บทคัดย่อ

229441

รหัสโครงการ: MRG4980152

ชื่อโครงการ: การเตรียมแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถลบล้างพิษจากเชื้อบาดทะยักโดยเทคนิคฟาจดิสเพลย์

ชื่อนักวิจัย: ดร. (นางสาว) นิตยา อินทราวัฒนา

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล์ : tmniw@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการฯ: 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดีของมนุษย์ที่มีความสามารถในการลบล้างพิษจากเชื้อบาดทะยักโดยใช้เทคนิคแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์ การวิจัยเริ่มจากการเตรียมท็อกซอยด์ของพิษบาดทะยัก (tetanus toxoid) ที่จะใช้เป็นแอนติเจนสำหรับคัดเลือกฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อท็อกซอยด์ดังกล่าวจากคลังฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีของมนุษย์อยู่บนผิวของฟาจและมียีนของแอนติบอดีนั้นๆในจีโนมของฟาจด้วย ทั้งนี้โดยการนำวัคซีนท็อกซอยด์ของพิษบาดทะยัก (tetanus toxoid vaccine) มาแยกเอาอะลัม (alum) ที่เป็นแอดจูแวนท์ (adjuvant) ออกไป หลังจากนั้นนำท็อกซอยด์ของพิษบาดทะยักที่เตรียมได้มาใช้คัดเลือกฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีจำเพาะต่อท็อกซอยด์ด้วยเทคนิคไบโอแพนนิง (bio-panning) ซึ่งสามารถคัดเลือกฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อท็อกซอยด์ของพิษบาดทะยักได้ 5 โคลน จากนั้นนำฟาจแต่ละโคลนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านชนิดเอชเชอริเชียโคไล (*E. coli*) แล้วตรวจสอบความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (genes coding for human monoclonal single chain variable fragments; *huscfv*) ในฟาจที่คัดเลือกไว้ด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่ายีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์หรือ *huscfv* จากแบคทีเรียทั้ง 5 โคลนมีรูปแบบของท่อนดีเอ็นเอ (DNA bands) ที่แตกต่างกัน แสดงว่าแอนติบอดีจากยีนเหล่านี้น่าจะมีความจำเพาะต่อเอพิโทปต่างกันหรืออย่างน้อยก็มีแอฟินิตีต่อเอพิโทปไม่เท่ากัน จากนั้นนำแบคทีเรียไปเลี้ยงแล้วทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรียสร้างแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่จับจำเพาะกับท็อกซอยด์ของพิษบาดทะยัก (soluble human ScFv that bound to tetanus toxoid) ออกมา แล้วทำการแยกแอนติบอดีสายเดี่ยวออกมาจากโปรตีนอื่นๆของแบคทีเรีย โดยใช้ anti E-tag resin จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีสายเดี่ยวในการลบล้างพิษจากเชื้อบาดทะยัก (tetanus toxin) โดยตรวจดูว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวเหล่านั้นจะสามารถยับยั้งไม่ให้พิษจากเชื้อบาดทะยักย่อยสับเสตรทคือ recombinant synaptobrevin ได้หรือไม่ ซึ่งพบว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวจากแบคทีเรียจำนวน 3 โคลนสามารถยับยั้งพิษจากเชื้อบาดทะยักได้ กล่าวได้ว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตต้นแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถลบล้างสารพิษบาดทะยักได้ ซึ่งแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่ผลิตได้นี้สามารถที่จะนำไปพัฒนาต่อตามขั้นตอนที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถใช้รักษาผู้ป่วยบาดทะยักได้ในที่สุด ทั้งนี้เพราะแอนติบอดีต้นแบบเหล่านี้เป็นโมเลกุลโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์ ย่อมไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ (anaphylaxis หรือ serum sickness) ในผู้รับ ดังที่มักจะเกิดเมื่อใช้แอนติบอดีจากสัตว์ในการรักษาบาดทะยัก

229441

Project Code: MRG4980152

Project Title: Preparation of human monoclonal antibody that neutralizes tetanus toxin using phage display technology

Investigator: Dr. (Ms) Nitaya Indrawattana
Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

E-mail Address: tmniw@mahidol.ac.th

Project Period: 2 Years

This study was aimed to produce human monoclonal antibodies in the form of single chain antibody variable fragments (ScFv) against tetanus toxin for tetanus immunotherapy by using a phage display technology. Tetanus toxoid was recovered from the commercially available tetanus toxoid vaccine by removing the alum adjuvant. The purified toxoid was used as antigen in a "single-round" phage bio-panning to select phage clones that display human ScFv that bound to the tetanus toxoid from an established human antibody phage display library. Five clones of tetanus toxoid bound phages which displayed high affinity human ScFv to the tetanus toxoid were obtained. Individual phages were used to transfect non-suppressor *E. coli* bacteria and transformants carrying the human *scfv*-phagemids were obtained. The human *scfv* (*huscfv*) carried by the selected *E. coli* transformants revealed highly diverse DNA banding patterns as determined by RFLP assay implying that their expressed human ScFv may be directed to different epitopes or at least they have different affinity to the same epitope. The transformed bacteria were individually grown under IPTG induction for production of the soluble human ScFv to the tetanus toxoid *in vitro* and the human ScFv were purified by using an anti-E-tag resin. Individual human ScFv were tested for their ability to inhibit enzymatic activity of tetanus toxin in a synaptobrevin cleavage assay. The results showed that human ScFv from three selected *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* clones could readily inhibit the synaptobrevin cleavage by the holo-tetanus toxin. These prototype human monoclonal single chain antibody variable fragments warrant developing further step-by-step to tetanus therapeutic preparation. It is envisaged that they should be effective and safe for the human recipients as they are fully human molecules and should not induce any adverse reaction (anaphylaxis and/or serum sickness) as frequently do when the animal derived anti-tetanus immune immunoglobulin are used for treatment of human tetanus.