDV 10 ng/ml
10. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 1,000 ng/ml
11. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 100 ng/ml
12. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 10 ng/ml
13. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + RTV 1,000 ng/ml
14. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + RTV 100 ng/ml
15. test line จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + RTV 10 ng/ml

รูปที่ 11 ทดสอบประสิทธิภาพของ immunochromatographic strip test ด้วยยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ได้แก่ ยา LPV, RTV, ATV และ IDV ที่ได้รับมาจากองค์กรเภสัชกรรม

1.10 การประกอบและทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ IC strip

เมื่อทำการทดสอบ immunochromatographic strip test แบบ pilot test สำเร็จแล้ว ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจหา protease activity และระดับยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ได้จริง ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการเตรียม ICT strip test แบบมาตรฐาน จากนั้นนำมาทดสอบกับชุดทดสอบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่าเส้นควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (control line) สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนในชุดทดสอบทั้งหมด (เส้นบน) สำหรับชุดทดสอบที่มี H₂MA-CA ที่ incubate ร่วมกับ HIV-PRH₆ เท่านั้นที่สามารถสังเกตเห็นเส้น test line เกิดขึ้นได้ชัดเจน (strip หมายเลข 3) และสำหรับชุดทดสอบที่มีการเติมยา LPV ไม่พบเส้น test line เกิดขึ้น (strip หมายเลข 4) ในขณะที่ชุดทดสอบที่มี BL21 (DE3) lysate ทั้งที่มีและไม่มี การเติมยา LPV ลงไป พบว่าสามารถสังเกตเห็นเพียงเส้น control line เท่านั้น (strip หมายเลข 5 และ 6) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ protease ที่เตรียมได้จากแบคทีเรียมี activity จริง และไม่มี nonspecific จากโปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรียที่ใช้สร้างเอนไซม์ protease ออกมา และยา LPV สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protease ได้จริง

จากการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า IC strip แบบมาตรฐานที่ผลิตได้นี้ยังคงมีความสามารถในการตรวจหา protease activity และทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ได้

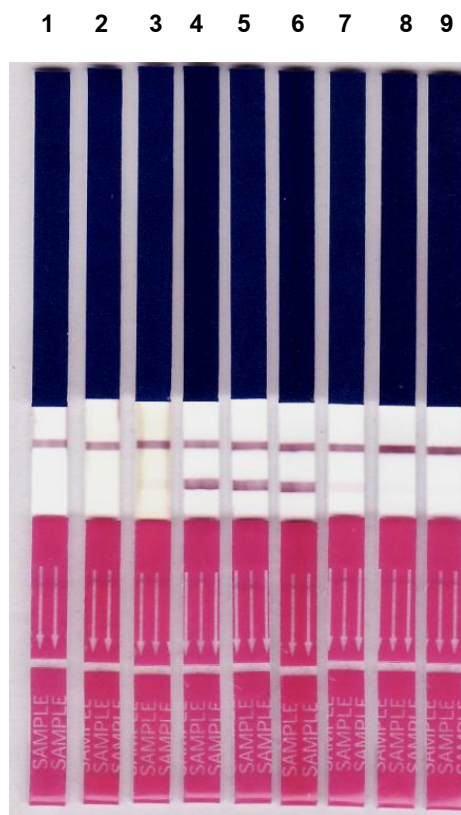


1. Strip จุ่มทดสอบกับ PBS
2. Strip จุ่มทดสอบกับ PBS+ H₆MA-CA 5 µg/ml
3. Strip จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 3 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
4. Strip จุ่มทดสอบกับ PBS+ HIV-PRH₆ 3 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 1,000 ng/ml
5. Strip จุ่มทดสอบกับ PBS+ BL21(DE3) lysate 3 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
6. Strip จุ่มทดสอบกับ PBS+ BL21(DE3) lysate 3 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml + LPV 1,000 ng/ml

รูปที่ 12 การทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip ที่ผลิตได้

1.11 การประเมินประสิทธิภาพของ IC strip test ในการตรวจระดับยาต้านการทำงานของ เอนไซม์ protease ในพลาสมา

จากการทดสอบเพื่อหา detection limit และผลของพลาสมาในการตรวจหาระดับยาต้านการทำงานของ protease ของ IC strip test ดังแสดงในรูป 13 ในชุดทดสอบที่มีพลาสมาที่มีเอนไซม์ LPV ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ng/ml และความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ng/ml (strip หมายเลข 5 และ 6) สังเกตเห็นเส้น test line ได้ชัดเจน ในขณะที่ชุดทดสอบพลาสมาที่มี LPV มากกว่า 1,000 ng/ml สามารถยับยั้งการทำงานของ protease ได้อย่างสมบูรณ์ (strip หมายเลข 7,8 และ 9) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ IC strip สามารถเห็นเส้น test line ได้ คือ 1,000 ng/ml (strip หมายเลข 6) โดยที่ระดับยา LPV ที่ 1,000 ng/ml เป็นจุด minimum effective concentration (MEC) (HIV/AIDS Treatment Guidelines/AIDSinfo 2014) ในขณะที่ชุดทดสอบควบคุมให้ผลเป็นลบ คือ สารละลายบัฟเฟอร์ PBS และพลาสมาที่ไม่มีการเติมยา ไม่ผลกระทบบต่อประสิทธิภาพของ IC test ที่ผลิตขึ้นมา



1. Strip จุ่มทดสอบกับ PBS
2. Strip จุ่มทดสอบกับพลาสมาที่ไม่เติมยา LPV
3. Strip จุ่มทดสอบกับพลาสมา + H₆MA-CA 5 µg/ml
4. Strip จุ่มทดสอบกับ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
5. Strip จุ่มทดสอบกับพลาสมาที่มียา LPV 100 ng/ml+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
6. Strip จุ่มทดสอบกับพลาสมาที่มียา LPV 1,000 ng/ml+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
7. Strip จุ่มทดสอบกับพลาสมาที่มียา LPV 10,000 ng/ml+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
8. Strip จุ่มทดสอบกับพลาสมาที่มียา LPV 20,000 ng/ml+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml
9. Strip จุ่มทดสอบกับพลาสมาที่มียา LPV 50,000 ng/ml+ HIV-PRH₆ 6 mg/ml + H₆MA-CA 5 µg/ml

รูปที่ 13 การประเมินประสิทธิภาพของ IC strip ในการตรวจระดับยาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ในพลาสมา

1.12 การเปรียบเทียบมาตรฐานระหว่างชุดทดสอบ IC strip กับวิธีมาตรฐาน HPLC

ทำการประเมินความแม่นยำของ IC strip ในการตรวจหาระดับยาในพลาสมา โดยทำการเติมยา LPV และ ATV ลงในพลาสมาคนปกติที่ความเข้มข้น 100-10,000 ng/ml จากนั้นทำการทดสอบด้วย IC strip และ HPLC โดยการนำชุดทดสอบในกลุ่มที่ 1 พลาสมาที่มีการเติมยาทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ มา incubate ร่วมกับ H₂MA-CA และ HIV-PRH₆ มาจุ่มโดยใช้ IC strip และกลุ่มที่ 2 พลาสมาที่มีการเติมยา LPV และ ATV นำไปตรวจหาระดับด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า IC strip แยกความเข้มข้นของยา PI ในเบื้องต้นได้ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml (ชุดทดสอบที่ 2, ตารางที่ 2) เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของ ยา LPV และ ATV ที่ตรวจโดยวิธีมาตรฐาน HPLC จากผลการทดลองเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปใช้ในการใน พยากรณ์ระดับยา PI ในพลาสมาได้ แต่อย่างก็ตามการหา sensitivity และ specificity จะต้องมีการทดสอบใน พลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ที่ได้รับยาต้านไวรัสในกลุ่มของ PI ที่ให้ร่วมกับยาต้านไวรัสอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ยา RTV อีกด้วย

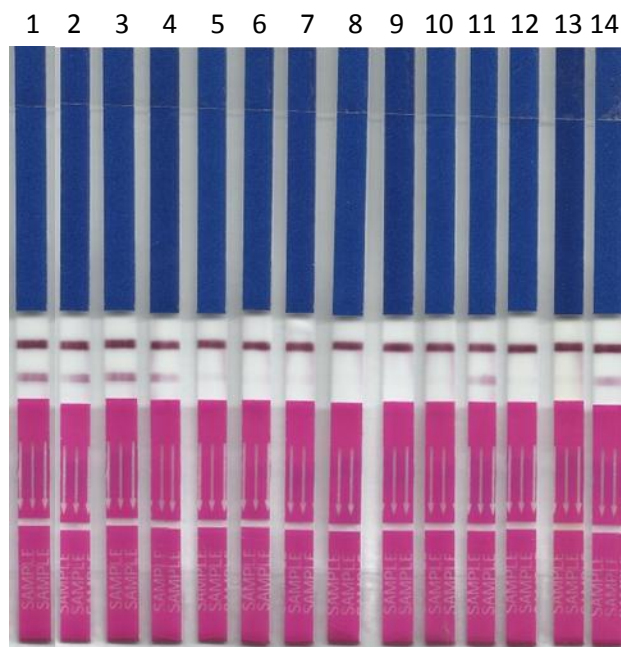
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของ IC strip กับวิธีมาตรฐาน HPLC

ชุด ทดสอบ	ความเข้มข้นของยา PI ที่เติมในพลาสมา (ng/ml)		ความเข้มข้นของยา PI ที่ เติมในพลาสมาตรวจวัด โดยวิธี HPLC (ng/ml)		ผลการทดสอบระดับยาโดย IC strip	
	LPV	ATV	LPV	ATV	LPV	ATV
1	100	100	94	102	เห็นเส้น test line	เห็นเส้น test line
2	1,000	1,000	998	1,016	เห็นเส้น test line	เห็นเส้น test line
3	10,000	10,000	9,928	10,283	ไม่เห็นเส้น test line	ไม่เห็นเส้น test line

1.13 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการทำงานของ HIV-PRH₆

จากผลการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรที่ได้รับความอนุเคราะห์จากจาก Prof. Dr. Khalijah Awang จาก Department of Chemistry Faculty of Science University of Malaya เพื่อดูผลว่าสารสกัดสมุนไพร ชนิดต่างๆ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-PRH₆ ได้หรือไม่ จากผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 14 ใน ชุดการทดสอบที่มีในชุดทดสอบที่มีเฉพาะเอนไซม์ HIV-PRH₆ และ H₂MA-CA สังเกตเห็น band ที่ test line ชัดเจน (strip No.1) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ PR สามารถทำงานได้ เมื่อดูผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการ ทำงานของ PR พบว่ามีสารสกัดจำนวน 8 ตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการทำงานของ HIV PR ได้ (strip No. 5-10

และ 12-13) สังเกตเห็น band ที่ test line จางมากและไม่เห็น band ในขณะที่ชุดควบคุมที่มี HIV-PRH₆ และ H₆MA-CA และมีการเติม DMSO สามารถสังเกต band ที่ test line ได้ชัดเจน แสดงให้เห็นว่า DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของ PR



รูปที่ 14 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการทำงานของ HIV-PRH₆

1.14 การเปรียบเทียบผลของระดับยาต้านการทำงานของ protease แบบยาเดี่ยวและยาที่ใช้ร่วมกัน

จากผลการทดสอบ พบว่า ในชุดทดสอบที่มีเอนไซม์ HIV-PRH₆ และ H₆MA-CA สังเกตเห็น band ที่ test line ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ PR สามารถทำงานได้ (รูปที่ 15a strip No.1) ทำการทดสอบผลของยาต้านการทำงานของ PR พบว่า เมื่อใช้ RTV ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า RTV ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ PR ได้ (รูปที่ 15a strip No. 2-7) ในขณะที่การใช้ยา LPV ดังแสดงในรูป 15b จะพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ PR ได้ โดยที่ระดับยา LPV ที่ 1,000 ng/ml เป็นจุด MEC ซึ่งให้ผลเหมือนกับการทดสอบที่ผ่านมา (strip No.2) ยังเห็น band ที่ test line เมื่อระดับ LPV เพิ่มขึ้นเป็น 4,000 ng/ml ไม่พบ band บริเวณ test line ในขณะที่เมื่อมีการใช้ LPV/RTV ร่วมกัน ดังแสดงในรูปที่ 15c พบว่า ที่ระดับยา LPV/RTV ที่ 1,000/150 ng/ml (strip No.2) เป็นจุดที่ยังสามารถเห็น band ที่บริเวณ test line ได้ ในขณะที่ระดับยาที่สูงกว่านี้จะพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ PR ได้ ดังนั้นสามารถสรุปผลการทดสอบที่ได้ว่าการทดสอบยาที่มีการใช้ยาแบบ combination ระหว่าง LPV/RTV ผลการทดสอบกับ strip ยังสามารถอ่านผลและได้ผลการทดสอบเหมือนกับการ

ใช้ LPV อย่างเดียว ดังนั้นจึงจะนำความเข้มข้นของยาที่ได้ทดสอบในครั้งนี้อมาทดสอบเพื่อประเมินผลของยาในพลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับยาในการทดลองต่อไป



รูปที่ 15a ผลการทดสอบระดับยาต้านการทำงาน RTV ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 15b ผลการทดสอบระดับยาต้านการทำงาน LPV ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 15c ผลการทดสอบระดับยาต้านการทำงานของ LPV ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่ 15 (a,b และ c) ผลการทดสอบระดับยาต้านการทำงานของ protease แบบยาเดี่ยวและยาที่ใช้ร่วมกัน

1.15 การทดสอบเพื่อประเมินผลของยาในพลาสมาของคนปกติและพลาสมาของผู้ป่วยเอชไอวีที่ได้รับยา

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ โดยการนำชุดทดสอบต้นแบบมาทดสอบกับสิ่งส่งตรวจที่ทราบผลการวินิจฉัยแล้ว ซึ่งตรวจมาแล้วโดยวิธีมาตรฐาน HPLC จากการทดสอบประสิทธิภาพของชุดที่ทดสอบที่ผลิตขึ้น โดยนำมาทดสอบกับตัวอย่างพลาสมาจำนวน 90 ราย โดยตัวอย่างพลาสมาทั้ง 90 ราย จะมีทั้งตัวอย่างพลาสมาจากคนปกติ จำนวน 30 ราย ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา HAART ที่ไม่ใช้ PI จำนวน 30 ราย และตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยที่ได้รับยา PI จำนวน 30 ราย พบว่า PR strip ที่เตรียมได้ ให้ผลการทดสอบเป็นผลบวกจริง ผลบวกปลอม ผลลบปลอม และผลลบจริง เท่ากับ 28, 2, 0 และ 60 ตัวอย่าง ตามลำดับ

จากนั้นนำข้อมูลที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบชุดทดสอบ IC strip กับวิธี HPLC มาแจกแจงความถี่แบบ 2 ทาง โดยใช้ตาราง Two by Two ดังตารางที่ 3 เพื่อประเมินคุณภาพด้านความแม่นยำ (relative accuracy) ความไว (relative sensitivity) ความจำเพาะเจาะจง (relative specificity) ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) และลบ (negative predictive value) และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ Kappa coefficient (k) (31) เพื่อ

ประเมินการยอมรับหรือความน่าเชื่อถือของชุดทดสอบ โดยใช้เกณฑ์การประเมินตาม และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบต้นแบบกับวิธีมาตรฐาน

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบกับวิธีมาตรฐาน HPLC

ผลการ ตรวจสอบ	วิธี HPLC		จำนวนตัวอย่าง ทั้งหมด
	ผลบวก	ผลลบ	
ชุดทดสอบ IC	true positive TP (a)	false positive FP (C)	30
	ผลบวก 28	2	
	false negative FN (b)	true negative TN (d)	60
	ผลลบ 0	60	
จำนวนตัวอย่าง	28	62	90

$$\text{ความแม่นยำ (relative accuracy)} = \frac{(TP+TN) \times 100\%}{(TP+FP+FN+TN)} = 97.8\%$$

$$\text{ความไว (relative sensitivity)} = \frac{TP \times 100}{TP+FN} = 100\%$$

$$\text{คำจำเพาะ (relative specificity)} = \frac{TN \times 100}{TN+FP} = 96.8\%$$

$$\text{Kappa coefficient (k)} = \frac{2(ad-bc)}{(a+b)(b+d)+(a+c)(c+d)} = 0.95$$

ค่าพยากรณ์ผลบวก (Positive predictive value ,PPV) =

$$\frac{\text{number of true positive (TP)}}{\text{number of true positive (TP)+number of false positive (FP)}} = 93\%$$

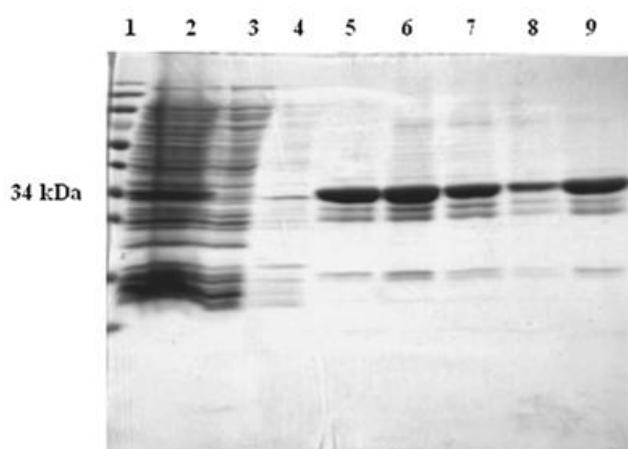
ค่าพยากรณ์ผลลบ (Negative predictive value ,PPV) =

$$\frac{\text{number of true negative (TN)}}{\text{number of true negative(TN)+number of false negative(FN)}} = 100\%$$

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจากตารางที่ 3 พบว่าคุณภาพของชุดทดสอบมีความไว (Sensitivity) ร้อยละ 100 มีความจำเพาะ (relative specificity) ร้อยละ 96.8 มีความแม่นยำ (relative accuracy) ร้อยละ 97.8 ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) หรือค่าที่แสดงถึงโอกาสของตัวอย่างพลาสมาที่มีผลการทดสอบเป็นบวกจะตรวจพบผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV PR โดยยาด้านการทำงานของ HIV PR คิดเป็นร้อยละ 93 และค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) หรือค่าที่แสดงถึงโอกาสของพลาสมาที่มีผลการทดสอบเป็นลบ จะตรวจไม่พบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV PR ร้อยละ 100 และได้ค่า Kappa coefficient (k) เท่ากับ 0.95 แสดงว่าความน่าเชื่อถืออยู่ในเกณฑ์ดีมาก ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (32)

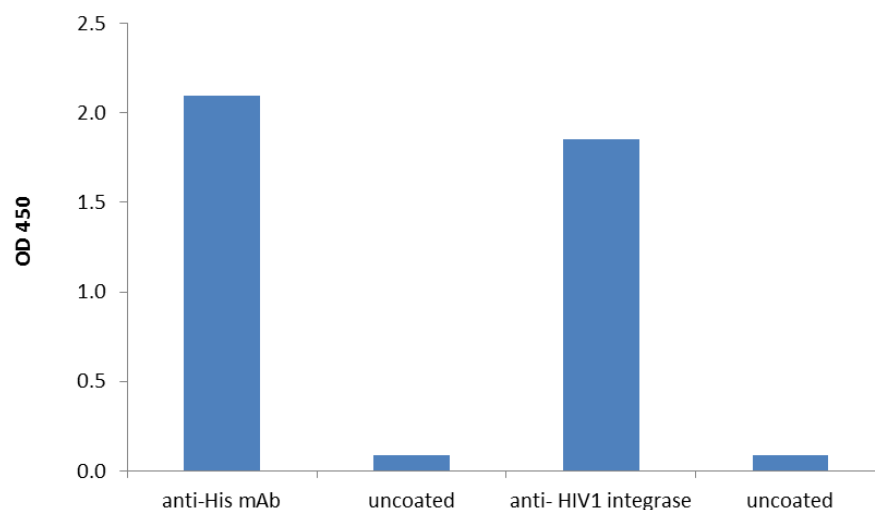
2.1 การผลิตเอนไซม์ integrase และการทำให้บริสุทธิ์

จากการผลิต Soluble Active Mutant of HIV-1 Integrase ในแบคทีเรีย โดยนำพลาสมิด pINSD.His.sol (ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, USA) ซึ่งมีข้อกำหนดการสร้างเอนไซม์ Soluble Active Mutant of HIV-1 Integrase เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ BL21 (DE3) จากนั้นนำเอนไซม์ integrase ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน His trap column แล้วทำการตรวจสอบการสร้างโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis จากรูปที่ 16 พบแถบของโปรตีน ขนาดประมาณ 32 kDa ซึ่งเป็นขนาดของเอนไซม์ integrase จริง (lane 4-9)



- | | |
|----------|--|
| Lane 1 | Protein Marker |
| Lane 2 | crude extractจากแบคทีเรีย BL21-DE3ที่มีเอนไซม์ integrase |
| Lane 3 | unbound protein จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ |
| Lane 4-9 | เอนไซม์ integrase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว |

รูปที่ 16 การทำ SDS PAGE ของเอนไซม์ integrase ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์

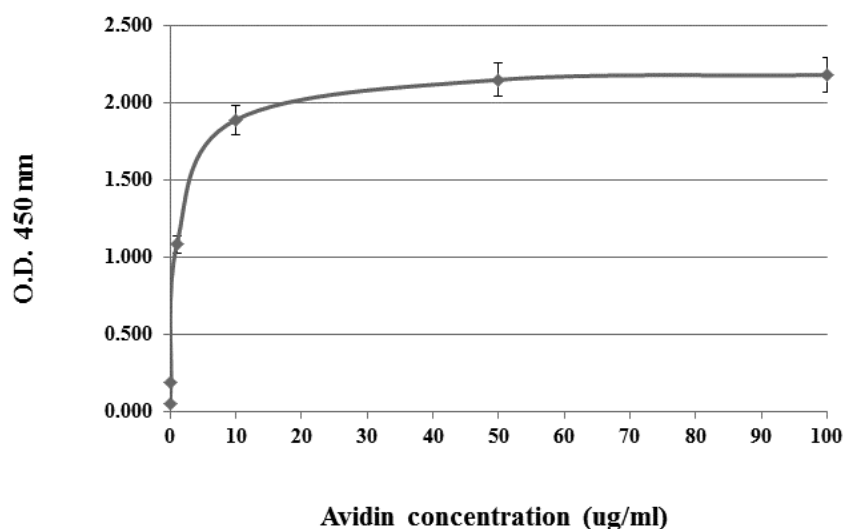


รูปที่ 17 ผลการทดสอบ EISA ของเอนไซม์ integrase ที่ติดตามด้วย anti-His monoclonal antibody และ anti-HIV 1 integrase monoclonal antibody

จากนั้นนำเอนไซม์ integrase ที่บริสุทธิ์มาทดสอบว่ามีเอนไซม์ integrase อยู่จริง ด้วยวิธี ELISA แบบ direct (รูปที่ 17) ด้วยการเคลือบเพลทด้วยเอนไซม์ integrase แล้วติดตามด้วยการใช้ anti-His monoclonal antibody และ anti-HIV-1 integrase monoclonal antibody พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 2 และ 1.8 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้สามารถสร้างเอนไซม์ integrase ในรูปแบบ soluble form และสามารถทำให้เอนไซม์ integrase บริสุทธิ์ได้

