โครงการย่อยที่ 3

เรื่อง

การเตรียมแอนบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถยับยั้ง
การทำงานของโปรตีนไทมิก สโตรมอล ลิมโฟพอยอิติน

Preparation of human monoclonal antibody that neutralizes activities of thymic stromal lymphopoietin (TSLP)

คณะผู้วิจัย **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิตยา อินทราวัฒนา**
รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงอัญชลี ตั้งตรงจิตร
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิทัศน์ สุขรุ่ง

ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
ประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2555

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ชื่อโครงการ : การเตรียมแอนบอดีของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนไทมิก สโตรมอล ลิมโฟพอยอิติน
Preparation of human monoclonal antibody that neutralizes activities of thymic stromal lymphopoietin (TSLP)

รายนามหัวหน้าโครงการวิจัยและคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด โทรศัพท์และโทรสาร

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิตยา อินทราวัฒนา
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี
คณะเวชศาสตร์เขตร้อน
มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-3549100 ต่อ 1598 โทรสาร 02-6435583

คณะผู้วิจัย

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1 : รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงอัญชลี ตั้งตรงจิตร
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2 ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ 02-4196468 โทรสาร 02-4112084

ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2 : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิทัศน์ สุขรุ่ง
หน่วยงานที่สังกัด หน่วยเครื่องมือพิเศษเพื่อการวิจัย สถานส่งเสริมการวิจัย
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2 ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ 02-4192826 โทรสาร 02-4192848

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย : จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
ประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2555

ระยะเวลาการวิจัย : 2 ปี

บทคัดย่อ

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) หรือ interleukin 50 (IL-50) เป็นโปรตีนที่หลั่งจาก epithelial cells บริเวณทางเดินหายใจที่มีการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เซลล์ในร่างกาย เช่น Dendritic cells (DCs), T cells, mast cells, NKT cells และ เซลล์อื่นๆ ให้หลั่ง T helper 2 (Th2) cytokines เช่น IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 เป็นต้น รวมถึง mediators ต่างๆ มีผลการกระตุ้นให้เกิด airway hyper-responsiveness (AHR) มีการอักเสบ และ atopic dermatitis ในผู้ป่วย มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของ TSLP ในหนูทดลองจะสามารถยับยั้งไม่ให้เซลล์อักเสบชนิดอีโอซิโนฟิลเข้าไปในทางเดินหายใจและสามารถป้องกันการเกิดการอักเสบในทางเดินหายใจได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเตรียม recombinant human TSLP เพื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้ในเป็นแอนติเจนเพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv ที่จับกับ TSLP จาก human antibody phage display library คณะผู้วิจัยได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจาก epithelial cell line ที่ถูกกระตุ้นสารก่อภูมิแพ้ แล้วทำการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ทำการเพิ่มจำนวนยีน TSLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน โดยพบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 489 bp แล้วโคลนยีนที่เป็นรหัสของ TSLP ของมนุษย์เข้าใน expression vector นำ recombinant vector เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ทำการ induce ให้ transformed *E. coli* ผลิต recombinant TSLP แล้วทำการ purify recombinant TSLP ออกจากโปรตีนอื่นๆของแบคทีเรียด้วย affinity column วิเคราะห์โปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ LC MS/MS พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 15 KDa ซึ่ง recombinant TSLP ที่ผลิตขึ้นสามารถเพิ่มการแสดงออกของ OX40L บนผิวของ Myeloid dendritic cells ได้ จากนั้นนำ TSLP ที่ผลิตขึ้นเป็นแอนติเจนเป้าหมายในการทำ Bio-panning เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display human ScFv จากการคัดเลือก 192 โคลน พบว่า 49 โคลนมี *huScFv* gene และ 20 โคลนสามารถสร้าง HuScFv ได้ จากการทดสอบการจับของ HuScFv ดังกล่าว ต่อ human TSLP ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามี crude HuScFv จำนวน 10 clones คือ clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 และ 16 ให้ผลบวกใน indirect ELISA จากนั้นนำ human antibodies ทั้ง 10 โคลน ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ TSLP พบว่า มี 2 โคลนของ TSLP specific monoclonal antibodies คือ โคลนที่ 5 และ 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการการแสดงออกของ OX40L บนผิวของ TSLP treated-Myeloid dendritic cells ได้ ถือได้ว่าเป็นการศึกษาแรกที่สามารถผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวที่มีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับ TSLP และรบกวนการทำงานของ TSLP protein ได้ ซึ่งอาจจะยับยั้งการอักเสบในทางเดินหายใจได้ แต่ต้องทำการทดลองต่อไป

Summary

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) or interleukin 50 (IL-50) is a secreted protein of the respiratory lining epithelial cells which response to the allergen. TSLP can induce several cells such as dendritic cells (DCs), T cells, mast cells, NKT cells and other to secret the T helper 2 (Th2) cytokines like IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13 etc. Cytokines releasing result in the airway hyper-responsiveness (AHR), inflammation and atopic dermatitis in patient. The inhibition of TSLP is successful to prevent the inflammation by inhibit the entry of eosinophil migrate into respiratory tract in mice. Therefore, this study aims to preparing the recombinant human TSLP. This protein will further use as antigen for produce the human monoclonal antibody by using phage display technology. The mRNA was extracted from the epithelial cell line which has challenge with an allergen and then converted to cDNA. Human TSLP gene was amplified by using specific primer. PCR product has 489 bp in size. The amplicon was clones into expression vector and infected into the expression E. coli. The transformed bacteria were grown under IPTG induction for production of the soluble recombinant human TSLP. The protein was purified by using an affinity column and characterized by SDS-PAGE and LC MS/MS. The recombinant human TSLP was shown the molecular weight as 15 kDa. The recombinant TSLP protein was successfully produced. This TSLP protein showed biological activity which could enhance OX40L expression on Myeloid dendritic cells. The purified TSLP was used in the phage biopanning process for specific HuScFv selection. From biopanning 149 clones were selected and 49 clones have *huScFv* gene. There were 20 HuScFv clones that could be produced. Ten HuScFvs clones *i.e.* clones no. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 and 16 bound specifically to the TSLP as determined by indirect ELISA. They were expressed and purified. There were 2 of TSLP specific HuScFvs clones (Clone no. 5 and 7) could inhibit OX40L expression in TSLP treated-Myeloid dendritic cells. This is the first report on production of human ScFv that specifically bound to the TSLP protein and interfere it biofunctions.