2.2 การเตรียม avidin-coated PCR tube

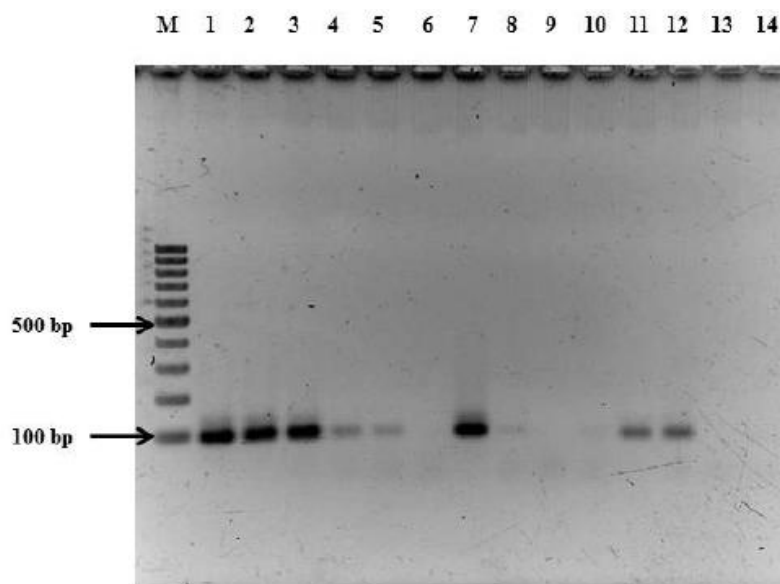
เมื่อทำการเคลือบ avidin ในหลอด PCR แล้ว ทำการตรวจสอบว่า avidin สามารถเคลือบหลอด PCR ด้วยการตรวจติดตามด้วย biotin-HRP พบว่า avidin ที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 µg/ml ขึ้นไป (รูปที่ 18) มีประสิทธิภาพในการเคลือบหลอด PCR ได้ดี ดังนั้นจึงเลือกที่ avidin ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มาใช้ในการเคลือบหลอด PCR สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป



รูปที่ 18 ผลการทดสอบการเคลือบหลอด PCR ด้วย avidin โดยการติดตามด้วย Biotin-HRP

2.3 การตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค PCR

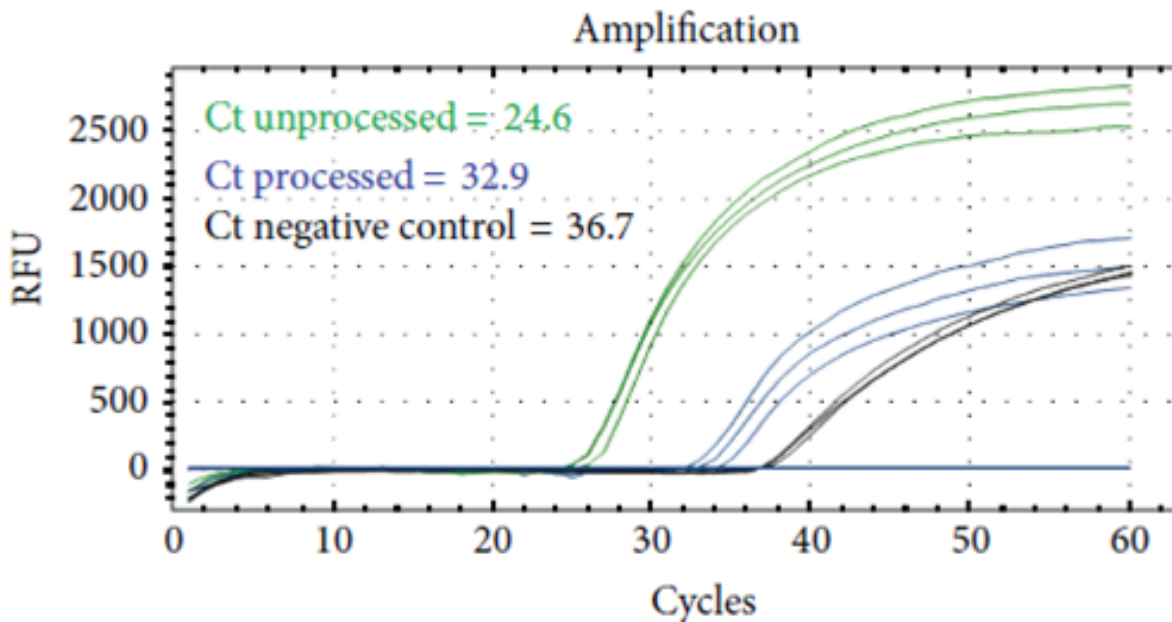
จากผลการทดลอง พบว่าเห็น band DNA ขนาดประมาณ 100 bp (รูปที่ 19, lane 1-3) โดย band ที่เกิดขึ้นมีความเข้มใกล้เคียงกัน ในขณะที่ lane 4-6 มีเอนไซม์อินทิเกรสลงไป โดยใช้ความเข้มข้นของ HIV-1 LTR substrate 10, 1 และ 0.2 pM จะเห็นได้ว่า band ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของ substrate ที่ 0.2 pM (lane 6) มีลักษณะจางลงเมื่อเทียบกับ lane ที่ 4 และ 5 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ integrase มี activity จริง เมื่อใช้ความเข้มข้น HIV-1 LTR substrate ที่ 10 pM และ 1 pM (lane ที่ 7 และ 8) incubate ร่วมกับ integrase และ RAL ความเข้มข้น 10 μ M สามารถเห็นผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ integrase ได้ ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้น HIV-1 LTR substrate 10, 1 และ 0.2 pM (lane ที่ 10-12) incubate ร่วมกับ integrase และ NaN_3 5% สามารถเห็นผลการยับยั้งการทำงานของ integrase ได้จริง



รูปที่ 19 การตรวจหา activity ของเอนไซม์ integrase ด้วยเทคนิค PCR ทำการเติม HIV-1 LTR substrate ลงใน reaction mixture (lane ที่ 1-12) โดยให้ความเข้มข้นที่ 10 pM (lane 1 4 7 และ 10) 1 pM (lane 2 5 8 และ 11) และ 0.2 pM (lane 3 6 9 และ 12) ตามลำดับ lane 1-3 ไม่มี integrase, lane 4-6 มี integrase, lane 7-9 มี integrase และยา raltegravir (RAL) ความเข้มข้น 10 μ M, lane 10-12 มี integrase และ NaN_3 ความเข้มข้น 5% และ lane ที่ 13-14 คือ integrase และ reaction buffer เท่านั้น ใช้เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ

2.4 การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real-time PCR

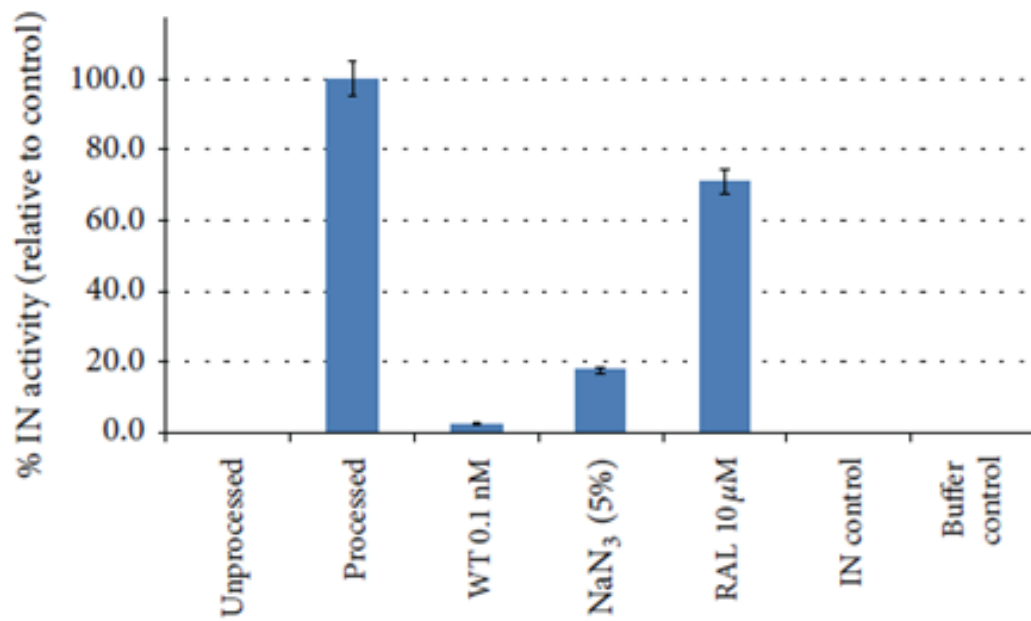
จากผลการทดลอง พบว่าในชุดการทดสอบที่มีการเติมเอนไซม์ integrase (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) ลงไปจะมีสัญญาณของ real time-PCR เกิดขึ้นได้ต่ำกว่าในชุดการทดสอบที่ไม่มี integrase (เส้นกราฟสีเขียว) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ integrase สามารถทำงานได้จริง สามารถตัด biotinylated DNA substrate ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับได้ทำให้เกิดสัญญาณช้า และในชุดการทดสอบที่เป็นชุดควบคุมให้ผลเป็นลบ พบว่าเกิดสัญญาณได้ช้ามาก ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 การตรวจหา integrase activity โดยระบบ real time PCR เมื่อในปฏิกิริยามีเอนไซม์ integrase และ HIV-DNA จะสังเกตเห็นเส้นกราฟที่เส้นสีน้ำเงิน (เอนไซม์ integrase มี activity จริง) และถ้าในปฏิกิริยามีเพียง HIV-DNA จะสังเกตเห็นเส้นกราฟดังแสดงที่เส้นสีเขียว และชุดทดสอบที่เป็นชุดควบคุม จะสังเกตเห็นในเส้นกราฟที่เป็นสีดำ

2.5 การทดสอบฤทธิ์ของยาในการต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real time -PCR

จากผลการทดลอง พบว่าในชุดการทดสอบที่มีการเติมเอนไซม์ integrase จะเห็นได้ว่า integrase สามารถทำงานได้จริงในการตัด biotinylated DNA substrate และเมื่อทำการเติมสารที่ต้องการทดสอบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อินทิเกรส คือ unlabelled competitive LTR พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของ integrase ได้ดี ในขณะที่สารที่สามารถยับยั้ง integrase ได้ คือ sodium azide (NaN_3) ให้ผลการยับยั้ง integrase ได้ดีกว่า RAL เนื่องจากยา RAL มีการออกแบบให้มีการยับยั้งในกระบวนการ strand transfer ของเอนไซม์ integrase ซึ่งในงานวิจัยอื่นๆ พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของ RAL ที่ระดับความเข้มข้นสูงถึงระดับไมโครโมลลาร์จึงจะสามารถยับยั้ง 3'-processing IN activity ได้ ซึ่งในการทดลองครั้งต่อไปจะต้องมีการหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 3'-processing IN activity มีใช้เป็นชุดควบคุมด้วย (รูปที่ 21)



รูปที่ 21 การตรวจหา integrase activity และฤทธิ์ของสารที่ต้านการทำงานของ integrase โดยระบบ

Real time- PCR

ข้อวิจารณ์

การพัฒนาชุดทดสอบ HIV protease activity โดยเทคนิค immunochromatographic (IC) strip test นี้อาศัยหลักการวัดความสามารถของ protease activity อย่างง่ายด้วยเทคนิค ELISA ที่เรียกว่า “ELIBPA” ซึ่งได้มีการพัฒนามาก่อนหน้านี้โดยกุลธิดา และคณะ (20) ส่วนประกอบสำคัญของการพัฒนาชุดทดสอบนี้เริ่มต้นจากการเตรียมเอนไซม์ HIV protease ซึ่งสร้างขึ้นด้วยระบบ bacterial expression system ในเซลล์แบคทีเรีย ในขณะที่การเตรียมสารตั้งต้นของ HIV protease คือ recombinant His₆Matrix-Capsid (His₆MA-CA) นั้นสร้างขึ้นด้วยระบบ baculovirus expression system ในเซลล์แมลง และส่วนประกอบที่สำคัญอีกหนึ่งอย่างของการพัฒนาชุดทดสอบนี้ ได้แก่ แอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจติดตาม โดยประกอบไปด้วย anti-MA mAbHB-8975 จาก American Type Culture Collection (ATCC) ที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับ epitope (DTGHSSQVSQNY) ตรงส่วน C-terminal MA protein ของ gag polyprotein โดย epitope ดังกล่าวจะเผยออกมาเมื่อ gag polyprotein ถูกตัดด้วย HIV PR เท่านั้น นอกจากนี้ยังมี anti-MA mAb G53 ที่สามารถจับกับโปรตีน MA ซึ่งผลิตขึ้นโดยในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยเอง

เมื่อทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นได้โดยเทคนิค ELISA เรียบร้อยแล้ว และได้ผลการทดสอบที่สามารถตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ PR ได้จริง ทางผู้วิจัยจึงทำการเตรียม colloidal gold เพื่อนำมาใช้ในการติดฉลาก anti-MA mAb HB-8975 โดยในขั้นตอนการทดสอบนี้ทางผู้วิจัยได้เตรียมชุดทดสอบแบบ pilot test การประกอบชุด IC strip เริ่มต้นด้วยการนำ anti-MA mAb HB-8975 ที่ติดฉลากด้วย colloidal gold ไปหยดลงบนส่วน conjugate pad สำหรับในส่วนของ test line นั้นหยดด้วย anti-MA mAb G53 และส่วนของ control line หยดด้วย anti-mouse IgS ทำการทดสอบโดยนำ H₆MA-CA มาทำการ incubate ด้วยเอนไซม์ PR ถ้า PR มี activity จะเกิดการตัดตรง cleavage site ในตำแหน่งระหว่าง MA และ CA ทำให้เกิดการหลุดออกจากกันของ MA และ CA นอกจากนั้นยังเผย epitope ที่สำคัญออกมาคือ C-terminal MA ส่งผลให้ anti-MA mAb HB-8975 conjugate gold จับกับตรง epitope นั้นผ่านไปยัง test line ที่มี anti-MA mAb G53 อยู่เกิดการจับกันเป็นรูปแบบ sandwich form ดังนั้น test line เห็นจุดสีม่วงแดง แสดงผลให้เห็นเอนไซม์ HIV protease สามารถทำงานได้จริง หรือปฏิกิริยาให้ผลบวก (positive reaction) ในปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ protease หรือมี protease inhibitor จะเห็นการยับยั้งปฏิกิริยาการตัดของเอนไซม์ protease จะไม่มีการเผยส่วน c-terminal MA ออกมา ดังนั้น anti-MA mAb HB-8975 conjugate gold จึงจับไม่ได้จึงไม่เกิดการจับแบบ sandwich form ที่ตำแหน่งของ test line ผลการทดสอบไม่เกิดแถบสีม่วงแดงให้เห็น เป็นปฏิกิริยาแบบให้ผลเป็นลบ (negative reaction) ในส่วนของ control line นั้นจะให้เห็นเป็นจุดทดสอบสีม่วงแดงในทั้ง positive reaction และ negative reaction เนื่องจากมี anti-mouse IgS คอยจับ anti-MA mAb HB-8975 conjugated gold ที่เคลื่อนผ่าน

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของชุดทดสอบด้วยยาต้านการทำงานของ PR ได้แก่ ยา LPV โดยทำการ incubate ร่วมกับเอนไซม์ PR และแอนติเจน H₆MA-CA จากผลการทดสอบจะสังเกตเห็นจุดทดสอบเข้มในบริเวณ test line ที่มีการหยด anti-MA mAb (G53) ส่วนในชุดทดสอบที่มี PR และ H₆MA-CA ในขณะที่ strip ที่มี PR และ H₆MA-CA และยาต้านการทำงานของเอนไซม์ PR ได้แก่ LPV จะไม่สังเกตเห็นจุดทดสอบบริเวณ test line สำหรับบริเวณที่เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ คือ goat anti-mouse IgS สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบได้อย่างชัดเจน และในชุดทดสอบที่เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ ไม่เกิดจุดทดสอบใดๆ แสดงว่า anti MA mAb HB-8975 ที่ติดฉลากด้วย colloidal gold สามารถจับได้กับส่วนของ H₆MA-CA ที่ถูก cleaved ด้วยเอนไซม์ HIV PR แล้วเท่านั้น จึงจะให้ผลการเกิดสีของ colloidal gold บริเวณ test line โดยไม่มีผลรบกวนจาก nonspecific จากตัวแปรอื่นๆ เช่น สารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ใช้ หรือโปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรียที่ใช้สร้างเอนไซม์ PR และพบว่ายา LPV สามารถต้านการทำงานของเอนไซม์ PR ได้จริง จากระบบการทดสอบข้างต้นแสดงว่าการทดสอบนี้ประสบความสำเร็จในการทดสอบ immunochromatographic strip test ในระดับ pilot จึงนำระบบดังกล่าวไปพัฒนาเป็น strip แบบมาตรฐานต่อไป

เมื่อระบบการทดสอบเบื้องต้นสำเร็จ จึงมาทำการพัฒนา IC strip มาทดสอบเพื่อหา sensitivity ของ IC strip โดยใช้ยา LPV สำหรับการทดสอบกับยา LPV ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.05 ng/ml-10,000 ng/ml ซึ่งค่าระดับยาที่มีผลในการรักษา (therapeutic concentration) ของ LPV อยู่ที่ 1,000 ng/ml จากการทดลองพบว่า LPV ที่ความเข้มข้น 10,000 ng/ml และ 4,000 ng/ml จะไม่พบจุดทดสอบเกิดบริเวณ test line แต่เมื่อลดความเข้มข้นของ LPV ลงมาที่ 1,000 ng/ml เห็นจุดทดสอบ และเมื่อลดความเข้มข้นของ LPV ตั้งแต่ 500 ng/ml เป็นต้นไป สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบเข้มบริเวณ test line ดังนั้นสรุปได้ว่าค่า sensitivity ของ ICT นี้ อยู่ที่ LPV ความเข้มข้น 1,000 ng/ml และจากการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นกับยาต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ ได้แก่ ยา LPV, RTV, ATV และ IDV ที่ได้รับมาจากองค์การเภสัชกรรม พบว่า ยา ATV และ LPV ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml จะไม่พบจุดทดสอบการเกิดบริเวณ test line แต่เมื่อลดความเข้มข้นของ LPV ลงมาที่ 100 และ 10 ng/ml เห็นจุดทดสอบเกิดขึ้น และสำหรับยา IDV และ RTV จะสามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบขึ้นจางๆ บริเวณ test line ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml เมื่อลดความเข้มข้นของยาทั้งสองมาที่ 100 และ 10 ng/ml เห็นจุดทดสอบขึ้นชัดเจน ดังนั้นสรุปได้ว่าชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถช่วยทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านการทำงานของ HIV-PRH₆ ได้ โดยพบความแตกต่างของยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับการทดสอบด้วยชุดตรวจนี้

เมื่อระบบการเตรียม IC strip แบบ pilot test สำเร็จ จึงได้มีการพัฒนา IC strip แบบมาตรฐาน เริ่มจากการนำ anti-MA mAb HB-8975-CGC เจือจางในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วพ่นลงบน conjugate pad แล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำมาประกอบเป็น strip โดยทำการพ่นด้วย anti-MA mAb G53 ซึ่งเป็นตัวแทนของ test line และ goat anti-mouse IgG ซึ่งเป็นตัวแทนของ control line แล้วทำทดสอบ strip เตรียมได้กับตัวอย่างต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับเอนไซม์ protease, ชุดของ H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับเอนไซม์ protease และมียาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease ได้แก่ lopinavir จากผลการทดสอบหลังจากเตรียม strip test แบบมาตรฐานแล้ว พบว่าชุดทดสอบที่มี H₆MA-CA ที่ incubate ร่วมกับเอนไซม์ PR เท่านั้นสามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบสีม่วงแดงที่บริเวณ test line สำหรับชุดทดสอบหมายเลขอื่นๆ ไม่เห็นจุดทดสอบ ในขณะที่เป็นชุดควบคุมที่ให้เป็นผลบวก คือ goat anti-mouse IgG สามารถสังเกตเห็นจุดทดสอบได้อย่างชัดเจน และในชุดทดสอบที่มียาต้านการทำงานของเอนไซม์ protease คือ LPV ก็ไม่เกิดจุดทดสอบใดๆ แสดงให้เห็นว่า IC strip ที่พัฒนาขึ้นนี้ทั้งในรูปแบบของ pilot test และแบบมาตรฐาน ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน ดังนั้นสามารถนำ strip นี้ไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจหา HIV PR activity และทดสอบยาด้านไวรัสในกลุ่ม PI ได้

เมื่อระบบการทดสอบ IC strip แบบมาตรฐานได้ผลการทดสอบที่ดีและมีประสิทธิภาพแล้ว ทางผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเพื่อหา detection limit และผลของพลาสมาในการตรวจหาระดับยาต้านการทำงานของ protease ของ IC strip ในชุดทดสอบที่มีพลาสมาที่มีเดมียา LPV ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ng/ml สังเกตเห็นเส้น test line ได้ชัดเจน ในขณะที่ชุดทดสอบพลาสมาที่มี LPV มากกว่า 1,000 ng/ml สามารถยับยั้งการทำงานของ protease ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ IC strip (lower detection) สามารถเห็นเส้น test line ได้ คือ 1000 ng/ml ในขณะที่ชุดทดสอบที่ให้ผลเป็นลบ คือ สารละลายบัฟเฟอร์ PBS และพลาสมาที่ไม่มีการเติมยา ไม่ผลกระทบบต่อประสิทธิภาพของ IC test ที่ผลิตขึ้นมา

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการนำ IC strip ไปวัดหาปริมาณ LPV แบบ semi-quantitative ที่ความเข้มข้นของระดับยาต่ำสุดในเลือดที่ให้ผลในการรักษา (minimum effective concentration, MEC) ที่ 1,000 ng/ml โดยการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ HIV-PR ที่เหมาะสมในการทดสอบ อีกทั้งยังทดสอบกับ LPV ที่ได้ทำการ spike ใน plasma พบว่าองค์ประกอบในส่วนของพลาสมา ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ HIV-PR และ LPV ผลการทดลองในชุดทดสอบที่มีพลาสมาที่มีเดมียา LPV ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ng/ml และที่ 1,000 ng/ml สังเกตเห็นเส้น test line ได้ชัดเจน และชุดทดสอบพลาสมาที่มี LPV มากกว่า 1,000 ng/ml จะไม่สามารถเห็น test line แสดงให้เห็นว่าที่ระดับยานี้สามารถยับยั้งการทำงานของ PR ได้อย่างสมบูรณ์

นอกจากนั้นยังได้ทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip กับยาต้านการทำงานของเอนไซม์ HIV-PR ชนิดอื่นที่ใช้ในปัจจุบันคือ ATV พบว่า IC strip สามารถวัดความสามารถของ ATV ได้เช่นเดียวกับการทดสอบ LPV เพื่อให้

การทดสอบประสิทธิภาพของ IC strip เป็นไปอย่างถูกต้อง ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบผลการทดสอบของ IC strip ในการแยกความเข้มข้นของ LPV และ ATV ใน spiked-plasma ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/ml กับผลการวิเคราะห์ประมาณ LPV และ ATV ด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC พบว่าผลการทดสอบ IC strip มีความสอดคล้องกับผล HPLC จากผลการทดลองเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำไปใช้ในการในพยากรณ์ระดับยา PI ในพลาสมาได้ แต่อย่างไรก็ตามการหา sensitivity และ specificity จะต้องมีการทดสอบในพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ที่ได้รับยาต้านไวรัสในกลุ่มของ PI ที่ให้ร่วมกับยาด้านไวรัสอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยา RTV อีกด้วย

ทางผู้วิจัยได้ทำการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพรที่ได้รับความอนุเคราะห์จากจาก Prof. Dr. Khalijah Awang จาก Department of Chemistry Faculty of Science University of Malaya เพื่อดูผลว่าสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV-PRH₆ ได้หรือไม่ จากสารสกัดจำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่ามีสารสกัดจำนวน 8 ตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการทำงานของ HIV PR ได้ เนื่องจากในขั้นตอนของการเตรียมสารสกัดเพื่อนำมาทดสอบ ต้องใช้สารละลาย DMSO มาใช้เจือจางสารสกัด จากการทดสอบ incubate HIV-PRH₆ และ H₆MA-CA ร่วมกับ DMSO สามารถสังเกต band ที่ test line ได้ชัดเจน แสดงให้เห็นว่า DMSO ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของ PR และสามารถนำมาใช้ในการเจือจางสารสกัดที่นำมาใช้ในการทดสอบได้

สำหรับการทดสอบผลของการใช้ยาด้าน PR โดยการทดสอบยา LPV ร่วมกับยา RTV ที่ระดับจากความเข้มข้นต่างๆ จากผลการทดสอบ พบว่าในชุดทดสอบที่มีเฉพาะเอนไซม์ PR และ H₆MA-CA สังเกตเห็นเส้นทดสอบที่ test line ได้ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ PR สามารถทำงานได้จริง เมื่อดูผลของยา RTV อย่างเดียว พบว่า เมื่อใช้ RTV ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า RTV ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ PR ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่จะอธิบายไว้ว่าการต้องมีการใช้ RTV เป็นตัว booster ร่วมกับยา PI อื่นๆ (33) จึงจะสามารถยับยั้งเอนไซม์ HIV PR ได้สมบูรณ์ ในขณะที่การใช้ยา LPV จะพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ PR ได้ โดยที่ระดับยา LPV ที่ 1,000 ng/ml เป็นจุด MEC ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับที่ได้ทำการทดสอบ ในขณะที่เมื่อมีการใช้ LPV/RTV ร่วมกัน พบว่าที่ระดับยา LPV/RTV ที่ 1,000/150 ng/ml เป็นจุดที่ยังสามารถเห็น band ที่บริเวณ test line ได้ ในขณะที่ระดับยาที่สูงกว่านี้จะพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ PR ได้ ดังนั้นการใช้ยา LPV ร่วมกับ RTV ให้ผลการทดสอบกับ PR strip ยังสามารถอ่านผลและได้ผลการทดสอบเหมือนกับการใช้ LPV อย่างเดียว

เมื่อทดสอบผลของการใช้ยา LPV ร่วมกับ RTV ที่อยู่ในพลาสมาคนปกติเรียบร้อยแล้ว ทางผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเพื่อประเมินผลของ IC strip ในการตรวจหายาด้าน PR ในตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยาด้านไวรัส ซึ่งการทดสอบจะแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างพลาสมาคนปกติ ใช้เป็นชุดการทดสอบควบคุม กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาแบบ HAART ที่ไม่ใช้ PI และกลุ่มที่ 3 ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยา PI ในการรักษาแบบ HAART จากผลการทดสอบพบว่าในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 พบว่าในพลาสมาคนปกติไม่มีผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์ PR ซึ่งผลการทดสอบที่ถูกต้องทั้ง 30

ราย ในขณะที่กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างพลาสมาจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาแบบ HAART ที่ไม่ใช่ PI พบว่า ยาด้านไวรัสเอชไอวีที่ไม่ใช่ PI ไม่มีรบกวน ซึ่งให้ผลการทดสอบถูกต้องทั้งหมดเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ในขณะที่กลุ่มที่ 3 พลาสมาจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยา PI ในการรักษาแบบ HAART จากผลการทดสอบพบว่ามีเพียง 2 รายที่ให้ผลบวกปลอม

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติของชุดทดสอบจากข้อมูลการทดสอบจะเห็นได้ว่ามีความไว (Sensitivity) ร้อยละ 100 มีความจำเพาะ (relative specificity) ร้อยละ 96.8 มีความแม่นยำ (relative accuracy) ร้อยละ 97.8 ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) หรือค่าที่แสดงถึงโอกาสของตัวอย่างพลาสมาที่มีผลการทดสอบเป็นบวกจะตรวจพบผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV PR โดยยาต้านการทำงานของ HIV PR คิดเป็นร้อยละ 93 และค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) หรือค่าที่แสดงถึงโอกาสของพลาสมาที่มีผลการทดสอบเป็นลบ จะตรวจไม่พบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HIV PR ร้อยละ 100 และได้ค่า Kappa coefficient (k) เท่ากับ 0.95 แสดงว่าความน่าเชื่อถืออยู่ในเกณฑ์ดีมาก ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Landis and Koch. 1977)

การทดสอบฤทธิ์การต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real-time PCR

ทางผู้วิจัยได้ทำการผลิต Soluble Active Mutant of HIV-1 Integrase ในแบคทีเรีย ซึ่งมีขึ้นกำหนดการสร้างเอนไซม์ Soluble Active Mutant of HIV-1 Integrase เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ BL21 (DE3) จากนั้นนำเอนไซม์ integrase ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน His trap column แล้วตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blotting จากนั้นนำเอนไซม์ integrase ที่บริสุทธิ์มาทดสอบว่ามีเอนไซม์ integrase อยู่จริง ด้วยวิธี ELISA แบบ direct พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงเกิดขึ้นจริง ดังนั้นทางผู้วิจัยสามารถสร้างเอนไซม์ integrase ในรูปแบบ soluble form และสามารถทำให้เอนไซม์ integrase บริสุทธิ์ได้

จากนั้นทางผู้วิจัยทำการทดสอบ activity ของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค PCR โดยทำการเตรียมหลอด PCR ที่มีการเคลือบ avidin ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในทดสอบ จากนั้นทำการ incubate เอนไซม์ integrase ร่วมกับ biotinylated HIV-1 LTR substrate ใน reaction buffer โดยมีการเติมและไม่เติม NaN_3 และ RAL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นย้าย reaction mixture ลงไปในหลอด PCR ที่มีการเคลือบ avidin ไว้ จากนั้นล้างหลอด PCR ด้วย washing buffer และเติม PCR master mix ที่ประกอบด้วย primer ที่มีความจำเพาะต่อ IN recognition sequence และนำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis พบว่าเอนไซม์ integrase มี activity อยู่จริง สำหรับ NaN_3 และ RAL ที่เป็นยาต้านการทำงานของ integrase พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ integrase ได้จริง

หลังจากผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค PCR แล้ว จึงได้ทำออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะต่อ IN recognition sequence และ specific probe แล้วทำการ ตรวจสอบ activity ของ integrase โดยเทคนิค real time-PCR จากการทดสอบพบว่าในชุดการทดสอบที่อยู่ใน ปฏิกริยามีเอนไซม์ integrase จะมีสัญญาณของ real time-PCR เกิดขึ้นได้ช้ากว่าในชุดการทดสอบที่ไม่มี integrase แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ integrase สามารถทำงานได้จริง สามารถตัด biotinylated DNA substrate จึงทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับได้ทำให้เกิดสัญญาณช้า และจากการทดสอบว่าสารที่นำมาทดสอบฤทธิ์ในการ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ integrase พบว่า unlabelled competitive LTR สามารถยับยั้งการทำงานของ integrase ได้ดี ในขณะที่สารที่สามารถยับยั้ง integrase ได้ คือ sodium azide (NaN_3) ให้ผลการยับยั้ง integrase ได้ดีกว่า RAL เนื่องจากยา RAL มีการออกแบบให้มีการยับยั้งในกระบวนการ strand transfer ของ เอนไซม์ integrase จากผลการทดสอบทางผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการหาตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real time-PCR

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ชุดทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 โดยเทคนิค immunochromatographic (IC) strip test ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ HIV PR ได้จริงและสามารถตรวจสอบระดับยาต้านยา HIV PR ได้ ชุดทดสอบนี้มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจหายาต้าน PR โดยสามารถตรวจวัดระดับของ LPV ในพลาสมาที่ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 1,000 ng/ml โดยที่ระดับยา LPV ระดับนี้เป็นจุด MEC ของใช้ยา LPV ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี สำหรับชุดทดสอบนี้มีความไว ร้อยละ 100 มีความจำเพาะ ร้อยละ 96.8 มีความแม่นยำ ร้อยละ 97.8 ค่าพยากรณ์บวก คิดเป็นร้อยละ 93 และค่าพยากรณ์ลบ ร้อยละ 100 และมีค่า Kappa coefficient (k) เท่ากับ 0.95 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับหรือมีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับดีมาก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าชุดทดสอบการทำงานของ PR นี้มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในการตรวจหา activity ของเอนไซม์ HIV PR และตรวจหาระดับยาในตัวอย่างพลาสมาผู้ป่วยที่ได้รับยา PI นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำสารสกัดสมุนไพรรักษา ชุดทดสอบนี้สามารถตรวจผลในการยับยั้งการทำงานของ HIV PR ได้อีกด้วย ดังนั้นการทดสอบนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบยาต้านการทำงานของ HIV PR ชนิดอื่นๆ เพื่อทดสอบคุณภาพของยาตัวใหม่ที่ถูกคิดค้นได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการหาสารสกัดจากสมุนไพรรักษาทางยาในการยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ต่างๆ ได้อีกด้วย

ในการพัฒนาชุดตรวจการทำงานของเอนไซม์ integrase โดยเทคนิค real time-PCR สามารถตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ได้จริง ในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยเอชไอวีในประเทศไทย ได้มีการรักษาด้วยยาต้านไวรัสหลายกลุ่ม ซึ่งยาในกลุ่มยาต้านการทำงานของเอนไซม์ integrase จะมีการใช้ในการรักษา second-line ทำให้หาตัวอย่างพลาสมาผู้ป่วยได้ยาก ทางคณะผู้วิจัยยังไม่สามารถนำตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยาต้าน IN มาใช้ในการประเมินชุดทดสอบร่วมกับวิธีมาตรฐานได้ แต่ด้วยข้อจำกัดบางประการของการหาตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยมาใช้ในการทดสอบ ยังติดปัญหาในเรื่องของการเป็นเจ้าของสิทธิ์ในตัวอย่างของบริษัทฯ ซึ่งถ้ามีการแก้ไขในส่วนนี้ได้ จะทำให้สามารถดำเนินการในการทำวิจัยได้ และสามารถพัฒนาจนสามารถนำไปใช้ในการตรวจติดตามระดับยาต้านการทำงานของเอนไซม์ HIV integrase ได้จริง ซึ่งทางผู้วิจัยคาดการณ์ว่าจะสร้างความร่วมมือกับหน่วยงานหรือโรงพยาบาลต่างๆ ในการขอความอนุเคราะห์ในนำตัวอย่างพลาสมาผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับยาต้าน integrase มาใช้ในการทดสอบในอนาคต

ในปัจจุบันยาต้านไวรัสเพื่อกำจัดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ HIV ภายหลังจากเข้าสู่ร่างกายแล้ว มีอยู่มากมายหลายชนิด ซึ่งยาต้านไวรัสที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ประกอบด้วยยาต้านไวรัสที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยซึ่งจะมีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยแต่ละชนิดทำหน้าที่ในการขัดขวางกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสในแต่ละขั้นตอนที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการตรวจติดตามระดับยาต้านไวรัสจะการใช้การตรวจประเมินที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นถ้าสามารถพัฒนาชุดทดสอบยาต้านกลุ่มต่างๆ ได้ก็จะสามารถทำให้การตรวจติดตามการ

กินยาต้านไวรัสอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอทำให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดการดื้อยา ช่วยทำให้ผู้ป่วยมีสุขภาพที่ดีขึ้น ซึ่งทางผู้วิจัยได้มีได้มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการทำงานของเชื้อเอชไอวีมาก่อนหน้านี้ ทางผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาชุดทดสอบยาต้านไวรัสในกลุ่ม protease inhibitor และ integrase inhibitor สำหรับการพัฒนาชุดทดสอบในกลุ่มยาประเภท NRTI ทางผู้วิจัยก็มีแนวคิดที่จะพัฒนาในอนาคต สำหรับชุดทดสอบยาในกลุ่ม NNRTI ทางคณะผู้วิจัยได้มีการพัฒนาไปก่อนหน้านี้แล้ว โดยการพัฒนาชุดทดสอบ strip test สำหรับตรวจหาระดับยาต้านการทำงานของเชื้อไวรัสเอชไอวี ได้แก่ การใช้เทคนิค competitive immunochromatic (IC) strip test ในการตรวจประเมินหายาด้านไวรัส Nevirapine (NVP) ในผู้ป่วยที่ได้รับยา ทางคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดทดสอบดังกล่าวแล้ว (11,12) ซึ่งชุดทดสอบดังกล่าวนี้สามารถตรวจประเมินระดับยาเนวีราพินได้เพียงตัวยาเดียว ไม่สามารถตรวจระดับยาตัวอื่นๆ ในกลุ่ม NNRTI ได้ในชุดทดสอบเดียวกัน ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้มีแนวความคิดที่จะพัฒนาชุดทดสอบที่สามารถตรวจสอบยาต้านไวรัสได้หลากหลายโดยไม่ต้องเปลี่ยนชุดทดสอบ และยังสามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อเอชไอวีอีกด้วย ซึ่งการพัฒนาชุดทดสอบนี้จะสามารถใช้เป็นโมเดลที่นำไปสู่การพัฒนาชุดทดสอบยาต้านไวรัสในกลุ่มอื่นๆ ได้ง่าย สามารถพัฒนาชุดทดสอบที่จำเพาะกับยาในกลุ่มนั้นๆ ได้ และสามารถตรวจยาต้านไวรัสได้หลากหลายในชุดทดสอบที่จำเพาะกับกลุ่มยานั้นๆ ที่สามารถนำไปใช้ได้จริง

การพัฒนาวิธีการใหม่สำหรับตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส และอินทิเกรสของเอชไอวี1 เป็นการพัฒนาชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพ ใช้งานง่าย ลดใช้สารเคมีที่อันตราย ตรวจสอบยาต้าน protease และ integrase ได้หลายชนิดโดยไม่ต้องเปลี่ยนชุดทดสอบ ซึ่งชุดทดสอบทั้งสองนอกจากจะตรวจได้ว่าในตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านไวรัสมีระดับยาอยู่ในระดับที่ใช้ในการรักษาหรือไม่ (drug adherence) และยังสามารถตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ protease และ integrase ได้ง่ายอีกด้วย ในปัจจุบันพบว่าในการให้ยาสำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทยมีการนำยาต้านการทำงานของ HIV protease และ integrase มาใช้ในการรักษา ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาเทคนิคใหม่ที่สามารถนำไปใช้เพื่อใช้ในการตรวจติดตามการได้รับยาต้านไวรัสอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ ที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้ในสถานที่ต่างๆ ได้ง่าย และค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบไม่สูง

การพัฒนาชุดทดสอบเพื่อตรวจการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ integrase ซึ่งเป็นอีกเป้าหมายหนึ่งที่จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ HIV ได้ แต่ยังไม่มีการศึกษากันมาก ปัจจุบันประเทศไทย พบว่ายาในกลุ่มนี้ถูกนำเข้าไปใช้ในการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาชุดทดสอบดังกล่าวขึ้นมาเพื่อที่จะได้ใช้เป็นแนวทางอีกรูปแบบหนึ่งในการพัฒนาเทคนิคที่มีความใหม่ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคตได้ แต่เนื่องจากในปัจจุบันในการทดสอบยาในกลุ่ม integrase ยังคงติดปัญหาเรื่องของยา และตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยที่มีน้อย และตัวอย่างพลาสมาบางส่วนยังคงติดในเรื่องของสัญญาภัณฑ์กับบริษัทฯ ซึ่งเป็นอุปสรรค

ในนำตัวอย่างมาใช้ในการทดสอบ ซึ่งถ้ามีการแก้ไขปัญหในส่วนนี้ได้จะทำการการพัฒนาชุดทดสอบนี้สามารถพัฒนาและนำมาใช้ได้จริง

ทางผู้วิจัยมีความคาดหวังจะพัฒนาชุดทดสอบที่สามารถตรวจการทำงานของเชื้อไวรัสเอชไอวี และตรวจระดับยาต้านไวรัสในกลุ่มต่างๆ ให้ครอบคลุม ในอนาคตถ้ามีความร่วมมือวิจัยในการมหาวิทยาลัย หน่วยงานต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ ที่มีความพร้อมในเรื่องต่างๆ อาทิเช่น ยา สารสกัดต่างๆ สมุนไพร หรือตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านไวรัสที่จะนำมาทดสอบ จะนำไปสู่การพัฒนาชุดทดสอบที่หลากหลาย จนสามารถพัฒนาเพื่อนำไปใช้งานได้จริง เพื่อช่วยลดต้นทุนในการตรวจติดตามระดับยาในผู้ป่วย ลดการนำเข้าชุดทดสอบและเทคโนโลยีจากต่างประเทศ และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสเอชไอวีได้อีกด้วย

ประโยชน์ที่ได้รับ

สามารถพัฒนาชุดตรวจสอบ protease activity และ integrase activity อย่างง่ายที่สามารถนำมาใช้ได้ สะดวก รวดเร็ว (high throughput assay) และราคาถูก เพื่อทดสอบคุณภาพของยาตัวใหม่ที่ถูกคิดค้นได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการหาสารสกัดจากสมุนไพรที่ฤทธิ์ทางยาในการยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัสเอชไอวี สายพันธุ์ต่างๆ ได้และได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ถูกคิดค้นพัฒนาโดยคนไทยที่สามารถพัฒนาผลงานวิจัยที่ได้ไปขยายผลเชิงพาณิชย์อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศที่มีราคาแพง อีกทั้งยังสามารถสร้างความร่วมมือกับหน่วยงานต่างๆ ทั้งภายในประเทศและต่างประเทศเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีนี้อีกด้วย

แนวทางในการประยุกต์ใช้ผลงานวิจัยเพื่อต่อยอด

ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมาในครั้งนี้เป็นชุดทดสอบที่ใช้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว สามารถนำมาใช้ในงานวิจัยพื้นฐานได้ เพื่อใช้ทดสอบหาสารสกัดหรือยาชนิดใหม่ และสามารถต่อยอดพัฒนาเป็นยาที่สามารถนำไปใช้งานได้จริงในอนาคต นวัตกรรม หรือองค์ความรู้ที่สร้างขึ้นนี้จะสามารถนำไปใช้ในการคัดกรองผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่รับยาต้านการทำงานของ HIV PR ทดสอบระดับของยาที่รักษาได้หรือไม่ มีการดื้อยาหรือไม่ และทดสอบประสิทธิภาพของยาที่มีพัฒนาขึ้นมาใหม่เพื่อใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของยา และสามารถพัฒนาเชิงพาณิชย์เพื่อเป็นชุดทดสอบที่ใช้ทั้งในและต่างประเทศ เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจต่อไป และลดการนำเข้าชุดทดสอบต่างประเทศ

แนวทางการพัฒนาและการใช้ประโยชน์จากโครงการวิจัย พัฒนา และวิศวกรรม

ชุดทดสอบสำหรับตรวจหาแอนติบอดีของเอนไซม์โปรตีเอส และอินทิเกรสของเชื้อเอชไอวี-1 เป็นชุดทดสอบที่มีความใหม่ของเทคโนโลยี เป็นชุดทดสอบที่ราคาไม่แพง ลดการใช้สารเคมีในการทดสอบ สามารถใช้ทดสอบเพื่อตรวจหา แอนติบอดีของเอนไซม์ protease และ integrase ของเชื้อเอชไอวีได้ และยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจ

ติดตามการกินยาต้านไวรัสอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ โดยตรวจติดตามระดับยาต้านไวรัส protease และ integrase ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งสามารถตรวจติดตามระดับยาต้านไวรัสในกลุ่ม protease inhibitor และ integrase inhibitor ได้หลากหลายชนิดโดยไม่ต้องเปลี่ยนชุดทดสอบ นอกจากนี้ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบระดับความไวต่อ protease inhibitor หลากหลายชนิด ของ HIV-PR และการตรวจสอบระดับความไวต่อ integrase inhibitor หลากหลายชนิด ของ HIV-IN จากผู้ป่วยที่เกิดการดื้อยาก่อนการให้ยาสูตรใหม่ เพื่อคัดเลือกยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาครั้งต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบอุตสาหกรรมยา เพื่อใช้เป็นวิธีคัดกรอง protease inhibitor หรือตรวจคัดเลือกสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านการทำงานของเชื้อไวรัสเอชไอวี ที่มีประสิทธิภาพที่ทำได้ง่ายในปริมาณมาก ซึ่งวิธีนี้สามารถทำให้ช่วยการคัดเลือกทำได้เร็ว สะดวก และผลิต protease inhibitor ใหม่ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพในระบบอุตสาหกรรมยา

เอกสารอ้างอิง

1. Katz, R.A. and A.M. Skalka, *The retroviral enzymes*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 133-73.
2. Vink, C. and R.H. Plasterk, *The human immunodeficiency virus integrase protein*. Trends Genet, 1993. **9**(12): p. 433-8.
3. Kohl, N.E., et al., *Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4686-90.
4. Evering, T.H. and M. Markowitz, *Raltegravir: an integrase inhibitor for HIV-1*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(3): p. 413-22.
5. Grant, P. and A. Zolopa, *Integrase inhibitors: a clinical review of raltegravir and elvitegravir*. J HIV Ther, 2008. **13**(2): p. 36-9.
6. Palella, F.J., Jr., et al., *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators*. N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 853-60.
7. Cavert, W., et al., *Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection*. Science, 1997. **276**(5314): p. 960-4.
8. Marchand, C., et al., *HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives*. Curr Top Med Chem, 2009. **9**(11): p. 1016-37.
9. Mo, H., et al., *Identification and structural characterization of I84C and I84A mutations that are associated with high-level resistance to human immunodeficiency virus protease inhibitors and impair viral replication*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(2): p. 732-5.
10. Passaes, C.P., et al., *Monitoring the emergence of resistance mutations in patients infected with HIV-1 under salvage therapy with raltegravir in Rio de Janeiro, Brazil: A follow-up study*.

- J Med Virol, 2012. **84**(12): p. 1869-75.
11. Cressey, T.R., et al., *Immunochromatographic strip test for rapid detection of nevirapine in plasma samples from human immunodeficiency virus-infected patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(9): p. 3361-3.
 12. Pattarawarapan, M., et al., *Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS*. Talanta, 2007. **71**(1): p. 462-70.
 13. Robb, M.L., et al., *Risk behaviour and time as covariates for efficacy of the HIV vaccine regimen ALVAC-HIV (vCP1521) and AIDSVAX B/E: a post-hoc analysis of the Thai phase 3 efficacy trial RV 144*. Lancet Infect Dis. **12**(7): p. 531-7.
 14. Sakkhachornphop, S., et al., *Zinc Finger Protein Designed to Target 2-Long Terminal Repeat Junctions Interferes with Human Immunodeficiency Virus Integration*. Hum Gene Ther, 2012.
 15. Nangola, S., et al., *Antiviral activity of recombinant ankyrin targeted to the capsid domain of HIV-1 Gag polyprotein*. Retrovirology, 2012**9**: p. 17.
 16. Cheenpracha, S., et al., *Anti-HIV-1 protease activity of compounds from Boesenbergia pandurata*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(6): p. 1710-4.
 17. Tewtrakul, S., S. Subhadhirasakul, and P. Rattanasuwan, *HIV-1 protease inhibitory effects of some selected plants in Caesalpiniaceae and Papilionaceae families*. Songklanakarin J.Sci Technol., 2003. **25**: p. 4.
 18. Mazumder, A., et al., *Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin*. Biochem Pharmacol, 1995. **18**(49 (8)): p. 1165-70

19. Kabashima, T., et al., *A selective fluorescence reaction for peptides and chromatographic analysis*. Peptides, 2008. **29**(3): p. 356-63.
20. Kitidee, K., et al., *A drug discovery platform: A simplified immunoassay for analyzing HIV protease activity*. J Virol Methods, 2012. **186**(1-2): p. 21-29.
21. Marchand, C., et al., *Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by beta-diketo acids*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12596-603.
22. Craigie, R., et al., *A rapid in vitro assay for HIV DNA integration*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(10): p. 2729-34.
23. Hawkins, M.E., et al., *Incorporation of a fluorescent guanosine analog into oligonucleotides and its application to a real time assay for the HIV-1 integrase 3'-processing reaction*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(15): p. 2872-80.
24. Hazuda, D.J., et al., *A novel assay for the DNA strand-transfer reaction of HIV-1 integrase*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(6): p. 1121-2.
25. John, S., T.M. Fletcher, 3rd, and C.B. Jonsson, *Development and application of a high-throughput screening assay for HIV-1 integrase enzyme activities*. J Biomol Screen, 2005. **10**(6): p. 606-14.
26. Han, Y.S., et al., *A high-throughput assay for HIV-1 integrase 3'-processing activity using time-resolved fluorescence*. J Virol Methods. **184**(1-2): p. 34-40.
27. O'Doherty, U., et al., *A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration*. J Virol, 2002. **76**(21): p. 10942-50.
28. Kitidee, K., et al., *Baculovirus display of single chain antibody (scFv) using a novel signal*

peptide. BMC Biotechnol. **10**: p. 80.

29. Kitidee, K., et al., Expedient screening for HIV-1 protease inhibitors using a simplified immunochromatographic assay. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2015; pii: S1570-0232(15) 30222-1.
30. Sakkhachornphop, S., Thongkum, W, andTayapiwatana, C, Novel 3'-Processing Integrase Activity Assay by Real-Time PCR for Screening and Identification of HIV-1 Integrase Inhibitors. BioMed Research International. 2015; 2015.
31. Cohen J.A. *Coefficient of agreement for nominal scales*. EDuc Pschot Meas,1960. 20: 37-46.
32. Landis JR and Koch GG. *The Measurement of observer agreement for cataegorical data*. Biometric a, 1977. : 33:159-174.
33. Sungkanuparph, S., et al., *Thai national guidelines for antiretroviral therapy in HIV-1 infected adults and adolescents 2010*. Asian Biomed, 2010. 4(4): p515-528.

ภาคผนวก

หัวหน้ากลุ่มวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ชัชชัย ตะยาภิวัดนา
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Chatchai Tayapiwatana
3. วันเดือนปีเกิด 21 มีนาคม 2509
4. สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพ
5. สถานภาพการสมรส โสด
6. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์
7. ที่อยู่หน่วยงาน แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้/ เบอร์โทรศัพท์มือถือ 053 945080 ต่อ14/081 8845141
9. ประวัติการศึกษา
 - วท. บ. (เทคนิคการแพทย์) จาก มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2531
 - วท. ม. (จุลชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2534
 - วท. ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2544
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities
 - 2531 ตำแหน่งอาจารย์
ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - 2539 ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์
ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - 2549-2556 ตำแหน่งรองศาสตราจารย์
ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - 2557-ปัจจุบัน ตำแหน่งศาสตราจารย์
ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ
 - ระดับชาติ
 1. พ.ศ. 2534 รางวัลคะแนนยอดเยี่ยมระดับปริญญาโท จากมูลนิธิ แถบ นีลานิติ
 2. พ.ศ. 2543 รางวัลเสนอผลงานวิจัยดีเด่นระดับปริญญาเอก จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
 3. พ.ศ. 2545 1 ใน 15 ผลงานวิจัยยอดเยี่ยมประจำปี 2545 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

4. พ.ศ. 2547 รางวัลนักวิจัยรุ่นใหม่ดีเด่น จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
5. พ.ศ. 2549 รางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ จากสมาคมโรคภูมิแพ้ โรคหืด และวิทยาภูมิคุ้มกันแห่งประเทศไทย
6. พ.ศ. 2550 รางวัลศิษย์เก่าดีเด่น ด้านวิชาการ จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
7. พ.ศ. 2550 รางวัลอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทดีมาก จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
8. พ.ศ. 2552 ได้รับคัดเลือกเป็นผู้มีผลงานวิจัยเด่นของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
9. พ.ศ. 2554 รางวัลอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอกดีมาก จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
10. พ.ศ. 2554 รางวัลคณาจารย์ดีเด่นโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกดีเด่น จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
11. พ.ศ. 2558 รางวัล Outstanding research of the Year จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
12. พ.ศ. 2558 รางวัล Impact Factor สูงสุดของสาขาวิชา จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
13. พ.ศ. 2558 รางวัลผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2558 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
14. พ.ศ. 2559 รางวัลผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2558 จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
15. พ.ศ. 2559 รางวัลศิษย์เก่าดีเด่นบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปี 2558 จากสมาคมศิษย์เก่าบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

ระดับนานาชาติ

1. Traveling Assistance Award in 2003 for 12th International Congress of Immunology at Montreal, Canada from Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania.
 2. AAI Junior Faculty Award in 2006 for The Annual Meeting of AAI 2006 at Boston, USA from The American Association of Immunologists.
12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร (ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)

สิทธิบัตร

ต่างประเทศ

1. Method for large scale protein production of recombinant DNA-derived tPA of K2S molecules: Patent No. US 6,955,910 B2. Assigned by Boehringer Ingelheim International GmbH.
2. Method for large scale protein production in prokaryotes: Patent No. 02/40696 A3. Assigned by Boehringer Ingelheim International GmbH.

ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1. Sirisinha S, Chawengkirtikul R, Tayapiwatana C et al. Specific and cross-reactive monoclonal antibodies to the 89-kDa of *Opisthorchis viverrini*. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1992; 23:489-90.
2. Tayapiwatana C*. and Poonpipat P. Characterization of monoclonal antibodies recognizing alpha and beta subunits of human chorionic gonadotropin hormone. Asian Pac J Allergy Immunol. 1998; 16:127-135.
3. Tayapiwatana C*. and Tung R. Combined immunoprecipitation and agglutination for the detection of the heterodimeric molecule: human chorionic gonadotropin as a study model. Asian Pac J Allergy Immunol. 1999; 17:301-6.
4. Manosroi J., Tayapiwatana C., Götz F., Werner R.G. and Manosroi A. Secretion of active recombinant human tissue plasminogen activator derivatives in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2001; 67:2657-64.
5. Manosroi J., Tayapiwatana C*., Götz F., Werner R.G. and Manosroi A. Lektinase a secreted t-PA derivative from *Escherichia coli*. Arzneimittelforschung 2002; 52:60-66.
6. The ISOBM TD-7 workshop on hCG and related molecules. Tumor Biology 2002; 23:1-38.
7. Tayapiwatana C*, Kasinrer W. Construction and characterization of phage-displayed leukocyte surface molecule, CD99. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 60:336-41.
8. Tayapiwatana C*, Arooncharus P, Kasinrer W. Displaying and epitope mapping of CD147 on VCSM13 phages: influence of *Escherichia coli* strains. J Immunol Methods 2003; 281:177-85.
9. Intasai N, Arooncharus P, Kasinrer W and Tayapiwatana C*. Construction of high-density display of CD147 ectodomain on VCSM13 phage via gpVIII: effects of temperature, IPTG, and helper phage infection-period. Protein Expr Purif 2003; 32:323-31.
10. Boonmuen S, Tayapiwatana C, Kasinrer W. Comparison of polyclonal anti CD147 antibody production using DNA based and phage-displayed CD147 immunizations. ScienceAsia 2005; 31:83-6.
11. Pattarawarapan M, Nangola S and Tayapiwatana C*. Establishment of competitive ELISA for the detection of chloramphenicol. Chiang Mai J Sci 2006; 33:85-94.
12. Thammawong P, Kasinrer W, Turner RJ and Tayapiwatana C*. Twin-arginine signal peptide attributes effective display of CD147 to filamentous phage. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 69:697-703.
13. Intasai N, Kasinrer W, Mai S and Tayapiwatana C*. Binding of multivalent CD147 phage induces apoptosis of U937 cells. Int Immunol 2006; 18:1159-69.

14. Tayapiwatana C, Chotpadiwetkul R and Kasinrerak W. A novel approach of using streptavidin magnetic bead sorting in vivo biotinylated survivin for monoclonal antibody production. *J Immunol Methods* 2006, 317: 1-11.
15. Pattarawarapan M, Nangola S, Cressey T and Tayapiwatana C*. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of Nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS. *TALANTA* 2007, 71: 462-70.
16. Cressey TR, Nangola S, Tawon Y, Pattarawarapan M, Lallemand M and Tayapiwatana C*. Immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine in plasma samples of HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51: 3361-63.
17. Tragoolpua K, Intasai N, Kasinrerak W, Mai S, Yuan Y and Tayapiwatana C*. Generation of functional scFv intrabody to abate the expression of CD147 surface molecule of 293A cells. *BMC Biotech.* 2008, 29; 8:5.
18. Cressey R, Pimpa S, Chewaskulyong B, Lertprasertsuke N, Saeteng S, Tayapiwatana C and Kasinrerak W. Simplified approaches for the development of an ELISA to detect circulating autoantibodies to p53 in cancer patients. *BMC Biotech.* 2008, 20; 8:16.
19. Pattarawarapan M, Komkham S, Kareuhanon W and Tayapiwatana C. Synthesis of nicotinamide-imprinted polymers and their binding performances in organic and aqueous media. *e-Polymers* 2008, no. 091.
20. Mengumpun K, Tayapiwatana C and Hamilton RG, Sangsupawanich P and Witisuwannakul R. Hydrophobic allergens from the bottom fraction membrane of *Hevea brasiliensis*. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2008, 26: 129-36.
21. Intasai N, Tragoolpua K, Pingmuang P, Khunkaewla P, Moonsom S, Kasinrerak W, Lieber A and Tayapiwatana C*. Potent inhibition of OKT3-induced T cell proliferation and suppression of CD147 cell surface expression in HeLa cells by scFv-M6-1B9. *Immunobiology* 2009, 214; 410-21.
22. Khamta Y, Pattarawarapan M, Nangola S and Tayapiwatana C*. Development of immunochromatographic assay for the on-site detection of salbutamol. *J Immunoassay Immunochem.* 2009, 30; 441-56.
23. Tayapiwatana C, Kuntaruk S, Tatu T, Chiampanichayakul C, Munkongdee T, Winichagoon P, Fuchareon S and Kasinrerak W. Simple method for screening of α -thalassaemia 1 carriers. *Int J Hematology.* 2009, 89; 559-67.
24. Butr-indr B, Kasinrerak W and Tayapiwatana C*. Sequential simplex optimization of recombinant biotinylated survivin production by *Escherichia coli* using mineral supplementation. *Biochem Eng J.* 2009, 46; 115-20.

25. Pata S, Tayapiwatana C and Kasinrerak W. Three different immunogen preparation strategies for production of CD4 monoclonal antibodies. *Hybridoma (Larchmt)*. 2009, 28; 159-65.
26. Sakkhachornphop S, Jiranusornkul S, Kodchakorn K, Nangola S, Sirisanthana T and Tayapiwatana C*. Designed zinc finger protein interacting with the HIV-1 integrase recognition sequence at 2-LTR-circle junctions. *Prot Sci*. 2009, 18; 2219-30.
27. Kareuhanon W, Lee VS, Nimmanpipug P, Tayapiwatana C and Pattarawarapan M. Synthesis of Molecularly imprinted polymers for Nevirapine using dummy template imprinting approach. *Chromatographia* 2009. 70; 1531-37.
28. Lee VS, Tue-ngeun P, Nangola S, Kitidee K, Jitonnorn J, Nimmanpipug P, Jiranusornkul S and Tayapiwatana C*. Pairwise decomposition of residue interaction energies of single chain Fv with HIV-1 p17 epitope variants. *Mol Imm*. 2010, 47; 982-90.
29. Moonsom S, Tayapiwatana C, Wongkham S, Kongtawelert P and Kasinrerak W. A Competitive ELISA for quantifying serum CD147: reduction of soluble CD147 levels in cancer patient sera. *Hybridoma (Larchmt)*. 2010, 29; 45-52.
30. Singboottra P, Pata S, Tayapiwatana C, Kasinrerak W. Method for analysis of surface molecule alteration upon phagocytosis by flow cytometry. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2010, 28; 170-6.
31. Laummaunwai P, Wongkham C, Lulitanond V, Tayapiwatana C and Maleewong W. *Gnathostoma spinigerum*: molecular cloning, expression and characterization of the cyclophilin protein. *Exp Parasitol*. 2010, 126; 611-6.
32. Nangola S, Minard P, Tayapiwatana C*. Appraisal of translocation pathways for displaying ankyrin repeat protein on phage particles. *Protein Expr Purif*. 2010, 74; 156-61.
33. Kitidee K, Nangola S, Gonzalez G, Boulanger P, Tayapiwatana C*. and Hong SS. Baculovirus display of single chain antibody (scFv) using a novel signal peptide. *BMC Biotech* 2010, 10:80.
34. Auephanwiriyaikul S, Sumonphan E, Theera-Umporn N, Tayapiwatana C. Automatic Nevirapine concentration interpretation system using support vector regression. *Comput Methods Programs Biomed*. 2011, 101; 271-81.
35. Wanapirak C, Piyamongkol W, Sirichotiyakul S, Tayapiwatana C, Kasinrerak W, Tongsong T. Accuracy of immunochromatographic strip test in diagnosis of alpha-thalassemia-1 carrier. *J Med Assoc Thai*. 2011, 94; 761-5.
36. Shoombuatong W, Traisathit P, Prasitwattanaseree S, Tayapiwatana C, Cutler R and Chaijaruwanich J. Prediction of the disulfide bonding state of cysteines in proteins using conditional random fields. *Int J Data Min Bioinform*. 2011, 5; 449 – 64.

37. Nimmanpipug P, Khampa C, Lee VS, Nangola S, Tayapiwatana C*. Identification of amino acid residues of a designed ankyrin repeat protein potentially involved in intermolecular interactions with CD4: analysis by molecular dynamics simulations. J. Mol. Graphics Modell. 2011, 31; 65-75.
38. Nangola S, Urvoas A, Valerio-Lepiniec M, Khamaikawin W, Sakkhachornphop S, Hong SS, Boulanger P, Minard P, Tayapiwatana C*. Antiviral activity of recombinant ankyrin targeted to the capsid domain of HIV-1 Gag polyprotein. Retrovirology 2012, 9;17.
39. Sakkhachornphop S, Barbas CF III, Keawwicht R, Wongworapat K, Tayapiwatana C*. Zinc finger protein designed to target 2-LTR junctions interferes with HIV integration. Hum Gene Ther. 2012, 9; 932-42.
40. Kitidee K, Nangola S, Hadpech S, Laopajon W, Kasinrerker W, Tayapiwatana C*. A drug discovery platform: a simplified immunoassay for analyzing HIV protease activity. J Virol Methods. 2012. 186; 21-9.
41. Wisitponchai, T., Nimmanpipug, P., Lee, V.S., Tayapiwatana C. MATLAB process for validating amino acids on CD4 involving in DARPin binding site from ZDOCK molecular docking database (2013) Chiang Mai Journal of Science, 40 (2), pp. 232-239.
42. Janwan, P., Intapan, P.M., Yamasaki, H., Laummaunwai, P., Sawanyawisuth, K., Wongkham, C., Tayapiwatana, C., Kitkhuandee, A., Lulitanond, V., Nawa, Y., Maleewong, W. Application of Recombinant Gnathostoma spinigerum Matrix Metalloproteinase-Like Protein for Serodiagnosis of Human Gnathostomiasis by Immunoblotting. (2013) American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 89 (1), pp. 63-67.
43. Janwan, P., Intapan, P.M., Yamasaki, H., Laummaunwai, P., Sawanyawisuth, K.,
44. Wongkham, C., Tayapiwatana, C., Kitkhuandee, A., Lulitanond, V., Nawa, Y., Maleewong, W. A recombinant matrix metalloproteinase protein from gnathostoma spinigerum for serodiagnosis of neurognathostomiasis (2013) Korean Journal of Parasitology, 51 (6), pp. 751-754.
44. Tue-Ngeun, P., Kodchakorn, K., Nimmanpipug, P., Lawan, N., Nangola, S., Tayapiwatana, C., Rahman, N.A., Zain, S.M., Lee, V.S. Improved SCFV ANTI-HIV-1 P17 binding affinity guided from the theoretical calculation of pairwise decomposition energies and Computational Alanine Scanning. (2013) BioMed Research International, 2013, art. no. 713585 .

45. Phunpae, P., Chanwong, S., Tayapiwatana, C., Apiratmateekul, N., Makeudom, A., Kasinrer, W. Rapid diagnosis of tuberculosis by identification of Antigen 85 in mycobacterial culture system. (2014) *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78 (3), pp. 242-248.
46. Nangola, S., Thongkum, W., Saoin, S., Ansari, A.A., Tayapiwatana, C. An application of capsid-specific artificial ankyrin repeat protein produced in *E. coli* for immunochromatographic assay as a surrogate for antibody. (2014) *Applied Microbiology and Biotechnology*.
47. Sangboonruang, S., Thammasit, P., Intasai, N., Kasinrer, W., Tayapiwatana, C., Tragoolpua, K. EMMPRIN reduction via scFv-M6-1B9 intrabody affects $\alpha 3 \beta 1$ -integrin and MCT1 functions and results in suppression of progressive phenotype in the colorectal cancer cell line Caco-2. (2014) *Cancer Gene Therapy*,
48. Praditwongwan W, Chuankhayan P, Saoin S, Wisitponchai T, Lee VS, Nangola S, Hong SS, Minard P, Boulanger P, Chen CJ and Tayapiwatana C. Crystal structure of an antiviral ankyrin targeting the HIV-1 capsid and molecular modeling of the ankyrin-capsid complex. *J COMPUT AID MOL DES* (2014).
49. Panich, T., Mangchak, P., Pata, S., Tragoolpua, K., Tayapiwatana, C., Intasai, N., CD 147 scFv intrabody-mediated CD147 knockdown inhibits proliferation of human cervical cancer HeLa cells. *Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences*. 2014; 47 (1): 30.
50. Saenseeha, S., Janwan, P., Yamasaki, H., Laummaunwai, P., Tayapiwatana, C., Kitkhuandee, A., Maleewong, W., Intapan, P.M., A dot-ELISA test using a *Gnathostoma spinigerum* recombinant matrix metalloproteinase protein for the serodiagnosis of human gnathostomiasis. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2014; 45 (5): 990-6.
51. Kodchakorn, K., Dokmaisrijan, S., Chong, W.L., Payaka, A., Wisitponchai, T., Nimmanpipug, P., Zain, P.M., Rahman, N.A., Tayapiwatana, C., Lee, V.S., GPU Accelerated Molecular Dynamics Simulations for Protein-Protein Interaction of Ankyrin Complex. *Integrated Ferroelectrics*. 2014; 156 (1): 137-46.
52. Tue-Ngeun, P., Nimmanpipug, P., Lawan, N., Nangola, S., Tayapiwatana, C., Lee, V.S., Identification of Important Residues by Computational Alanine Scanning Analysis of Interaction Mechanisms of scFv Anti-p17 Complexes Based on Molecular Dynamics Simulations. *Integrated Ferroelectrics*. 2014; 156 (1): 36-44.
53. Karim, H.A.A., Tayapiwatana, C., Nimmanpipug, P., Zain, S.M., Rahman, N.A., Lee, V.S., Peptide docking of HIV-1 p24 with single chain fragment variable (scFv) by CDOCKER algorithm. *ICFAS 2014*, 2014; 1621: 98-102.

54. Gautam, V., Chong, W.L., Wisitponchai, T., Nimmanpipug, P., Zain, S.M., Rahman, N.A., Tayapiwatana, C., Lee, V.S., GPU-enabled molecular dynamics simulations of ankyrin kinase complex. ICFAS 2014, 2014; 1621: 112-5.
55. Thammasit, P., Sangboonruang, S., Suwanpairaj, S., Khamaikawin, W., Intasai, N., Kasinrer, W., Tayapiwatana, C., Tragoolpua, K., Intracellular Acidosis Promotes Mitochondrial Apoptosis Pathway: Role of EMMPRIN Down-regulation via Specific Single-chain Fv Intrabody. *Journal of Cancer*. 2015; 6 (3): 276.
56. Intachai, K., Singboottra, P., Leksawasdi, N., Kasinrer, W., Tayapiwatana, C., Butr-Indr, B., Enhanced Production of Functional Extracellular Single Chain Variable Fragment Against HIV-1 Matrix Protein from *Escherichia coli* by Sequential Simplex Optimization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2015; 45 (1): 56-68.
57. Chong, W.L., Zain, S.M., Othman, R., Othman, S.B., Nimmanpipug, P., Tayapiwatana, C., Lee V.S., Exploration of Residue Binding Energy of Potential Ankyrin for Dengue Virus II from MD Simulations. ICCST-3. 2015.
58. Karim H.A.A., Tayapiwatana, C., Nimmanpipug, P., Zain, S.M., Rahman, N.A., Lee V.S., Molecular Dynamics Simulation on Designed Antibodies of HIV-1 Capsid Protein (p24). ICCST-3. 2015.
59. Paopang, P., Kasinrer, W., Tayapiwatana, C., Seesuriyachan, P., Butr-Indr, B., Multi-Parameter Optimization Method and Enhanced Production of Secreted Recombinant Single Chain Variable Fragment against the HIV-1 P17 Protein From *Escherichia coli* by Fed-Batch Fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2015.
60. Winichagoon, P., Kumpan, P., Holmes, P., Finlayson, J., Newbound, C., Kabral, A., Li, B., Nuinoon, M., Fawcett, T., Tayapiwatana, C., Kasinrer, W., Fucharoen, S., Validation of the immunochromatographic strip for α -thalassemia screening: A multicenter study. *Translational Research*. 2015; 165 (6): 689-95.
61. Intasai, N., Pata, S., Tragoolpua, K., Tayapiwatana, C., Recombinant Multivalent EMMPRIN Extracellular Domain Induces U937 Human Leukemia Cell Apoptosis by Downregulation of Monocarboxylate Transporter 1 and Activation of Procaspase-9. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015; 176: 1781-90.
62. Sakkhachornphop, S., Thongkum, W., Tayapiwatana, C., Novel 3'-Processing Integrase Activity Assay by Real-Time PCR for Screening and Identification of HIV-1 Integrase Inhibitors. *BioMed Research International*. 2015; 2015.
63. Khamaikawin, W., Saoin, S., Nangola, S., Chupradit, K., Sakkhachornphop, S., Hadpech, S., Onlamoon, N., Ansari, A.A., Byrareddy, S.N., Boulanger, P., Hong, S.S., Torbett, B.E., Tayapiwatana, C., Combined antiviral therapy using designed molecular scaffolds

targeting two distinct viral functions, HIV-1 genome integration and capsid assembly. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2015; 4, e249.

64. Kitidee, K., Khamaikawin, W., Thongkum, W., Tawon, Y., Cressey, T.R., Jevprasesphant, R., Kasinrerk, W., Tayapiwatana, C., Expedient screening for HIV-1 protease inhibitors using a simplified immunochromatographic assay. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2015; pii: S1570-0232(15)30222-1.

13. ทุนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณ ต่อปี/ ระยะเวลา โครงการ	ผลงานที่ได้รับโดยสังเขป	โปรตรอบู เปอร์เซ็นต์และ เนื้อหาที่คล้ายกับ ข้อเสนอโครงการ ทุนนี้ (ถ้ามี)
1	การวิจัยและพัฒนา และจัดการองค์ ความรู้ทางวิทยา ภูมิคุ้มกันและ เทคโนโลยีชีวภาพ ระดับโมเลกุลเพื่อ การพัฒนาชุดตรวจ วินิจฉัยและรักษา โรค (มัย 2552- มัย 2557)	สำนักงาน พัฒนา วิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยี แห่งชาติ (สวทช.)	3,750,000 / 5 ปี	- พัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการ ผลิต recombinant protein และแอนติบอดี -พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรค -ศึกษาระบบการควบคุมการ ทำงานของเม็ดเลือดขาว	5%
2	การพัฒนาองค์ ความรู้เพื่อผนวก วิธีการทางอิมมูโน วิทยาและการ รักษาระดับยีนส์ สำหรับรักษาผู้ติด เชื้อเอชไอวีใน รูปแบบใหม่ที่ ประเทศไทยเป็น เจ้าของสิทธิ์ (ตค 2553-ตค 2556)	สำนักงาน คณะกรรมการ การการ อุดมศึกษา แห่งชาติ (สกอ.)	22,300,000 บาท / 3 ปี	สร้าง specific molecule จาก antibody, ankyrin และ zinc finger scaffolds ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะ ต่อโมเลกุลเป้าหมายที่ เกี่ยวข้องกับ life cycle ของ HIV	5%
3	การพัฒนาวิธีการ ใหม่เพื่อรบกวน กระบวนการ	สำนักงาน กองทุน สนับสนุนการ	1,500,000 บาท / 3 ปี	สร้างและศึกษาคุณสมบัติ ระดับโมเลกุลของ ankyrin ที่ สามารถยับยั้งกระบวนการ	5%

	ประกอบอนุภาค และกระบวนการ สร้างไวรัสเอชไอวี ที่สมบูรณ์ด้วย โปรตีนแองไครนรี พีท (มีย 2554-มีย 2557)	วิจัย (สกว.)		ประกอบอนุภาคของ HIV	
4	ทุน CPMO	สำนักงาน พัฒนา วิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยี แห่งชาติ (สวทช.)	1,900,000/1 ปี	ทำการทดสอบความปลอดภัย ในการใช้โปรตีนซิงค์ฟิงเกอร์ และโปรตีนแองไครนสำหรับ ยับยั้งในเซลล์ต้นกำเนิด	-
5	ทุนจากสำนักงาน คณะกรรมการ วิจัยแห่งชาติ (วช.)	สำนักงาน คณะกรรมการ วิจัยแห่งชาติ (วช.)	940,000	ได้วิธีการนำส่งยีนที่ซิงค์ฟิง เกอร์ และแองไครนที่มีฤทธิ์ ในการต่อต้านเชื้อ HIV-1 เข้า ไปในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด และได้วิธีการที่เหมาะสมใน การทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ด เลือดเจริญไปเป็นเซลล์เม็ด เลือดขาวชนิด macrophage และเซลล์ยังสามารถผลิต โปรตีนทั้งสองชนิดนี้ได้ เพื่อให้ขัดขวางการแบ่งตัว ของเชื้อ HIV-1	-

14. ทุนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน
ไม่มี

ประวัติเต็มของคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ศาสตราจารย์ (เชี่ยวชาญพิเศษ). ดร. วชระ กสินฤกษ์
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Prof. Dr. Watchara Kasinrerk
3. วันเดือนปีเกิด 6 พฤศจิกายน 2501
4. สถานที่เกิด จังหวัดแพร่
5. สถานภาพการสมรส สมรส
6. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้อำนวยการ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวการแพทย์
7. ที่อยู่หน่วยงาน ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวการแพทย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้/ เบอร์โทรศัพท์มือถือ 053 945070 /081 9607856
9. ประวัติการศึกษา

วท. บ. (เทคนิคการแพทย์)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2524
วท. ม. (จุลชีววิทยา)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2528
Dr. rer. nat.	จาก Universitat fur Bodenkultur Wien ประเทศออสเตรีย ปี พ.ศ. 2535
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities

2528	ตำแหน่งอาจารย์ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2536	ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2539	ตำแหน่งรองศาสตราจารย์ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2549-ปัจจุบัน	ตำแหน่งศาสตราจารย์ ระดับ 10 ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ
 1. รางวัลวิทยานิพนธ์ยอดเยี่ยม ปี 2535 (1992 Dissertation Prize) จาก Austrian Society of Allergology and Immunology ประเทศออสเตรีย
 2. รางวัลนักวิจัยเมธีวิจัย สกว. ที่มีผลงานยอดเยี่ยม ปี 2539 (1996 Outstanding Research Achievements for TRF scholar) จาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

3. รางวัลพัฒนาวิชาชีพนักวิจัย (Career Development award) ปี 2539 จาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)
4. รางวัลอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ดีเด่นประจำปี 2541 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. รางวัลศิษย์เก่าดีเด่น สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2542
6. รางวัลทะกุกิ ประเภทนักวิจัยดีเด่น ประจำปี 2542 (Taguchi Prize for Outstanding Research Achievements Award 1999) จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย
7. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้รับ รางวัลทะกุกิ ประเภทวิทยานิพนธ์ดีเด่น ประจำปี 2543 (Taguchi Prize for Outstanding Thesis Award 2000) จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย
8. รางวัลสภานักวิจัยแห่งชาติ ประเภทรางวัลผลงานวิจัย ระดับชมเชย ประจำปี 2546
9. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้รับรางวัลโปสเตอร์ดีเด่น ในงานมหิดล ปี 2546 จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
10. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้รับรางวัลโปสเตอร์ชมเชย ในงานมหิดล ปี 2546 จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
11. รางวัลอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาเอก ดีเด่น ประจำปี 2547 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
12. รางวัล Thailand Toray Science Foundation: Science and Technology Award ประเภทกลุ่มวิจัย ประจำปี 2005 จาก Thailand Toray Science Foundation ประเทศไทย
13. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้รับรางวัล Winner of the third awards of poster presentation ปี 2547 จาก ASEN Conference in Medical Laboratory Technology
14. ผลงานเด่นไบโอเทค จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
15. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิจัยด้วยโปสเตอร์ ระดับดี การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ประจำปี 2549 ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
16. รางวัล ผลงานวิจัยเด่น ปี 2549 ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.)
17. รางวัลอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาโท ดีเด่น ประจำปี 2549 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
18. รางวัลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ “ช้างทองคำ” อาจารย์ดีเด่น ประจำปี 2549 จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
19. รางวัล มหาวิทยาลัยมหิดล-ปีบราวน ปี 2550 จากมหาวิทยาลัยมหิดล (ผู้ร่วมวิจัย)
20. รางวัลนวัตกรรมแห่งชาติ 2550 รางวัลชมเชย ด้านเศรษฐกิจ ชุมน้ำยาตรวจนับเม็ดเลือดขาว CD4 ลิโมไฟไซต์ จากสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (สนช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
21. รางวัลนักศึกษาเก่ามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดีเด่น ปี 2550 สาขานักวิชาการ จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
22. รางวัลนักวิทยาศาสตร์ดีเด่น ประจำปี 2551 จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์

23. ได้รับคัดเลือกเป็นเมธีส่งเสริมนวัตกรรม ประจำปี 2552 (Innovation Ambassador 2009) จากสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ
 24. รางวัลบุคคลดีเด่นของชาติ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2552 จากสำนักงานเสริมสร้างเอกลักษณ์ของชาติ
 25. รางวัลนักเทคนิคการแพทย์ดีเด่น ประจำปี 2554 จากสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
 26. ได้รับพระราชทานเหรียญดุษฎีมาลา เข็มศิลปวิทยา ประจำปี 2554
12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร (ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)

สิทธิบัตร

ประเทศไทย

1. เรื่อง ชุดน้ำยาตรวจนับ CD4 positive lymphocytes ในเลือดชนิด 3 สีที่ใช้กับเครื่องโฟลไมเตอร์ (นายวัชร กสิณฤกษ์) ไซโต
2. เรื่อง เชื้อไวรัสแดงที่ดัดแปลงสายพันธุ์ MBU 01-2002 (นางพูนสุข กีฬาแปง / นายนพพร สิทธิสมบัติ/ นายวัชร กสิณฤกษ์/ นายปรีดา มาลาสิทธิ์)
3. เรื่อง โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ Na, K, ATPase β 3 subunit กดการตอบสนองของที และ บีลิมโฟไซต์ (นายวัชร กสิณฤกษ์ / นางสาวสาวิตรี เจียมพานิชกุล)
4. เรื่อง การใช้โปรตีนเอ็นเอส 1 และ เทอร์มินัลคอมพลีเมนต์คอมเพล็กซ์ ร่วมกันในการตรวจหาการติดเชื้อโรคไขเลือดออกและพยากรณ์การเกิดโรคไขเลือดออกชนิดรุนแรง (นางสาวปนิษฐา อภิรุทธนันท์/ นายปรีดา มาลาสิทธิ์/ นายสุจิต บุนยรัตน์/ นายวัชร กสิณฤกษ์/ / นางสาวชญญา พุทธิพันธ์)
5. เรื่อง กรรมวิธีการผลิตชุดน้ำยาตรวจนับจำนวน CD4 positive lymphocytes ในเลือดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ และชุดน้ำยาดังกล่าว และการใช้ชุดน้ำยาดังกล่าว (นายวัชร กสิณฤกษ์ / นายธีระ ศิริสุนทร / นายกิตติพงศ์ รุ่งเรืองชนะกิจ)
6. เรื่อง กรรมวิธีการตรวจกรองผู้ป่วยพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย โดยชุดตรวจแบบแถบ immunochromatographic (นายวัชร กสิณฤกษ์, นายชัชชัย ตะยาภิวัฒนา, นายธนศักดิ์ ตาตุ, นางสาวสาวิตรี เจียมพานิชกุล, นายสุทัศน์ พุเจริญ)
7. เรื่อง กรรมวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่กำหนดไอโซไซปที่ต้องการ (วัชร กสิณฤกษ์ และนภาพร อภิรัตน์เมธีกุล)

ต่างประเทศ

1. Three-color reagent for measurement of CD4 positive lymphocytes by flow cytometry. (วัชร กสิณฤกษ์)(ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2. Process of screening for alpha-thalassemia carrier using immunochromatographic strip test (วัชร กสิณฤกษ์, ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา, ธนศักดิ์ ตาตุ, สาวิตรี เจียมพานิชกุล, สุทัศน์ พุเจริญ) (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. Determination of risk of developing dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome, method and compositions thereof (Panisadee Avrutnen, Preda Malasit, Suchartt Bhakdl Punyaratabhandu, Watchara Kasinrer, Chunya Puttikhunt) (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

อนุสิทธิบัตร

1. กรรมวิธีการตรวจหาไวรัสเด็งกี่ที่สามารถแยกซีโรทัยป์ได้ทันทีโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เฉพาะต่อโปรตีนเอ็นเอส 1 (นางสาวชญญา พุทธิจันทร์, นายปรีดา มาลาสิทธิ์, นายวัชร กสิณฤกษ์, น.ส.ธนพรณ พร้อมมูล)

ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1. Makonkawkeyoon S, Kasinrer W, Vithayasai V. Regulation of immuno-globulin secretion by T lymphocyte in human malaria. Asian Pacific J Allerg Immunol. 1986; 4:13-17.
2. Makonkawkeyoon S, Hirunpetcharat C, Kasinrer W, Vithayasai V. Enumeration of interleukin 2-producing cells from rat spleen. Asian Pacific J Allerg Immunol. 1987; 5: 129-136.
3. Hirunpetcharat C, Kasinrer W, Makonkawkeyoon S. Agar plating technique for enumeration of IL-2 producing cells in human peripheral blood mononuclear leukocytes. Asian Pacific J Allerg Immunol. 1988; 16: 81-87.
4. Kasinrer W, Hirunpetcharat C, Makonkawkeyoon S. Optimal conditions for human interleukin 2 production. J Med Tech Assoc Thailand 1988; 16: 103-106.
5. Kasinrer W, Ammatto C. Modified complement fixation test for quantitation of immunoglobulin G in serum. J Med Tech Assoc Thailand 1989; 17: 67-70.
6. Kasinrer W, Stockinger H, Knap W. Analysis of the myeloid antibody panel with COS7 transfectants expressing the antigen ICAM or CD43. Tissue antigens 1989; 33:233 (abstract).
7. Makonkawkeyoon S, Kasinrer W. Separation of human suppressor and helper T cells by Concanavalin A-coated sheep erythrocytes. Asian Pacific J Allerg Immunol. 1989; 7: 125-131.
8. Makonkawkeyoon S, Kasinrer W. In vitro suppression of interleukin 2 production by *Mycobacterium leprae* antigen. Clin Exp Immunol. 1989; 76: 398-403.
9. Stockinger H, Ashmun RA, Dougherty G, Franklin WA, Goyert SM, Hogarth M, Humphries K, Jose DG, Kasinrer W, Lansdorp PM, Lock AT, Pilkington G, Seed B, Tesio L, Williere G.

- Summary of the myeloid workshop transfectoma studies. In: Leukocyte typing IV. Eds. W. Knapp et.al. Oxford University Press, Oxford, 1989: 880-886.
10. Makonkawkeyoon S, Kasinrer W, Dettrairat S, Vithayasai V. Immunologic defects in leprosy patients I. Evidence of immune aberration of suppressor-T lymphocyte in lepromatous leprosy. *Int J Lepr.* 1990; 58:302-310.
 11. Makonkawkeyoon S, Kasinrer W, Supajatura V, Hirunpetcharat C, Vithayasai V. Immunologic defects in leprosy patients II. Interleukin 1, interleukin 2, and interferon production in leprosy patients. *Int J Lepr.* 1990; 58:311-318.
 12. Gadd SJ, Majdic O, Kasinrer W, Stockinger H, Maurer D, Eher R, Knapp W. M5, a phosphoinositol linked myelomonocytic activation associated antigen. *Clin Exp Immunol.* 1990; 80:252-256.
 13. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrer W, Strass B, Schnabl E, Knapp W. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol.* 1990; 145:3889-3897.
 14. Kasinrer W. Transfection of gene into eukaryotic cells by DEAE-Dextran transfection. *J Med Tech Assoc Thailand* 1990; 18:105-108.
 15. Hirunpetcharat C, Maneekarn N, Kasinrer W, Supajatura V, Praputpittaya K, Makonkawkeyoon S. Enumeration of interleukin-1 producing monocytes from human peripheral blood mononuclear leukocytes by agar plating technique. *J Immunol Methods* 1991; 140:173-180.
 16. Kasinrer W, Fiebinger E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the immunoglobulin superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin and chicken HT7 molecule. *J Immunol.* 1992; 149:847-854.
 17. Kasinrer W, Baumruker T, Majdic O, Knapp W, Stockinger H. CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 1993; 150:579-584.
 18. Kasinrer W, Majdic O, Praputpittaya K, Sittisombut N. Enhancement of lymphocyte proliferative response to PPD by an anti-interleukin-2 receptor antibody (CD25). *Immunology* 1994; 83:33-37.
 19. Kasinrer W. Molecular cloning of cDNA encoding human leukocyte surface antigens by eukaryotic expression system. *J Natl Res Council Thailand* 1995; 27:21-45.
 20. Sittisombut N, Maneekarn N, Kanjanahaluethai A, Kasinrer W, Viputtikul K, Supawadee J. Lack of augmenting effect of interferon- γ on dengue virus multiplication in human peripheral blood monocytes. *J Med Virology* 1995; 45:43-49.

21. Klausner JD., Makonkawkeyoon S, Akarasewi P, Nakata K, Kasinrerker W, Corral L, Dewar RL, Lane C, Freedman VH, Kaplan G. The effect of thalidomide on the pathogenesis of human immunodeficiency virus type I and M. tuberculosis infection. *J Acq Imm Def Syn and Hum Retrovirology* 1996; 11:247-257.
22. Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Piluk Y. Production of Mouse anti-CD4 antibodies by DNA-Based Immunization. *Asian Pacific J. Allerg. Immunol.* 1996; 14:99-105.
23. Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Changtumrourng K. Production of anti-CD4 antibodies in rabbits by DNA Immunization. *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech.* 1997; 5:123-129.
24. Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Intharasut S, Naveewongpanit P. Manual rosetting method for enumerating CD4 positive cells. *J Med Lab Sci.* 1997; 11:9-13.
25. Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Naveewongpanit P. Production of monoclonal antibody to CD4 antigen and development of reagent for CD4+ lymphocyte enumeration. *J Med Assoc Thailand.* 1998; 81:879-892.
26. Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Phunpae P. CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. *Immunology* 1999;96: 184-192.
27. Kasinrerker W, Tokrasinwit N. Inhibition of PHA-induced cell proliferation by polyclonal CD4 antibodies generated by DNA immunization. *Immunol letters* 1999; 67: 237-242.
28. Kasinrerker W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. CD99 monoclonal antibody induces homotypic cell aggregation of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathways. *Immunol letters* 2000; 71:33-41.
29. Moonsom S, Kasinrerker W. Production of anti-CD14 monoclonal antibodies by using CD14 expressing COS cells as immunizing antigen. *Asian Pac J Aller Immunol* 2000; 18: 53-61.
30. Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrerker W. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. *Immunology letters* 2001; 76, 25-31.
31. Khunkeawla P, Moonsom S, Kongtawelert P, Kasinrerker W. Engagement of CD147 molecule induced cell aggregation through the activation of protein kinases and reorganization of the cytoskeleton. *Immunobiology* 2001; 203, 659-669.
32. Kasinrerker W, Moonsom S, Chawansuntati K. Production of Antibodies by Single DNA immunization: Comparison of Various Immunization Routes. *Hybridoma and Hybridomics* 2002; 21, 287-293.
33. Chiampanichayakul S, Kasinrerker W. Molecular Cloning of Leukocyte Surface Molecules by Retrovirus-Mediated Expression Cloning System. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci.* 2002; 35:36-45.

34. Tayapiwatana C, Kasinrer W. Construction and characterization of phage-displayed leukocyte surface molecule, CD99. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002; 60:336-341.
35. Chiampanichayakul S, Szekeres A, Khunkeawla P, Moonsom S, Leksa V, Drbal K, Zlabinger GJ, Stockinger H, Kasinrer W. Engagement of Na, K-ATPase β 3 subunit by a specific monoclonal antibody suppresses T and B lymphocyte activation. *Int Immunol* 2002;14(12):1407-1414.
36. Puttikhunt C, Kasinrer W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moonsom S, Sittisombut N and Malasit P. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods*. 2003;109(1):55-61.
37. Pongnikorn S, Fongmoon D, Kasinrer W, Limtrakul PN. Effect of bitter melon (*Momordica charantia* Linn) on level and function of natural killer cells in cervical cancer patients with radiotherapy. *J Med Assoc Thai*. 2003;86(1):61-68.
38. Kasinrer W. A Flow Cytometric Method for Enumeration of Lymphocyte Sub-Populations in Sample Containing Lysis-Resistant Red Blood Cells. *Immunol letters* 2003;86(3):259-64.
39. Tayapiwatana C, Arooncharus P and Kasinrer W. Displaying and epitope mapping of CD147 on VCSM13 phages: influence of *Escherichia coli* strains. *J Immunol Methods* 2003; 281:177-85.
40. Intasaia N, Arooncharus P, Kasinrer W and Tayapiwatana C. Construction of high density display of CD147 ectodomain on VCSM13 phage via gpVIII: effects of temperature, IPTG and helper phage infection-period. *Prot Express Purification* 2003;32:323-331.
41. Phiwan K, Pata S, Tayapiwatana C, Kasinrer W. Induction of antibodies to two different proteins simultaneously by DNA immunization. *Bull Chaing Mai Assoc Med Sci*. 2003; 36 (1):2-12.
42. Vongchan P, Kasinrer W, Kongtawelert P. Sulfated Chitosan inhibits immunoglobulin production of human peripheral blood mononuclear cells. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci*. 2003; 36 (2):121-128.
43. Vongchan P, Sajomsang W, Kasinrer W, Subyen D, Kongtawelert P. Anticoagulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab shell by semi-heterogeneous conditions. *Sci Asia* 2003; 29: 115-120.
44. Raengsakurach B, Pattanapunyasat K, Kasinrer W. Novel three-color reagent for measurement of CD4 and CD8 positive lymphocytes by flow cytometry. *Chiang Mai Univ. Journal* 2003; 2:165-172.
45. Keelapang P, Sriburi R, Supasa S, Panasa S, Panyadee N, Songjaeng A, Jairangsri A, Puttikhunt C, Kasinrer W, Malasit M, Sittisombut N. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *J Virol*. 2004; 78: 2367-2381.

46. Kritratanasak S, Chiampanichayakul S and Kasinrerker W. Production of IgY anti-mouse IgG antibodies from chicken eggs. *Asian Pacific J Allerg Immunol* 2004; 22: 61-68.
47. Boonmuen S, Tayapiwatana C, Kasinrerker W. Comparison of Polyclonal Anti-CD147 Antibody Production Using DNA Based and Phage-Displayed CD147 Immunizations. *Sci Asia* 2005; 31: 83-86.
48. Punturee K, Wild CP, Kasinrerker W, Vinitketkumnue U. Immunomodulatory activities of *Centella asiatica* and *Rhinacanthus nasutus* extracts. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005;6(3):396-400.
49. Thammawong P, Kasinrerker W, Turner RC and Tayapiwatana C. Twin-arginine signal peptide attributes effective displaying of CD147 on filamentous phage. *Appl Microbiol Biotech* 2006;69(6):697-703.
50. Chiampanichayakul S, Peng-in P, Khunkaewla P and Kasinrerker W. CD147 contains different bioactive epitopes involving the regulation of cell adhesion and lymphocyte activation. *Immunobiology* 2006;211(3):167-78.
51. Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., S., T., Auethavornanan, K., Jairungsri, A., Kanlaya, R., Tangthawornchaikul, N., Puttikhunt, C., Pattanakitsakul, S., Yenchitsomanus, P., Mongkolsapaya, J., Kasinrerker, W., Sittisombut, N., Husmann, M., Blettner, M., Vasanawathana, S., Bhakdi, S. and Malasit, P. Vascular leakage in severe Dengue virus infections: a potential role for the non-structural viral protein NS1 and complement. *Journal of Infectious Disease*. *J Infect Dis*. 2006;193(8):1078-88.
52. Jintaridtha P, Srisomsapb C, Vichittumarosc K, Kalpravidha R, Winichagoon P, Fucharoenc S, Svastib J, Kasinrerker W. Chicken Egg Yolk Antibodies Specific for the Gamma (γ) Chain of Human Hemoglobin for Diagnosis of Thalassemia. *Inter J Hematol*. 2006;83:408-414.
53. Nouanthong P, Pata S, Sirisanthana T, Kasinrerker W. A Simple Manual Rosetting Method for Absolute CD4⁺ Lymphocyte Counting in Resource-Limited Countries. *Clin Vaccine Immunol (Clin Diag Lab Immunol)* 2006; 13(5): 598-601.
54. Intasai N, Mai S, Kasinrerker W and Tayapiwatana C. Binding of phage displaying multimeric CD147 on U937 cell conducts apoptotic signal. *Int J Immunol* 2006; 18: 1159–1169.
55. Tayapiwatana C, Chotpadiwetkul R, Kasinrerker W. A novel approach of using streptavidin magnetic bead sorting in vivo biotinylated survivin for monoclonal antibody production. *J Immunol Methods* 2006;317:1-11.
56. Chiampanichayakul S, Khunkaewla P and Kasinrerker W. Na, K ATPase β 3 subunit (CD298): Association with α subunit and expression on peripheral blood cells. *Tissue Antigens* 2006; 68(6):509-517.

57. Noisakran S, Dechtawewat T, Rinkaewkanb P, Puttikhunt C, Kanjanahaluethai A, Kasinrer W, Sittisombut N, Malasit P. Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. *J Virol Methods* 2007;142(1-2):67-80.
58. Khunkaewla P, Chiampanichayakul S, Yasamut A, Pata S, Kasinrer W. Production, characterization and functional analysis of newly established CD99 monoclonal antibodies, MT99/1 and MT99/2. *Hybridoma*. 2007, 26(4): 241-250.
59. Limjindaporn T, Netsawang J, Noisakran S, Thiemmaca S, Wongwiwat W, Sudsaward S, Avirutnan P, Puttikhunt C, Kasinrer W, Sirburi R, Sittisombut N, Yenchitsomanus P, Malasit P. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by dengue virus capsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 19;362(2):334-339.
60. Moonsom S, Chaisri U, Kasinrer W, Angsuthanasombat C. Binding characteristics to mosquito-larval midgut proteins of the cloned domain II-III fragment from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *J Biochem Mol Biol*. 2007; 30;40(5):783-790.
61. Puttikhunt C, Keelapang P, Khemnu N, Sittisombut N, Kasinrer W, Malasit P. Novel anti-dengue monoclonal antibody recognizing conformational structure of prM-E heterodimeric complex of dengue virus. *J Med Virol*. 2008;80(1):125-33.
62. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrer W, Malasit P, Atkinson JP, Diamond MS. Secreted Non-Structural Protein NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *PLoS Pathog*. 2007; 3(11): 1798-1812.
63. Tragoolpua K, Intasai N, Kasinrer W, Mai S, Yuan Y, Tayapiwatana C. Generation of functional scFv intrabody to abate the expression of CD147 surface molecule of 293A cells. *BMC Biotechnol*. 2008 Jan 29;8(1):5 [Epub ahead of print].
64. Srithanaviboonchai K, Rungruengthanakit K, Nouanthong P, Pata S, Sirisanthana T, Kasinrer W. Novel low-cost assay for the monitoring of CD4 counts in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008 1;47(2):135-139.
65. Cressey R, Pimpa S, Chewaskulyong B, Tayapiwatana C and Kasinrer W. Simplified Approaches for Developing a Tumour Antigen Specific ELISA to Detect Circulating Autoantibodies in Cancer Patients. *BMC Biotechnology* 2008 Feb 20;8(1):16.
66. Junjhon J, Lausumpao M, Supasa S, Noisakran S, Songjaeng A, Saraithong P, Chaichoun K, Utaipat U, Keelapang P, Kanjanahaluethai A, Puttikhunt C, Kasinrer W, Malasit P, Sittisombut N. Differential modulation of prM cleavage, extracellular particle distribution and virus infectivity by conserved residues at non-furin consensus positions of dengue virus pr-M junction. *J Virol*. 2008; 82: 10776-10791.

67. Chitov T, Dispan R, Kasinrer W. Incidence and diarrhegenic potential of *Bacillus cereus* in pasteurized milk and cereal products in Thailand. *J Food Safe* 2008;28: 467–481.
- 68.Noisakran S, Dechtawewat T, Avirutnan P, Kinoshita T, Siripanyaphinyo U, Puttikhunt C, Kasinrer W, Malasit P, Sittisombut N. Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *Gen Virol.* 2008;89:2492-500.
- 69.Sangiambut S, Keelapang P, Aaskov J, Puttikhunt C, Kasinrer W, Malasit P, Sittisombut N. Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *J Gen Virol.* 2008;89:1254-1264.
- 70.Noisakran S, Sengsai S, Thongboonkerd V, Kanlaya R, Sinchaikul S, Chen ST, Puttikhunt C, Kasinrer W, Limjindaporn T, Wongwiwat W, Malasit P, Yenchitsomanus PT. Identification of human hnRNP C1/C2 as a dengue virus NS1-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 18;372(1):67-72.
- 71.Limjindaporn T, Wongwiwat W, Noisakran S, Srisawat C, Netsawang J, Puttikhunt C, Kasinrer W, Avirutnan P, Thiemmecca S, Sriburi R, Sittisombut N, Malasit P, Yenchitsomanus PT. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;6;379(2):196-200.
72. Tayapiwatana C, Kuntaruk S, Tatu T, Chiampanichayakul S, Munkongdee T, Winichagoon P, Fuchareon S, Kasinrer W. Simple method for screening of alpha-thalassaemia 1 carriers. *Int J Hematol.* 2009;89(5):559-67.
- 73.Intasai N, Tragoolpua K, Pingmuang P, Khunkaewla P, Moonsom S, Kasinrer W, Lieber A and Tayapiwatana C. Potent inhibition of OKT3-induced T cell proliferation and suppression of CD147 cell surface expression in HeLa cells by scFv-M6-1B9. *Immunobiology* 2009: 214:410-421.
- 74.Pata S, Tayapiwatana C, Kasinrer W. Three different immunogen preparation strategies for production of CD4 monoclonal antibodies. *Hybridoma* 2009;28(3):159-65.
75. Butr-indr B, Kasinrer W, Tayapiwatana C. Sequential simplex optimization of recombinant biotinylated survivin production by *Escherichia coli* using mineral supplementation. *Biochem Eng J.* 2009;46(2):115-120.
76. Puttikhunt C, Ong-Ajchaowlerd P, Prommool T, Sangiambut S, Netsawang J, Limjindaporn T, Malasit P, Kasinrer W. Production and characterization of anti-dengue capsid antibodies suggesting the N terminus region covering the first 20 amino acids of dengue virus capsid protein is predominantly immunogenic in mice. *Arch Virol. Arch Virol.* 2009;154(8):1211-21.
77. Apiratmateekul N, Phunpae P, Kasinrer W. A modified hybridoma technique for production of monoclonal antibodies having desired isotypes. *Cytotechnology.* 2009; 60:45-51.

78. Klinchid J, Chewaskulyoung B, Saeteng S, Lertprasertsuke N, Kasinrerak W, Cressey R. Effect of combined genetic polymorphisms on lung cancer risk in northern Thai women. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009;195(2):143-149.
79. Saosathan S, Chewaskulyoung B, Saeteng Somchareon, Lertprasetsuke N, Kasinrerak W, Cressey R. Expression and production of auto-antibodies to livin and survivin. *J. Med. Tech. Assoc. Thailand.* 2009, 37: 3013-3025.
80. Netsawang J, Noisakran S, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Wongwiwat W, Malasit P, Yenichitsomanus PT, Limjindaporn T. Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res.* 2010; 147:275-283.
81. Kuntaruk S, Tatu T, Keowkarnkah T, Kasinrerak W. Sandwich ELISA for hemoglobin A(2) quantification and identification of beta-thalassemia carriers. *Int J Hematol.* 2010; 91:219–228.
82. Moonsom S, Tayapiwatana C, Wongkham S, Kongtawelert P, Kasinrerak W. A Competitive ELISA for Quantifying Serum CD147: Reduction of Soluble CD147 Levels in Cancer Patient Sera. *Hybridoma (Larchmt).* 2010; 29(1):45-52.
83. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, Keelapang P, Puttikhunt C, Perera R, Chipman PR, Kasinrerak W, Malasit P, Kuhn RJ, Sittisombut N. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *J Virol.* 2010; 84(16): 8353-8358.
84. Charentantanakul W, Kasinrerak W. Interleukin-10 antisense oligode-oxynucleotide suppresses IL-10 expression and effects on pro-inflammatory cytokine responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 2010; 23(4):425-435.
85. Chiampanichayakul S, Anuchapreeda S, Chruewkamlow N, Mahasongkram K, Thanaratanakorn P, Kasinrerak W. Production of monoclonal antibodies to P-glycoprotein: Its application in detection of soluble and surface P-glycoprotein of leukemia patients. *Int. J. Hematol.* 2010;92(2):326-332.
86. Singboottra P, Pata S, Tayapiwatana C, Kasinrerak W. Method for analysis of surface molecule alteration upon phagocytosis by flow cytometry. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2010;28(2-3):170-6.
87. Hongsibsong S, Prapamontol T, Suphavilai C, Wipasa J, Pattarawarapan M, Kasinrerak W. Production of monoclonal antibody to acaricide dicofol and its derivatives. *Hybridoma (Larchmt).* 2010;29(6):495-500.
88. Pimpha N, Chaleawlert-umpon S, Chruewkamlow N, and Kasinrerak W. Preparation of Anti-CD4 monoclonal antibody-conjugated Magnetic Poly (glycidyl methacrylate) Particles and their Application on CD4+ Lymphocyte Separation. *Talanta* 2011;84(1):89-97.

89. Morchang A, Yasamut U, Netsawang J, Noisakran S, Wongwiwat W, Songprakhon P, Srisawat C, Puttikhunt C, Kasinrer W, Malasit P, Yenchitsomanus P, Limjindaporn T. Cell Death Gene Expression Profile: Role of RIPK2 1 in Dengue Virus-Mediated Apoptosis. *Virus Research* 2011;156(1-2):25-34.
90. Puttikhunt C, Prommool T, Ong-ajchaolerd P, U-thainuan N, Yoosook K, Taweelert C, Duangchinda T, Jairangsri A, Malasit P, Kasinrer W. The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus. *J Clin Virol.* 2011; 50: 314-319.
91. Nagila A, Netsawang J, Srisawat C, Noisakran S, Morchang A, Yasamut U, Puttikhunt C, Kasinrer W, Malasit P, Yenchitsomanus PT, Limjindaporn T. Role of CD137 signaling in dengue virus-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 8: 410(3):428-33.
92. Pata S, Otáhal P, Brdika T, Laopajon W, Mahasongkram K, Kasinrer W. Association of CD99 short and long forms with MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 and recruitment into immunological synapses. *BMC Res Notes.* 2011;4(1):293. [Epub ahead of print]
93. Tatu T, Kasinrer W. A novel test tube method of screening for hemoglobin E. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(1):59-64.
94. langcharoen P, Punfa W, Yodkeeree S, Kasinrer W, Ampasavate C, Anuchapreeda S, Limtrakul P. Anti-P-glycoprotein conjugated nanoparticles for targeting drug delivery in cancer treatment. *P Arch Pharm Res.* 2011; 34(10):1679-89.
95. Charemtantanakul W, Kasinrer W. Plasmids expressing interleukin-10 short hairpin RNA mediate IL-10 knockdown and enhance tumor necrosis factor alpha and interferon gamma expressions in response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;146(2):159-68.
96. Tatu T, Kiewkarnkha T, Khuntarak S, Khamrin S, Suwannasin S, Kasinrer W. Screening for co-existence of α -thalassemia in β -thalassemia and in HbE heterozygotes via an enzyme-linked immunosorbent assay for Hb Bart's and embryonic ζ -globin chain. *Int J Hematol.* 2012;95(4):386-93.
97. Apiratmateekul N, Pata S, Chiampanichayakul S, Kasinrer W. Non-mitogen containing conditioned medium for hybridoma production and single cell cloning. *Asian Pac J All Immunol.* 2012; 30(2):114-122.
98. Wintachai P, Wikan N, Kuadkitkan A, Jaimipuk T, Ubol S, Pulmanasahakul R, Auewarakul P, Kasinrer W, Weng WY, Panyasrivaniit M, Paemanee A, Kittisenachai S, Roytrakul S, Smith DR. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. *J Med Virol.* 2012;84(11):1757-70.
99. Brian B and Kasinrer W. Reduction of CD147 surface expression on primary T cells leads to enhanced cell proliferation. *Asian Pac J All Immunol.* 2012 (in press).

100. Kitidee K, Nangola S, Hadpech S, Laopajon W, Kasinrer W, Tayapiwatana C. A drug discovery platform: A simplified immunoassay for analyzing HIV protease activity. J Virol Methods. 2012 Jul 27. [Epub ahead of print]
101. Krisanaprakornkit S, Chotjumlong P, Pata S, Chruewkamlow N, Reutrakul V, Kasinrer W. CD99 Ligation Induces Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Secretion in Human Gingival Fibroblasts. Arch Oral Biol. 2012 (in press).
102. Puttikhunt C, Prommool T, Ong-ajchaolerd P, U-thainuan N, Yoosook K, Taweelert C, Duangchinda T, Jairangsri A, Malasit P, Kasinrer W. The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus. J Clin Virol. 2011; 50: 314–319.
103. Nagila A, Netsawang J, Srisawat C, Noisakran S, Morchang A, Yasamut U, Puttikhunt C, Kasinrer W, Malasit P, Yenchitsomanus PT, Limjindaporn T. Role of CD137 signaling in dengue virus-mediated apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2011; 8: 410(3):428-33.
104. Pata S, Otáhal P, Brdika T, Laopajon W, Mahasongkram K, Kasinrer W. Association of CD99 short and long forms with MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 and recruitment into immunological synapses. BMC Res Notes. 2011;4(1):293. [Epub ahead of print]
105. Tatu T, Kasinrer W. A novel test tube method of screening for hemoglobin E. Int J Lab Hematol. 2011 [Epub ahead of print].

13. ทุนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณ ต่อปี/ ระยะเวลา โครงการ	ผลงานที่ได้รับโดยสังเขป	โปรตระกูล เปอร์เซ็นต์และ เนื้อหาที่คล้ายกับ ข้อเสนอโครงการ ทุนนี้ (ถ้ามี)
1	การวิจัยและพัฒนาและจัดการองค์ความรู้ทางวิทยาภูมิคุ้มกันและเทคโนโลยีชีวภาพระดับโมเลกุลเพื่อการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยและรักษาโรค (มัย 2552- มัย 2557)	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)	3,750,000 / 5 ปี	- พัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการผลิต recombinant protein และแอนติบอดี - พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรค - ศึกษากระบวนการควบคุมการทำงานของเม็ดเลือดขาว	ไม่มี

2	การศึกษาผลของ ผลิตภัณฑ์ Operation BIM ต่อการกระตุ้นการ ทำงานของระบบ ภูมิคุ้มกัน	บริษัท เอ เซีย ไฟฟ์โตซูติ คอลส์ จำกัด (มหาชน)	574,000 / 3 ปี	ศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ BIM ต่อ การกระตุ้นการทำงานของ ระบบภูมิคุ้มกันและเซลล์เม็ด เลือดขาวชนิด ที ลิมโฟไซต์	ไม่มี
---	--	--	-------------------	--	-------

14. ทุนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน
ไม่มี

ประวัติเดิมของคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ศาสตราจารย์นายแพทย์ขวัญชัย ศุภรัตน์ภิญโญ
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Prof. Khuanchai Supparatpinyo
3. วันเดือนปีเกิด 5 ก.ค. 2504
4. สถานที่เกิด จ. เชียงใหม่
5. สถานภาพการสมรส สมรส
6. ตำแหน่งปัจจุบัน
 - ศาสตราจารย์สาขาโรคติดเชื้อ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - Principal Investigator ICTU Study สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.
 - Site Leader, CMU ACTG Clinical Research Site, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.
 - รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.
7. ที่อยู่หน่วยงาน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ตู๊ ปณ. 80 ปท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้ 053-945055-8 ต่อ 104 เบอร์โทรศัพท์มือถือ 086-7303300
9. ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตรบัณฑิต (พ.บ.)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ปี พ.ศ. 2528
แพทย์ประจำบ้าน (อายุรศาสตร์)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ปี พ.ศ. 2531
แพทย์ประจำบ้าน (โรคติดเชื้อ)	จาก ศูนย์การแพทย์แห่งชาติญี่ปุ่น	ปี พ.ศ. 2532
บัณฑิตศึกษา (ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อ)	จาก มหาวิทยาลัยจอนส์ฮอปกินส์	ปี พ.ศ. 2534
อาจารย์แลกเปลี่ยน	จาก Ohio State University School of Medicine	ปี พ.ศ. 2536
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities

2551 – ปัจจุบัน	ศาสตราจารย์สาขาโรคติดเชื้อ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	
2545 – ปัจจุบัน	Principal Investigator ICTU Study สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.	
2548 – ปัจจุบัน	Site Leader, CMU ACTG Clinical Research Site, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.	
2552 – ปัจจุบัน	รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.	
11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ

เกียรติคุณอันดับ 1 แพทยศาสตรบัณฑิต	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ปี พ.ศ. 2528
------------------------------------	--------------------------	--------------
12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร (ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)
 1. Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, Uthammachai C, Nelson KE, Sirisanthana T. Penicillium marneffeii infection in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1992 Apr;14(4):871-4.

2. Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, Baosoung V, Uthammachai C, Chaimongkol B, Sirisanthana T. An efficacy study of itraconazole in the treatment of *Penicillium marneffei* infection. *J Med Assoc Thai*. 1992 Dec;75(12):688-91.
3. Supparatpinyo K, Nelson KE, Merz WG, Breslin BJ, Cooper CR Jr, Kamwan C, Sirisanthana T. Response to antifungal therapy by human immunodeficiency virus-infected patients with disseminated *Penicillium marneffei* infections and in vitro susceptibilities of isolates from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Nov;37(11):2407-11.
4. Supparatpinyo K, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffei* infection diagnosed on examination of a peripheral blood smear of a patient with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*. 1994 Feb;18(2):246-7.
5. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in southeast Asia. *Lancet*. 1994 Jul 9;344(8915):110-3.
6. Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Nelson KE. Seasonal variation of disseminated *Penicillium marneffei* infections in northern Thailand: a clue to the reservoir? *J Infect Dis*. 1996 Jun;173(6):1490-3.
7. Vanittanakom N, Mekaprateep M, Sittisombut N, Supparatpinyo K, Kanjanasthiti P, Nelson KE, Sirisanthana T. Western immunoblot analysis of protein antigens of *Penicillium marneffei*. *J Med Vet Mycol*. 1997 Mar-Apr;35(2):123-31.
8. Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Praparattanapan J, Nelson KE. Case-control study of risk factors for *Penicillium marneffei* infection in human immunodeficiency virus-infected patients in northern Thailand. *Clin Infect Dis*. 1997 Jun;24(6):1080-6.
9. Wheat J, Wheat H, Connolly P, Kleiman M, Supparatpinyo K, Nelson K, Bradsher R, Restrepo A. Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clin Infect Dis*. 1997 Jun;24(6):1169-71.
10. Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Perriens J, Nelson KE. Amphotericin B and itraconazole for treatment of disseminated *Penicillium marneffei* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*. 1998 May;26(5):1107-10.
11. Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Epidemiology and management of penicilliosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Int J Infect Dis*. 1998 Jul-Sep;3(1):48-53. Review.

12. Supparatpinyo K, Perriens J, Nelson KE, Sirisanthana T. A controlled trial of itraconazole to prevent relapse of *Penicillium marneffei* infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 1998 Dec10;339(24):1739-43.
13. Ally R, Schürmann D, Kreisel W, Carosi G, Aguirrebengoa K, Dupont B, Hodges M, Troke P, Romero AJ, De Alarcon Gonzales A, Benhamou Y, Bingham JS, Sola Boneta J, De Rienzo B, Dinsmore WW, Fatkenheuer G, Garsia RJ, Fountas D, Gastaut JA, Gritti F, Hawkins DA, Heise W, Jarauratanasirikul S, Johnson DW, Johnson M, Lacoste D, Lawrence RH, Lowenthal R, Madej G, Marriott D, Menichetti F, Moroni M, Mulcahy FM, Narciso P, Raffi F, Reiger MA, Reynes JHR, Rivera IO, Sabballs-Radresa P, Sambeat MA, Santamaria JM, Savchenko VG, Scholte F, Schwegler U, Shahmanesh M, Simjee AE, Stoehr A, Supparatpinyo K, Sze Peng BA, Tansuphaswadikul S, De La Torre Cisneros J, Van Zyl JH, Vetter MN, Whitby M, Winter TA. A randomized, double-blind, double-dummy, multicenter trial of voriconazole and fluconazole in the treatment of esophageal candidiasis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1447-1454.
14. Chariyalertsak S, Supparatpinyo K, Sirisanthana T, Nelson KE. A controlled trial of itraconazole as primary prophylaxis for systemic fungal infections in patients with advanced human immunodeficiency virus infection in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2002 Jan 15;34(2):277-84. Epub 2001 Dec 7.
15. Myoken Y, Sugata T, Mikami Y, Nelson KE, Chariyalertsak S, Supparatpinyo K, Sirisanthana T. Infection due to non-*Aspergillus* fungi in immunocompromised patients receiving itraconazole. *Clin Infect Dis*. 2002;35(4):494-495.
16. Chaiwun B, Khunamornpong S, Sirivanichai C, Rangdaeng S, Supparatpinyo K, Settakorn J, Ya-in C, Thorner P. Lymphadenopathy due to *Penicillium marneffei* infection: diagnosis by fine needle aspiration cytology. *Mod Pathol*. 2002 Sep;15(9):939-43.
17. Wangkaew S, Chaiwarith R, Tharavichitkul P, Supparatpinyo K. *Streptococcus suis* infection: a series of 41 cases from Chiang Mai University Hospital. *J Infect*. 2006 Jun;52(6):455-60. Epub 2006 May 11.
18. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuwan M, Somkaew S. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2006 Sep 1;43(5):569-76. Epub 2006 Jul 13.

19. Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Kiertiburanakul S, Sutthent R, Anekthananon T, Bowonwatanuwong C, Kowadisaiburana B, Supparatpinyo K, Horsakulthai M, Chasombat S, Ruxrungtham K; Study Team. High rate multiple drug resistances in HIV-infected patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor regimens in Thailand, where subtype A/E is predominant. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2006 Dec;5(4):152-6.
20. Chaiwarith R, Charoenyos N, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Discontinuation of secondary prophylaxis against penicilliosis marneffeii in AIDS patients after HAART. *AIDS*. 2007 Jan 30;21(3):365-7.
21. Chaiwarith R, Wachirakaphan C, Kotarathitum W, Praparatanaphan J, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Sensitivity and specificity of using CD4+ measurement and clinical evaluation to determine antiretroviral treatment failure in Thailand. *Int J Infect Dis*. 2007 Sep;11(5):413-6. Epub 2007 Feb 28.
22. Boulware DR, Stauffer WM, Hendel-Paterson BR, Rocha JL, Seet RC, Summer AP, Nield LS, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Walker PF. Maltreatment of Strongyloides infection: case series and worldwide physicians-in-training survey. *Am J Med*. 2007 Jun;120(6):545.e1-8.
23. Kongkaew W, Siriarayaporn P, Leelayoova S, Supparatpinyo K, Areechokchai D, Duang-ngern P, Chanachai K, Sukmee T, Samung Y, Sridurongkathum P. Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007 Jan;38(1):8-12.
24. Supparatpinyo K, Schlamm HT. Voriconazole as therapy for systemic Penicillium marneffeii infections in AIDS patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Aug;77(2):350-3.
25. Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Mootsikapun P, Kiertiburanakul S, Anekthananon T, Bowonwatanuwong C, Kowadisaiburana B, Supparatpinyo K, Ruxrungtham K; Study Team. Efficacy and tolerability of a double boosted protease inhibitor (lopinavir + saquinavir/ritonavir) regimen in HIV-infected patients who failed treatment with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *HIV Med*. 2007 Nov;8(8):529-35.
26. Molina JM, Andrade-Villanueva J, Echevarria J, Chetchotisakd P, Corral J, David N, Moyle G, Mancini M, Percival L, Yang R, Thiry A, McGrath D; CASTLE Study Team. Once-daily atazanavir/ritonavir versus twice-daily lopinavir/ritonavir, each in combination with tenofovir and emtricitabine, for management of antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients: 48 week efficacy and safety results of the CASTLE study. *Lancet*. 2008 Aug 23;372(9639):646-55.
27. Sungkanuparph S, Anekthananon T, Hiransuthikul N, Bowonwatanuwong C, Supparatpinyo K, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Tansuphaswadikul

- S, Buppanharun W, Manosuthi W, Techasathit W, Ratanasuwan W, Tantisiriwat W, Suwanagool S, Leechawengwongs M, Ruxrungtham K; Thai AIDS Society. Guidelines for antiretroviral therapy in HIV-1 infected adults and adolescents: the recommendations of the Thai AIDS Society (TAS) 2008. *J Med Assoc Thai*. 2008 Dec;91(12):1925-35.
28. Chaiwarith R, Pasogpakdee P, Salee P, Kanjanaratanakorn K, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* acquisition in a tertiary care teaching hospital in Thailand. *J Hosp Infect*. 2009 Mar;71(3):285-6. Epub 2009 Jan 20.
29. Pornprasert S, Praparattanapan J, Khamwan C, Pawichai S, Pimsarn P, Samleerat T, Leechanachai P, Supparatpinyo K. Development of TaqMan real-time polymerase chain reaction for the detection and identification of *Penicillium marneffei*. *Mycoses*. 2009 Nov;52(6):487-92. Epub 2009 Jan 9.
30. Pappas PG, Chetchotisakd P, Larsen RA, Manosuthi W, Morris MI, Anekthananon T, Sungkanuparph S, Supparatpinyo K, Nolen TL, Zimmer LO, Kendrick AS, Johnson P, Sobel JD, Filler SG. A phase II randomized trial of amphotericin B alone or combined with fluconazole in the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis*. 2009 Jun 15;48(12):1775-83.
31. Chaiwarith R, Salee P, Kotarathitithum W, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Long-term CD4 cell count recovery among Thai naive HIV-infected patients initiating HAART at low CD4 cell count. *Curr HIV Res*. 2009 May;7(3):340-5.
32. Manosuthi W, Sungkanuparph S, Anekthananon T, Supparatpinyo K, Nolen TL, Zimmer LO, Pappas PG, Larsen RA, Filler SG, Chetchotisakd P; BAMSG 3-01 Study Team. Effect of high-dose fluconazole on QT interval in patients with human immunodeficiency virus (HIV)-associated cryptococcal meningitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Nov;34(5):494-6. Epub 2009 Jun 30.
33. Lennox JL, DeJesus E, Lazzarin A, Pollard RB, Madruga JV, Berger DS, Zhao J, Xu X, Williams-Diaz A, Rodgers AJ, Barnard RJ, Miller MD, DiNubile MJ, Nguyen BY, Leavitt R, Sklar P; STARTMRK investigators. Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naïve patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2009 Sep 5;374(9692):796-806. Epub 2009 Aug 3. Erratum in: *Lancet*. 2009 Dec 19-2010 Jan 1;374(9707):2054. *Lancet*. 2009 Sep 5;374(9692):786.
34. Sungkanuparph S, Filler SG, Chetchotisakd P, Pappas PG, Nolen TL, Manosuthi W, Anekthananon T, Morris MI, Supparatpinyo K, Kopetskie H, Kendrick AS, Johnson PC, Sobel JD, Larsen RA. Cryptococcal immune reconstitution inflammatory syndrome after

antiretroviral therapy in AIDS patients with cryptococcal meningitis: a prospective multicenter study. Clin Infect Dis. 2009 Sep 15;49(6):931-4.

35. Pozniak AL, Morales-Ramirez J, Katabira E, Steyn D, Lupo SH, Santoscoy M, Grinsztejn B, Ruxrungtham K, Rimsky LT, Vanveggel S, Boven K; TMC278-C204 Study Group. Efficacy and safety of TMC278 in antiretroviral-naïve HIV-1 patients: week 96 results of a phase IIb randomized trial. AIDS. 2010 Jan 2;24(1):55-65.

36. Manosuthi W, Chetchotisakd P, Nolen TL, Wallace D, Sungkanuparph S, Anekthananon T, Supparatpinyo K, Pappas PG, Larsen RA, Filler SG, Andes D; BAMSG 3-01 Study Team. Monitoring and impact of fluconazole serum and cerebrospinal fluid concentration in HIV-associated cryptococcal meningitis-infected patients. HIV Med. 2010 Apr;11(4):276-81. Epub 2009 Dec 8.

37. Lennox JL, Dejesus E, Berger DS, Lazzarin A, Pollard RB, Ramalho Madruga JV, Zhao J, Wan H, Gilbert CL, Teppler H, Rodgers AJ, Barnard RJ, Miller MD, Dinubile MJ, Nguyen BY, Leavitt R, Sklar P; STARTMRK Investigators. Raltegravir versus Efavirenz regimens in treatment-naïve HIV-1-infected patients: 96-week efficacy, durability, subgroup, safety, and metabolic analyses. J Acquir Immune Defic Syndr. 2010 Sep 1;55(1):39-48.

38. Malan N, Su J, Mancini M, Yang R, Wirtz V, Absalon J, McGrath D; CASTLE Study Team. Gastrointestinal tolerability and quality of life in antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients: data from the CASTLE study. AIDS Care. 2010 Jun;22(6):677-86.

39. Chaiwarith R, Praparattanapan J, Nuntachit N, Kotarathitithum W, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Impact of the frequency of plasma HIV-1 RNA monitoring on the outcome of antiretroviral therapy. Curr HIV Res. 2011 Mar 1;9(2):82-7.

40. Praparattanapan J, Tragoolpua Y, Pathom-Aree W, Kotarathitithum W, Chaiwarith R, Nuntachit N, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Current Molecular Epidemiology and Recombination of HIV Type 1 Subtypes in Northern Thailand. AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 May 6. [Epub ahead of print]

41. Prasithsirikul W, Hanvanich M, Suwanagool S, Ratanasuwan W, Anekthananon T, Techasathit W, Supparatpinyo K, Viphaagool A. Two-year safety and tolerability study of enfuvirtide use in salvage therapy of Thai HIV-1 experienced cases. J Med Assoc Thai. 2011 Mar;94(3):303-8.

42. Praparattanapana J, Tragoolpua Y, Wongtrakul J, Kotarathitithum W, Chaiwarith R, Nuntachit N, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Comparison of in-house HIV-1 genotypic drug resistant test with commercial HIV-1 genotypic test kit. Asian Biomedicine. 2011 Apr;5(2): 249-255.

43. Chaiwarith R, Jullaket W, Bunchoo M, Nuntachit N, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Streptococcus agalactiae in adults at Chiang Mai University Hospital: a retrospective study. BMC Infect Dis. 2011 May 25;11:149.
44. Molina JM, Cahn P, Grinsztejn B, Lazzarin A, Mills A, Saag M, Supparatpinyo K, Walmsley S, Crauwels H, Rimskey LT, Vanveggel S, Boven K; ECHO study group. Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naïve adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. Lancet. 2011 Jul 16;378(9787):238-46.
45. Robertson K, Kumwenda J, Supparatpinyo K, Jiang JH, Evans S, Campbell TB, Price RW, Murphy R, Hall C, Marra CM, Marcus C, Berzins B, Masih R, Santos B, Silva MT, Kumarasamy N, Walawander A, Nair A, Tripathy S, Kanyama C, Hosseinipour M, Montano S, La Rosa A, Amod F, Sanne I, Firnhaber C, Hakim J, Brouwers P; AIDS Clinical Trials Group. A multinational study of neurological performance in antiretroviral therapy-naïve HIV-1-infected persons in diverse resource-constrained settings. J Neurovirol. 2011 Oct;17(5):438-47.
46. Chaiwarith R, Fakthongyoo A, Praparattanapan J, Boonmee D, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Itraconazole vs fluconazole as a primary prophylaxis for fungal infections in HIV-infected patients in Thailand. Curr HIV Res. 2011 Jul;9(5):334-8.
47. Eron JJ Jr, Rockstroh JK, Reynes J, Andrade-Villanueva J, Ramalho-Madruga JV, Bekker LG, Young B, Katlama C, Gatell-Artigas JM, Arribas JR, Nelson M, Campbell H, Zhao J, Rodgers AJ, Rizk ML, Wenning L, Miller MD, Hazuda D, DiNubile MJ, Leavitt R, Isaacs R, Robertson MN, Sklar P, Nguyen BY; ODMRK Investigators. Raltegravir once daily or twice daily in previously untreated patients with HIV-1: a randomised, active-controlled, phase 3 non-inferiority trial. Lancet Infect Dis. 2011 Dec;11(12):907-15. Epub 2011 Sep 18.
48. Havlir DV, Kendall MA, Ive P, Kumwenda J, Swindells S, Qasba SS, Luetkemeyer AF, Hogg E, Rooney JF, Wu X, Hosseinipour MC, Lalloo U, Veloso VG, Some FF, Kumarasamy N, Padayatchi N, Santos BR, Reid S, Hakim J, Mohapi L, Mugenyi P, Sanchez J, Lama JR, Pape JW, Sanchez A, Asmelash A, Moko E, Sawe F, Andersen J, Sanne I; AIDS Clinical Trials Group Study A5221. Timing of antiretroviral therapy for HIV-1 infection and tuberculosis. N Engl J Med. 2011 Oct 20;365(16):1482-91.
49. Khienprasit N, Chaiwarith R, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Incidence and risk factors of antiretroviral treatment failure in treatment-naïve HIV-infected patients at Chiang Mai University Hospital, Thailand. AIDS Res Ther. 2011 Nov 7;8(1):42.
50. Anekthananon T, Manosuthi W, Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Supparatpinyo K, Ratanasuwan W, Pappas PG, Filler SG, Kopetskie HA, Nolen TL, Kendrick AS, Larsen RA;

BAMSG 3-01 Study Team. Predictors of poor clinical outcome of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients. *Int J STD AIDS*. 2011 Nov;22(11):665-70.

51. Chaiwarith R, Ounbang P, Khamwan C, Nuntachit N, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Epidemiology of adult candidemia at Chiang Mai University Hospital. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011 Nov;42(6):1505-14.

52. Praparattanapan J, Kotarathitithum W, Chaiwarith R, Nuntachit N, Sirisanthana T, Supparatpinyo K, Tragoolpua Y. Impact of HIV-1 viral load on genotypic characteristics among patients failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based first-line regimens in Northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011 Jul;42(4):859-66.

53. Cohen CJ, Molina JM, Cahn P, Clotet B, Fourie J, Grinsztejn B, Wu H, Johnson MA, Saag M, Supparatpinyo K, Crauwels H, Lefebvre E, Rimsky LT, Vanveggel S, Williams P, Boven K; on Behalf of the ECHO and THRIVE Study Groups. Efficacy and Safety of Rilpivirine (TMC278) Versus Efavirenz at 48 Weeks in Treatment-Naïve HIV-1-Infected Patients: Pooled Results From the Phase 3 Double-Blind Randomized ECHO and THRIVE Trials. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 May 1;60(1):33-42.

54. Bartlett JA, Ribaud HJ, Wallis CL, Aga E, Katzenstein DK, Stevens WS, Norton MR, Klingman KL, Hosseinipour MC, Crump JA, Supparatpinyo K, Badal-Faesen S, Kallungal BA, Kumarasamy N. Lopinavir/ritonavir Monotherapy After Virologic Failure of First-line Antiretroviral Therapy in Resource-limited Settings. *AIDS*. 2012 Mar 23. [Epub ahead of print]

13. ทุนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณต่อปี/ ระยะเวลาโครงการ	ผลงานที่ได้รับ โดยสังเขป	โปรตรระบุ เปอร์เซ็นต์และ เนื้อหาที่คล้าย กับข้อเสนอ โครงการทุนนี้ (ถ้ามี)
1	HIV/AIDS Clinical Trials Unit; with 3 CRSs; (A) ACTG CRS, (B) HVTN CRS (C) IMPAACT CRS	NIH/NIAID	03/15/07 – 01/31/14	ศึกษาการให้ยาต้านไวรัสกับผู้ติดเชื้อเอชไอวี	ไม่มี

14. ทุนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน
ไม่มี

ประวัติเต็มของคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ทิมothy เครซี่
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Timothy Cressey
3. วันเดือนปีเกิด 29 มิถุนายน 2518
4. สถานที่เกิด ประเทศอังกฤษ
5. สถานภาพการสมรส สมรส
6. ตำแหน่งปัจจุบัน Research Associate
7. ที่อยู่หน่วยงาน
187/10 ถนนช้างคลาน ตำบลช้างคลาน เชียงใหม่ 50100
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้/ เบอร์โทรศัพท์มือถือ 053-844897, 089-6341672
9. ประวัติการศึกษา
B.Sc. (Medicinal Chemistry), University of Newcastle upon Tyne ปี พ.ศ. 2539
Ph.D. Oncology (Cellular Pharmacology), University of Newcastle upon Tyne ปี พ.ศ. 2542
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities

Positions and Employment

- | | |
|------------------------------|--|
| ธันวาคม 2542 - ธันวาคม 2544 | Senior Research Associate , Novocastra Laboratories, Balliol Business Park, Newcastle upon Tyne, England |
| ธันวาคม 2544 - มิถุนายน 2549 | Post Doctoral Research Fellow , Program for HIV Prevention and Treatment (PHPT), Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Thailand / Department of Immunology and Infectious diseases, Harvard School of Public Health, Harvard University, Boston, USA |
| สิงหาคม 2549 - ปัจจุบัน | Research Associate , Program for HIV Prevention and Treatment (PHPT), Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Thailand / Department of Immunology and Infectious diseases, Harvard School of Public Health, Harvard University, Boston, USA |

Research Activities

- | | |
|-----------------------------|--|
| มิถุนายน 2538 - ตุลาคม 2538 | Erasmus Scheme, Faculty of Pharmacy, Hamburg University, Germany |
| ตุลาคม 2539 - ธันวาคม 2542 | PhD student, Cancer Research Unit, University of Newcastle |

11.เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ. 2537 รางวัล Henry Croucher จาก University of Newcastle ประเทศอังกฤษ

12.ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร
(ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)

1. **Cressey, TR**, Tilby, M.J and Newell, D.R. Comparative effects of DNA damaging drugs on telomerase activity in a testicular cancer cell lines. *Annals of Oncology* 1998, 9, Sup 2, P538
2. **Cressey, TR**, Tilby, M.J and Newell, D.R. Decreased telomerase activity in not a measure of chemosensitivity in testicular cancer cell lines. *European Journal of Cancer* 2002, 38, 4, p586-593
3. **Cressey TR**, Jourdain G, Lallemand M, Kunkeaw S, Jackson JB, Musoke P, Capparelli E, Mirochnick M.
Persistence of Nevirapine Exposure During the Postpartum Period After Intrapartum Single-Dose Nevirapine in Addition to Zidovudine Prophylaxis for the Prevention of Mother-to-Child Transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Mar 1;38(3):283-288. PMID: 15735445
4. **Cressey TR**, Leenasirimakul P, Jourdain G, Tod M, Sukrakanchana PO, Kunkeaw S, Puttimit C, Lallemand M. Low-doses of indinavir boosted with ritonavir in HIV-infected Thai patients: pharmacokinetics, efficacy and tolerability. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jun;55(6):1041-4. PMID: 15883177
5. Chokephaibulkit K, Plipat N, **Cressey TR**, Frederix K, Phongsamart, W, Capparelli, E, Kolladarungkri, T, Vanprapar, N. Pharmacokinetics of nevirapine in HIV-infected children receiving an adult fixed-dose combination of stavudine, lamivudine and nevirapine *AIDS*. 2005 Sept 23 2005;19(14):1495-1499 . PMID: 16135903
6. **Cressey TR**, Leenasirimakul P, Jourdain G, Tawon Y, Sukrakanchana P, Lallemand M. Intensive pharmacokinetics of zidovudine 200 mg twice daily in HIV-1 infected patients less than 60 kg on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Jul;42(3):387-9. PMID: 16810125

7. **Cressey TR** & Lallemand M. Pharmacogenetics of Highly Active Antiretroviral therapy (HAART) for the treatment of HIV-infected patients: An update. *Infection, Genetics and Evolution*. 2007 Mar;7(2):333-42. PMID: 17045554
8. Plipat N, **Cressey TR**, Vanprapar, N Chokephaibulkit K. Efficacy and plasma concentrations of indinavir when boosted with ritonavir in human immunodeficiency virus-infected Thai children. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 Jan;26(1):86-8. PMID: 17195716
9. Pattarawarapan M, Nangola S, **Cressey TR**, Tayapiwatana C. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of Nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS. *TALANTA*. 2007; 71: 460-470.
10. **Cressey TR**, Plipat N, Fregonese F, Chokephaibulkit K. Indinavir/ritonavir remains an important component of HAART for the treatment of HIV/AIDS, particularly in resource-limited settings. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2007 Jun;3(3):347-361. PMID: 17539743
11. **Cressey TR**, Nangola S, Tawon Y, Pattarawarapan M, Lallemand M, Tayapiwatana C. Immunochromatographic strip test for rapid detection of nevirapine in plasma samples from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep;51(9):3361-3. PMID: 17606683; PMCID: PMC2043209
12. Chantarangsu S, **Cressey TR**, Mahasirimongkol S, Tawon Y, Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Lallemand M, Chantratita W. Comparison of the TaqMan and LightCycler systems in evaluation of CYP2B6 516G>T polymorphism. *Mol Cell Probes*. 2007 Oct-Dec;21(5-6):408-11. PMID: 17669622
13. **Cressey TR**, Green H, Khoo S, Treluyer JM, Compagnucci A, Saidi Y, Lallemand M, Gibb DM, Burger DM; Paediatric European Network for Treatment of AIDS II Study Group. Plasma drug concentrations and virologic evaluations after stopping treatment with nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors in HIV type 1-infected children. *Clin Infect Dis*. 2008 May 15;46(10):1601-8. PMID: 18419497
14. **Cressey TR**, Van Dyke R, Jourdain G, Puthanakit T, Roongpisuthipong A, Achalapong J, Yuthavisuthi P, Prommas S, Chotivanich N, Maupin R, Smith E, Shapiro DE, Mirochnick M, and for the IMPAACT P1032 Team. Early postpartum pharmacokinetics (PK) of *lopinavir* (LPV) when initiated intrapartum in Thai women. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53 (5), p. 2189-2191. PMID: 19237646; PMCID: PMC2681511

15. Puthanakit T, Tanpaiboon P, Aupibul L, **Cressey TR**, Sirisanthana V. Plasma efavirenz concentrations and the association with CYP2B6-516G >T polymorphism in HIV-infected Thai children. *Antivir Ther.* 2009;14(3):315-20. PMID: 19474465
16. Chantarangsu S, **Cressey TR**, Mahasirimongkol S, Capparelli E, Tawon Y, Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Lallemand M, Chantratita W. Influence of CYP2B6 polymorphisms on the persistence of plasma nevirapine concentrations following a single intra-partum dose for the prevention of mother to child transmission in HIV-infected Thai women. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Dec;64(6):1265-73. PMID: 19812066; PMCID: PMC2775665
17. **Cressey TR**, Lallemand M. Pharmacogenomics and the prevention of mother-to-child transmission of HIV. *Pharmacogenomics.* 2010 Jan;11(1):1-4. PMID: 20017665
18. Paediatric European Network for Treatment of AIDS. Response to planned treatment interruptions in HIV infection varies across childhood. *AIDS.* 2010 Jan 16;24(2):231-41. PMID: 20010073
19. Lallemand M, Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Traisathit P, **Cressey TR**, Collins IJ, Jarupanich T, Sukhumanant T, Achalapong J, Sabsanong P, Chotivanich N, Winiyakul N, Ariyadej S, Kanjanasing A, Ratanakosol J, Hemvuttiphan J, Kengsakul K, Wannapira W, Sittipiyasakul V, Pornkitprasarn W, Liampongsabuddhi P, McIntosh K, Van Dyke RB, Frenkel LM, Koetsawang S, Le Coeur S, Kanchana S. Efficacy and Safety of 1-Month Postpartum Zidovudine-Didanosine to Prevent HIV-Resistance Mutations after Intrapartum Single-Dose Nevirapine. *Clin Infect Dis.* 2010 Mar 15;50(6):898-908. PMID: 20158398; PMCID: PMC2922986
20. Vanprapar N, **Cressey TR**, Chokephaibulkit K, Muresan P, Plipat N, Sirisanthana V, Prasitsuebsai W, Hongsiwan S, Chotpitayasunondh T, Eksaengsri A, Toye M, Smith ME, McIntosh K, Capparelli E, Yogev R; for the IMPAACT P1056 Team. A Chewable Pediatric Fixed-Dose Combination Tablet of Stavudine, Lamivudine, and Nevirapine: Pharmacokinetics and Safety Compared With the Individual Liquid Formulations in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children in Thailand. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Oct;29(10):940-4. PMID: 20453709; PMCID: 2981099
21. **Cressey TR**, Jourdain G, Rawangban B, Varadisai S, Kongpanichkul R, Sabsanong P, Yuthavisuthi P, Chirayus S, Ngo-Giang-Huong N, Voramongkol N, Pattarakulwanich S, and Lallemand M, for the PHPT-5 Team. Pharmacokinetics and virologic response of zidovudine/lopinavir/ritonavir initiated during the third trimester of pregnancy. *AIDS.* 2010 Sep 10;24(14):2193-200. PMID: 20625263; PMCID: PMC3070207

22. **Cressey TR**, Urien S, Hirt D, Halue G, Techapornroong M, Bowonwatanuwong C, Leenasirimakul P, Treluyer JM, Jourdain G, and Lallemand M for the PHPT-3 Team. Influence of body weight on achieving indinavir concentrations within its therapeutic window in HIV-infected Thai patients receiving indinavir boosted with ritonavir. *Ther Drug Monit. Ther Drug Monit.* 2011 Feb;33(1):25-31. PMID: 21233689; PMCID: PMC3058116
23. **Cressey TR**, Stek A, Capparelli E, Bowonwatanuwong C, Prommas S, Sirivatanapa P, Yuthavisuthi P, Neungton C, Huo Y, Smith E, Best BM, Mirochnick M; for the IMPAACT P1026s team. Efavirenz Pharmacokinetics during the Third Trimester of Pregnancy and Postpartum. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 Mar 1;59(3):245-252, PMID: 22083071; PMCID:PMC3288559
24. Van Dyke RB, Ngo-Giang-Huong N, Shapiro DE, Frenkel L, Britto P, Roongpisuthipong A, Beck IA, Yuthavisuthi P, Prommas S, Puthanakit T, Achalapong J, Chotivanich N, Rasri W, **Cressey TR**, Maupin R, Mirochnick M, Jourdain G; IMPAACT P1032 Protocol Team. A comparison of 3 regimens to prevent nevirapine resistance mutations in HIV-infected pregnant women receiving a single intrapartum dose of nevirapine. *Clin Infect Dis.* 2012 Jan 15;54(2):285-93. PMID: 22144539; PMCID: PMC3245730
25. Prasitsuebsai W, **Cressey TR**, Capparelli E, Vanprapar N, Lapphra K, Chokeyhaibulkit K. Pharmacokinetics of Nevirapine in HIV and Tuberculosis-coinfected Children Receiving Antiretroviral Fixed-dose Combination Tablets While Receiving Rifampicin-containing Tuberculosis Treatment and After Rifampicin Discontinuation. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Apr;31(4):389-91. PMID: 22146740
26. Chokeyhaibulkit K, **Cressey TR**, Capparelli E, Sirisanthana V, Muresan P, Hongsiwon S, Ngampiyaskul C, Limwongse C, Wittawatmongkol O, Aurpibul L, Kabat B, Toye M, Smith ME, Eksaengsri A, McIntosh K, Yogev R; IMPAACT P1069 Team. Pharmacokinetics and safety of a new paediatric fixed-dose combination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in HIV-infected children. *Antivir Ther.* 2011;16(8):1287-95. PMID: 22155910; PMCID:PMC3348490
27. Tremoulet AH, Nikanjam M, **Cressey TR**, Chokeyhaibulkit K, McKinney R, Mirochnick M, Capparelli EV. Developmental Pharmacokinetic Changes of Lamivudine in Infants and Children. *J Clin Pharmacol.* 2011 Dec 16. [Epub ahead of print]; PMID: 22180560; PMCID: PMC3369109
28. Fregonese F, Collins IJ, Jourdain G, Lecoer S, **Cressey TR**, Ngo-Giang-Houng N, Banchongkit S, Chutanunta A, Techapornroong M, Lallemand M; for the Program for HIV Prevention and Treatment (PHPT) study group. Predictors of 5-years mortality in HIV-infected adults starting

highly active antiretroviral therapy (HAART) in Thailand. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 May 1;60(1):91-8. PMID: 22293548

29. Sukasem C, **Cressey TR**, Prapaithong P, Tawon Y, Pasomsub E, Srichunrusami C, Jantararoungtong T, Lalletment M, Chantratita W. Pharmacogenetic Markers of CYP2B6 Associated with Efavirenz Plasma Concentrations in HIV-1 infected Thai Adults. *Br J Clin Pharmacol.* 2012 Apr 4. PMID: 22471906
30. Nikanjam M, Kabamba D, **Cressey TR**, Burger D, Aweeka F, Acosta E, Spector S, and Capparelli E. Nevirapine Exposure with WHO Pediatric Weight Band Dosing - Enhanced Therapeutic Concentrations Predicted Based on Extensive International Pharmacokinetic Experience. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Aug 6. [Epub ahead of print] PMID:22869579; PMCID: PMC3457371
31. Chokeyphaibulkit K, Nuntarukchaikul M, Phongsamart W, Wittawatmongkol O, Lapphra K, Vanprapar N, **Cressey TR**. Once- versus twice-daily lopinavir/ritonavir tablets in virologically suppressed, HIV-infected, treatment-experienced children: comparative pharmacokinetics and virological outcome after switching to once-daily lopinavir/ritonavir. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Aug 23. [Epub ahead of print] PMID: 22923483
32. Buckoreelall K, **Cressey TR**, King JR. Pharmacokinetic optimization of antiretroviral therapy in pregnancy. *Clin Pharmacokinet.* 2012 Oct;51(10):639-59. PMID: 23018528
33. Olagunju A, Owen A, **Cressey TR**. Potential effect of pharmacogenetics on maternal, fetal and infant antiretroviral drug exposure during pregnancy and breastfeeding. *Pharmacogenomics.* 2012 Oct;13(13):1501-22. PMID: 23057550

13. ทุนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณ ต่อปี/ ระยะเวลา โครงการ	ผลงานที่ได้รับโดยสังเขป	โปรตรอบู เปอร์เซ็นต์ และเนื้อหาที่ คล้ายกับ ข้อเสนอ โครงการทุนนี้ (ถ้ามี)
1	Standard zidovudine plus infant nevirapine to prevent perinatal HIV in Thailand (PHPT-5)	NIH NICHD	400,000 US\$/ 5 years	The specific aim of evaluating the efficacy of nevirapine (NVP) given only to infants (two doses, the first immediately after birth and the second 48-72 hours after birth), as compared to NVP given to both mothers and infants (single dose to the mothers, two doses to infants), in addition to the standard intervention of the Thai national prevention of mother-to-child HIV transmission program.	5%
2	Lopinavir/ritonavir + zidovudine to prevent perinatal HIV in Thailand (PHPT-5b)	NIH NICHD	300,000 US\$/ 5 years	The specific aim is to compare, in HIV-infected pregnant women with no antiretroviral treatment indication, the efficacy and the long term maternal and child safety of lopinavir/ritonavir (LPV/r) plus zidovudine (ZDV) from 28 weeks gestation vs. ZDV from 28 weeks gestation plus nevirapine (NVP) given to both mother and infants for the prevention of mother to child transmission of HIV.	5%
3	Program for HIV Prevention and Treatment-Clinical Trial Unit (Units for HIV/AIDS)	NIH NIAID	750,000 US\$/ 7 years	This application is for a cooperative agreement as a CTU in an international network for clinical trials in children, adolescents, and pregnant women. It will replace the PACTG International Pilot Initiative grant.	5%

	Clinical Trials Networks)				
--	---------------------------------	--	--	--	--

14. ทุนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน ไม่มี

ประวัติเต็มของคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ญ. ดร.รัชนีกร เจวประเสริฐพันธุ์
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Dr.Rachaneekorn Jevprasesphant
3. วันเดือนปีเกิด 2 ตุลาคม 2520
4. สถานที่เกิด กรุงเทพฯ
5. สถานภาพการสมรส โสด
6. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย 6
7. ที่อยู่หน่วยงาน สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม
75/1 ถนนพระรามที่ 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี
กรุงเทพมหานคร 10400
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้ 02-2038116/ เบอร์โทรศัพท์มือถือ 081-9173371
9. ประวัติการศึกษา
2544 - 2547 PhD-School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,
Pharmaceutics, The University of Manchester, UK.
2537 - 2541 BPharm (1st Class Hons)- Chulalongkorn, University
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities
2542 - ปัจจุบัน นักวิจัย กลุ่มงานวิจัยและพัฒนา สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม
11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ
2547 - Eurand Award for Novel Approaches in Oral Drug Delivery
12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร
(ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)

ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1. Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N. B. D'Emanuele, A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. Int. J. Pharm., 252, 263-266, 2003.
2. Jevprasesphant, R., Penny, J., Attwood, D., McKeown, N. B. D'Emanuele, A. Engineering of dendrimer surface to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity. Pharm. Res., 20, 1543-1550, 2003.
3. Jevprasesphant, R., Penny, J., Attwood, D., D'Emanuele, A. Transport of dendrimer nanocarriers through epithelial cells via the transcellular route. J. Controlled Rel., 97, 259-267, 2004.

4. D'Emanuele, A., Jevprasesphant, R., Penny, J., Attwood, D. The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. J. Controlled Rel., 95, 447-453, 2004
5. Jevprasesphant, R., Cowley, J., Day, N., Penny, J., Attwood, D., D'Emanuele, A. Development of dendrimer carriers for oral drug delivery, Papmakeytkh Pharmakeftiki, Vol 19 (IV), 93-100, 2006.
6. Jevprasesphant, R., Dendrimer as drug delivery 1, R&D Newsletter, 12 (1), 14-19, 2005
7. Jevprasesphant, R., Dendrimer as drug delivery 2, R&D Newsletter, 12 (2), 16-19, 2005
8. Jevprasesphant, R., Eksaengsri, A., Improving the Solubility and Stability of Ritonavir Using Hot Melt Extrusion Technique. International AIDS Conference XVIII., 18-23 July, 2010
9. Jevprasesphant, R., การใช้ยาเพื่อป้องกันการติดเชื้อ HIV/AIDS, R&D Newsletter, 18 (3), 5-9, 2011

อนุสิทธิบัตร

1. Pharmaceutical composition for treatment of virus infection, Pity Patent no. 3651, Filling date 16/10/2006, Inventor: Rachaneekorn Jevprasesphant, Assigned name: Government Pharmaceutical Organization, Thailand
 2. Pharmaceutical composition for treatment of virus infection, Pity Patent no. 4280, Filling date 18/05/2007, Inventor: Rachaneekorn Jevprasesphant, Assigned name: Government Pharmaceutical Organization, Thailand
 3. Pharmaceutical composition for treatment of virus infection, Pity Patent no. 4634, Filling date 18/05/2007, Inventor: Rachaneekorn Jevprasesphant, Assigned name: Government Pharmaceutical Organization, Thailand
 4. Pharmaceutical composition of proton pump inhibitor and anti-inflammatory medicines, Pity Patent no. 4751, Filling date 03/05/2007, Inventor: Rachaneekorn Jevprasesphant, Assigned name: Government Pharmaceutical Organization, Thailand
 5. Pharmaceutical composition for treatment of gastritis, gastric and duodenal ulcer and peptic ulcer, Pity Patent no. 5021, Filling date 23/05/2008, Inventor: Rachaneekorn Jevprasesphant, Assigned name: Government Pharmaceutical Organization, Thailand
-
13. ทุนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่ (ไม่มี)
 14. ทุนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน (ไม่มี)

ประวัติเดิมของคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายศุภชัย ศักดิ์จักรภพ
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Mr. Supachai Sakkhachornphop
3. วันเดือนปีเกิด 12 กรกฎาคม 2518
4. สถานที่เกิด จ. สุพรรณบุรี
5. สถานภาพการสมรส สมรส
6. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
7. ที่อยู่หน่วยงาน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 ตู้ ปณ. 80 ปท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50210
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้ 053-945055-7 Ext. 202 เบอร์โทรศัพท์มือถือ 081-9521472
9. ประวัติการศึกษา

วท. บ. (เทคนิคการแพทย์)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2540
วท. ม. (วิทยาศาสตร์สุขภาพ)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2549
วท. ด. (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2555
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities

2542	ผู้ช่วยนักวิจัย	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2555	นักวิจัย	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ

2555	Winner of MSD Investigator Awards by Allergy, Asthma, and Immunology Association of Thailand
2555	รางวัลวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอกดีมาก จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร
 (ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)

1. **Sakkhachornphop S**, Jiranusornkul, Kodchakorn K, Nangola S, Sirisanthana T, and Tayapiwatana C. Designed Zinc Finger Protein Interacting with the HIV-1 Integrase Recognition Sequence at 2-LTR-Circle Junctions. Protein Sci. 2009 Nov; 18(11):2219-30. **Impact Factor 2.937** ทุน คปก รุ่น 10 และ Fogarty-Ellison (AITRP)
2. **Sakkhachornphop S**, Jiranusornkul, Kodchakorn K, Nangola S, Sirisanthana T, and Tayapiwatana C. Designed Zinc Finger Protein Interacting with the HIV-1 Integrase Recognition Sequence at 2-LTR-Circle Junctions. Poster presentation at the Fogarty International Clinical Research Scholars and Fellow and Doris

Duke International Fellows Alumni Symposium. September 23 - 26, 2010. Bolger Center, Potomac, MD, USA. **ทุน คปภ รุ่น 10 และ Fogarty-Ellison (AITRP)**

3. Wipasa J, Okell L, **Sakkhachornphop S**, Suphavitai C, Chawansuntati K, Liewsaaree W, Hafalla JC, Riley EM. Short-lived IFN- γ effector responses, but long-lived IL-10 memory responses, to malaria in an area of low malaria endemicity. PLoS Pathog. 2011 Feb 10; 7(2):e1001281.
4. **Sakkhachornphop, S.**, Barbas III, C., Keawwichit, R., Wongworapat, K. and Tayapiwatana, C. (2012) Zinc Finger Protein Designed to Target 2-LTR Junctions Interferes with HIV Integration. Human Gene Therapy. (Published ahead of print)
5. **Sakkhachornphop, S.**, Barbas III, C., Keawwichit, R., Wongworapat, K. and Tayapiwatana, C. The Innovative Strategy for HIV-1 Gene Therapy by Zinc Finger Protein. The 28th Annual Meeting of Allergy, Asthma, and Immunology Association of Thailand. Plaza Athenee, Bangkok, April 3-5, 2012 (Winner of MSD Investigator Awards)

13. ทุนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณต่อปี/ ระยะเวลาโครงการ	ผลงานที่ได้รับ โดยสังเขป	โปรตรอบู เปอร์เซ็นต์ และเนื้อหาที่ คล้ายกับ ข้อเสนอ โครงการทุน นี้ (ถ้ามี)
1	เป็นผู้ร่วมวิจัยในโครงการความสามารถในการเพิ่มจำนวนไวรัสเอชไอวีชนิด-1 ที่แยกได้ในอดีตเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้ในปัจจุบัน Viral Replication Capacity; VRC)	Grants-in-Aid for Scientific (B) for Oversea Investigation by Japan Society for Promotion of Science	1,000,000/3 ปี	ทราบความสามารถการเพิ่มจำนวนไวรัสเอชไอวีในอดีตเปรียบเทียบกับปัจจุบัน	ไม่มี

14. ทุนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณต่อปี/ระยะเวลาโครงการ	สถานภาพ	โปรตรอบุเปอร์เซ็นต์และเนื้อหาที่คล้ายกับข้อเสนอโครงการทุนนี้ (ถ้ามี)
1	โครงการการปรับปรุงระบบการนำส่งยีนด้วยเลนติไวรัสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรบกวนกระบวนการอินทิเกรชันของเชื้อเอชไอวี-1 ด้วยซิงค์ฟิงเกอร์โปรตีนที่ออกแบบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์	ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ม.ช.	100,000 / 1ปี	อยู่ระหว่างการพิจารณา โดยจะทราบผลประมาณเดือนพ.ย. 2555	ไม่มี

ประวัติเต็มของคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) กุลธิดา กิติดี
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Kuntida Kitidee
3. วันเดือนปีเกิด 22 เมษายน 2528
4. สถานที่เกิด จังหวัดเชียงใหม่
5. สถานภาพการสมรส โสด
6. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
7. ที่อยู่หน่วยงาน ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรมและการถ่ายทอดเทคโนโลยี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 999 ถ. พุทธรณีสาย 4 ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้/ เบอร์โทรศัพท์มือถือ 086-6731875
9. ประวัติการศึกษา
 - วท. บ. (เทคนิคการแพทย์) จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2550
 - วท. ด. (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์) จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2555
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities
 - 2555 ตำแหน่งอาจารย์
 - ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรมและการถ่ายทอดเทคโนโลยี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ
 -
12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร (ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)
 - ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่
 - 1. Granio O, Porcherot M, Corjon S, **Kitidee K**, Henning P, Eljaafari A, Cimarelli A, Lindholm L, Miossec P, Boulanger P, Hong SS*. Improved adenovirus type 5 vector-mediated transduction of resistant cells by piggybacking on coxsackie B-adenovirus receptor-pseudotyped baculovirus. J Virol. 2009, 83; 6048-66.
 - 2. Lee V.S, Tue-ngeun P, Nangola S, **Kitidee K**, Jitonnorn J, Nimmanpipug P, Jiranusornkul S, Tayapiwatana C*. Pairwise decomposition of residue interaction energies of single chain Fv with HIV-1 p17 epitope variants. Mol Imm. 2010, 47; 982-90.
 - 3. **Kitidee K**, Nangola S, Gonzalez G, Boulanger P, Tayapiwatana C, Hong SS*. Baculovirus display of single chain antibody (scFv) using a novel signal peptide. BMC Biotech. 2010, 10;80.

4. **Kitidee K**, Nangola S, Hadpech S, Laopajon W, Kasinrerker W, Tayapiwatana C*. A drug discovery platform: A simplified immunoassay for analyzing HIV protease activity. J Virol Methods. 2012, 186; 21-29.

13. ทุนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่
ไม่มี

14. ทุนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณต่อปี/ ระยะเวลาโครงการ	สถานภาพ	โปรตระกูล เปอร์เซ็นต์และ เนื้อหาที่คล้ายกับ ข้อเสนอโครงการ ทุนนี้ (ถ้ามี)
1	การรบกวนพัฒนาการของ เชื้อไวรัสเอชไอวี ด้วยโปรตีน แอนโครินที่จับได้อย่าง จำเพาะกับตำแหน่งที่ถูกตัด ด้วยเอนไซม์โปรตีเอส บน โปรตีน Gag	สำนักงาน กองทุน สนับสนุนการ วิจัย (สกว.), สำนักงานคณะ กรรมการ การ อุดมศึกษา แห่งชาติ (สกอ.) และ มหาวิทยาลัย มหิดล	480,00/2 ปี	อยู่ระหว่างการ พิจารณา โดยจะ ทราบผลในวันที่ 31 มีนาคม 2556	5%
2	การศึกษาโครงสร้างและการ ถูกยับยั้งด้วยยาของเอนไซม์ โปรตีเอสจากเชื้อไวรัสเอชไอ วี ที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วน ของ flap	มหาวิทยาลัย มหิดล	200,000/1 ปี	อยู่ระหว่างการ พิจารณา โดยจะ ทราบผลประมาณ เดือนมกราคม พ.ศ. 2556	5%

ประวัติเต็มของคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) สาวิตรี นงอလာ
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Sawitree Nangola
3. วันเดือนปีเกิด 27 มกราคม 2525
4. สถานที่เกิด จังหวัดเชียงใหม่
5. สถานภาพการสมรส โสด
6. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
7. ที่อยู่หน่วยงาน แขนงวิชามัคคุเทศก์วิทยาคณิศและวิทยาศาสตร์การบริการโลहित
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
พะเยา 56000
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้/ เบอร์โทรศัพท์มือถือ 080 4986839
9. ประวัติการศึกษา
 วท. บ. (เทคนิคการแพทย์) จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2547
 วท. ด. (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์) จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2554
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities
 2554 ตำแหน่งอาจารย์
 แขนงวิชามัคคุเทศก์วิทยาคณิศและวิทยาศาสตร์การบริการโลहित
 ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ
 ระดับชาติ
 พ.ศ. 2554 รางวัลวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอกดีมาก จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร
 (ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)
 ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1. Pattarawarapan M, Nangola S and Tayapiwatana C*. Establishment of competitive ELISA for the detection of chloramphenicol. Chiang Mai J Sci 2006; 33:85-94.
2. Pattarawarapan M, Nangola S, Cressey T and Tayapiwatana C*. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of Nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS. TALANTA 2007, 71: 462-70.
3. Cressey TR, Nangola S, Tawon Y, Pattarawarapan M, Lallemand M and Tayapiwatana C*. Immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine in plasma samples of HIV-infected patients. Antimicrob Agents Chemother. 2007, 51: 3361-63.

4. Khamta Y, Pattarawarapan M, Nangola S and Tayapiwatana C*. Development of immunochromatographic assay for the on-site detection of salbutamol. *J Immunoassay Immunochem.* 2009, 30; 441-56.
5. Sakkhachornphop S, Jiranusornkul S, Kodchakorn K, Nangola S, Sirisanthana T and Tayapiwatana C*. Designed zinc finger protein interacting with the HIV-1 integrase recognition sequence at 2-LTR-circle junctions. *Prot Sci.* 2009, 18; 2219-30.
6. Lee VS, Tue-ngeun P, Nangola S, Kitidee K, Jitonnorn J, Nimmanpipug P, Jiranusornkul S and Tayapiwatana C*. Pairwise decomposition of residue interaction energies of single chain Fv with HIV-1 p17 epitope variants. *Mol Imm.* 2010, 47; 982-90.
7. Nangola S, Minard P, Tayapiwatana C*. Appraisal of translocation pathways for displaying ankyrin repeat protein on phage particles. *Protein Expr Purif.* 2010, 74; 156-61.
8. Kitidee K, Nangola S, Gonzalez G, Boulanger P, Tayapiwatana C*. and Hong SS. Baculovirus display of single chain antibody (scFv) using a novel signal peptide. *BMC Biotech* 2010, 10:80.
9. Nimmanpipug P, Khampa C, Lee VS, Nangola S, Tayapiwatana C*. Identification of amino acid residues of a designed ankyrin repeat protein potentially involved in intermolecular interactions with CD4: analysis by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graphics Modell.* 2011, 31; 65-75.
10. Nangola S, Urvoas A, Valerio-Lepiniec M, Khamaikawin W, Sakkhachornphop S, Hong SS, Boulanger P, Minard P, Tayapiwatana C*. Antiviral activity of recombinant ankyrin targeted to the capsid domain of HIV-1 Gag polyprotein. *Retrovirology* 2012, 9;17.
11. Kitidee K, Nangola S, Hadpech S, Laopajon W, Kasinrerak W, Tayapiwatana C*. A drug discovery platform: a simplified immunoassay for analyzing HIV protease activity. *J Virol Methods.* 2012. 186; 21-9.

13. ทูนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณต่อปี/ระยะเวลาโครงการ	ผลงานที่ได้รับโดยสังเขป	โปรตรอบุเปอร์เซ็นต์และเนื้อหาที่คล้ายกับข้อเสนอโครงการทุนนี้ (ถ้ามี)
1	การศึกษากลไกการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสเอชไอวีภายในเซลล์ด้วยโปรตีนแอนไครนวันดีโฟ (กค 2555- มีย 2557)	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา แห่งชาติ (สกอ.) และ มหาวิทยาลัยพะเยา	480,00/2 ปี	- การศึกษาลักษณะการจับของโปรตีนแอนไครนวันดีโฟกับแคปสิดโปรตีนของเชื้อเอชไอวี - ศึกษากลไกของโปรตีนแอนไครนวันดีโฟ ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสเอชไอวี - พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรค - ศึกษากระบวนการควบคุมการทำงานของเม็ดเลือดขาว	-

14. ทูนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน
ไม่มี

ประวัติเพิ่มเติมของที่ปรึกษาโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายแพทย์ ธีระ ศิริสันธนะ
2. ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Thira Sirisanthana
3. วันเดือนปีเกิด 22 กันยายน 2491
4. สถานที่เกิด จ. เชียงใหม่
5. สถานภาพการสมรส สมรส
6. ตำแหน่งปัจจุบัน
 - ศาสตราจารย์สาขาโรคติดเชื้อ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - Principal Investigator ICTU Study สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.
 - Site Leader, CMU ACTG Clinical Research Site, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.
 - รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.
7. ที่อยู่หน่วยงาน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ตู๊ ปณ. 80 ปท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้ 053-945055-8 ต่อ 104 เบอร์โทรศัพท์มือถือ 086-7303300
9. ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตรบัณฑิต (พ.บ.)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ปี พ.ศ. 2528
แพทย์ประจำบ้าน (อายุรศาสตร์)	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ปี พ.ศ. 2531
แพทย์ประจำบ้าน (โรคติดเชื้อ)	จาก ศูนย์การแพทย์แห่งชาติญี่ปุ่น	ปี พ.ศ. 2532
บัณฑิตศึกษา (ระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อ)	จาก มหาวิทยาลัยจอนส์ฮอปกินส์	ปี พ.ศ. 2534
อาจารย์แลกเปลี่ยน	จาก Ohio State University School of Medicine	ปี พ.ศ. 2536
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities

2551 – ปัจจุบัน	ศาสตราจารย์สาขาโรคติดเชื้อ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	
2545 – ปัจจุบัน	Principal Investigator ICTU Study สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.	
2548 – ปัจจุบัน	Site Leader, CMU ACTG Clinical Research Site, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.	
2552 – ปัจจุบัน	รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ ม.ช.	
11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ

เกียรติคุณอันดับ 1 แพทยศาสตรบัณฑิต	จาก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ปี พ.ศ. 2528
------------------------------------	--------------------------	--------------
12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร (ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)
 1. Sirisanthana T, Brown AE. Anthrax of the gastrointestinal tract. Emerg Infect Dis. 2002 Jul;8(7):649-51. (Impact Factor = 5.97)
 2. Sirisanthana T, Nelson KE, Ezzell JW, Abshire TG. Serological studies of patients with cutaneous and oral-oropharyngeal anthrax from northern Thailand. Am J Trop Med Hyg. 1988 Dec;39(6):575-81. (Impact Factor = 2.13)

3. **Sirisanthana T**, Navachareon N, Tharavichitkul P, Sirisanthana V, Brown AE. Outbreak of oral-oro-pharyngeal anthrax: an unusual manifestation of human infection with *Bacillus anthracis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1984 Jan;33(1):144-50. (Impact Factor = 2.13)
4. **Sirisanthana T**, Pinyopornpanit V, Sirisanthana V, Strickman D, Kelly DJ, Dasch GA. First cases of spotted fever group rickettsiosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Jun;50(6):682-6. (Impact Factor = 2.13)
5. **Sirisanthana T**. *Penicillium marneffei* infection in patients with AIDS. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3 Suppl):561. (Impact Factor = 5.97)
6. Nelson KE, **Sirisanthana T**. Images in clinical medicine. Disseminated *penicillium marneffei* infection in a patient with AIDS. *N Engl J Med*. 2001 Jun 7;344(23):1763. (Impact Factor = 29.07)
7. Supparatpinyo K, Perriens J, Nelson KE, **Sirisanthana T**. A controlled trial of itraconazole to prevent relapse of *Penicillium marneffei* infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 1998 Dec 10;339(24):1739-43. (Impact Factor = 29.07)
8. **Sirisanthana T**, Supparatpinyo K, Perriens J, Nelson KE. Amphotericin B and itraconazole for treatment of disseminated *Penicillium marneffei* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*. 1998 May;26(5):1107-10. (Impact Factor = 3.55)
9. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, **Sirisanthana T**. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in southeast Asia. *Lancet*. 1994 Jul 9;344(8915):110-3. (Impact Factor = 13.25)

13. ทูนวิจัยที่กำลังดำเนินงานอยู่

ลำดับที่	ชื่อโครงการ	แหล่งทุน	งบประมาณต่อปี/ ระยะเวลาโครงการ	ผลงานที่ได้รับ โดยสังเขป	โปรตรอบ เปอร์เซ็นต์ และเนื้อหาที่ คล้ายกับ ข้อเสนอ โครงการทุน นี้ (ถ้ามี)
1	HIV/AIDS Clinical Trials Unit; with 2 CRSs, namely ACTG CRS and IMPAACT CRS	NIH/NIAID	03/15/2007 – 01/31/2014	ศึกษาการให้ยาต้านไวรัสแก่ผู้ติดเชื้อ	ไม่มี

14. ทูนวิจัยที่อยู่ในระหว่างการยื่นขอทุน ไม่มี