เอกสารแนบหมายเลข 2

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5580153

Project Title : การสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์

Investigator : ชื่อนักวิจัย และสถาบัน

ดร. ปานน้ำทิพย์ พิทักษ์สัจจะกุล ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : pannamthip.pit@mahidol.ac.th

Project Period : 2 ปี

1. Abstract

ที่มาของปัญหา: เชื้อไวรัสเดงกี่เป็นเชื้อไวรัสที่มียุงลายเป็นพาหะ โดยมีการประมาณว่าในแต่ละปีมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อ 50-100 รายทั่วโลก ซึ่งปัญหาที่สำคัญของกลไกการเกิดโรคของเชื้อไวรัสเดงกี่คือ ในการติดเชื้อครั้งแรกร่างกายจะสร้างสารภูมิคุ้มกันที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคได้ ซึ่งสารภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นจะสามารถยับยั้งเชื้อเดงกี่ซีโรไทป์ทจากการติดเชื้อครั้งแรกได้เป็นระยะเวลานาน แต่ไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกี่สายพันธุ์อื่น แต่กลับส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงขึ้นได้ เรียกกลไกที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคเช่นนี้ว่า Antibody Dependent Enhancement จนกระทั่งปัจจุบันยังไม่สามารถผลิตวัคซีน หรือยารักษาไข้เลือดออกที่สามารยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ ในระยะหลังจึงมีการศึกษาถึงการนำสารโมโนโคอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อโรค โดยเฉพาะเชื้อไวรัสมาใช้ในการรักษา ซึ่งทีมวิจัยของเราได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ โดยวิธีไฮบริโดมา และยังผ่านการทดสอบในหนูทดลอง และในลิงแล้ว ในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา และการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อไวรัสได้ดีเช่นเดิมเมื่อเทียบกับแอนติบอดีที่ได้จากไฮบริโดมา โดยการผลิตในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) เพื่อนำไปใช้ในการผลิตในปริมาณมากขึ้น (large scale) เพื่อสามารถศึกษาลักษณะ และคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในด้านต่างๆ ได้ละเอียดมากขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย: โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ถูกคัดเลือกมาจำนวน 19 โคลนที่เป็นแอนติบอดีชนิด IgG เพื่อศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ ซึ่งในจำนวนนี้ 3 โคลน (1A10H7, 1B3B9, 1G7C2) ได้ถูกคัดเลือกมาเพื่อใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในเซลล์ Human Embryonic Kidney (HEK) และจำนวน 1 โคลน (1B3B9) ถูกนำไปสร้างเป็น stable cell ในเซลล์ CHO ที่สามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อย่างไม่จำกัด

ผลการทดลอง: ในการศึกษาคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 19 โคลนพบว่ามีกลไกหลายอย่างก่อให้เกิดความหลากหลายของแอนติบอดีที่นำมาศึกษาทั้ง 19 โคลนนี้ คือการรวมกันระหว่าง Variable heavy (VH) และ Variable light (VL) ที่ต่างกัน การเพิ่มหรือลดกรดอะมิโนในส่วนของ CDR3 ของ heavy chain หรือแม้กระทั้งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางตำแหน่ง ซึ่งผลของความหลากหลายของแอนติบอดียีนนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาส่วนเอพิโทปของแอนติเจนต่อไป หลังจากนั้นจึงได้นำชิ้นส่วน VH และ VL ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 3 โคลนที่แยกได้จากเซลล์ไฮบริโดมานี้มาใช้ในสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในเซลล์ mammalian ได้เป็นผลสำเร็จโดยมีความสามารถในการจับและการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ใกล้เคียงกับแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมา โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 1 โคลนได้นำมาสร้างเป็น stable cell ในเซลล์ CHO ที่สามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อย่างไม่จำกัด และยังคงความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อเพิ่มปริมาณในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

Keywords: Recombinant IgG; Neutralization; Dengue virus; Cross-neutralizing; Germline

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อแยกชิ้นส่วน VH และ VL จาก ไฮบริโดมาเซลล์ ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ทั้งหมด 19 โคลน

2.2 เพื่อสร้าง mammalian expression plasmid ของ heavy chain และ light chain เพื่อใช้ในการผลิต recombinant IgG จำนวน 3 โคลน ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ดีที่สุด

2.3 เพื่อผลิต recombinant IgG ของโมโนโคลนอล 3 โคลนดังกล่าว ใน mammalian cells

2.4 เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ของ recombinant IgG ที่ผลิตขึ้น

2.5 เพื่อสร้าง CHO stable cell lines ที่สามารถหลั่งสาร recombinant IgG ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้

3. บทสรุปผู้บริหาร

ไวรัสเดงกี่เป็นเชื้อไวรัสที่มียุงลายเป็นพาหะนำโรค โดยมีการรายงานว่ามีผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ถึง 50-100 ล้านคนต่อปีทั่วโลก (World Health Organisation) เชื้อไวรัสเดงกี่จัดอยู่ในกลุ่ม Flavivirus เป็น RNA virus ชนิดหนึ่ง ที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ซีโรไทป์ ซึ่งปัญหาที่สำคัญของเชื้อไวรัสเดงกี่คือผู้ที่ติดเชื้อเดงกี่ไวรัสครั้งแรกต่อหนึ่งซีโรไทป์ สามารถมีภูมิคุ้มกันต่อซีโรไทป์นั้นเป็นระยะเวลานาน แต่จะมีภูมิคุ้มกันต่อซีโรไทป์อื่น ในระยะเวลาสั้นๆ หลังจากนั้นถ้ามีการติดเชื้อซ้ำกับซีโรไทป์ที่ต่างจากการติดเชื้อครั้งแรก อาจก่อให้เกิดอาการรุนแรงของโรคมากขึ้นได้ เรียกกลไกการก่อโรคในลักษณะนี้ว่า Antibody dependent enhancement (Schmidt

et al., 2010) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถผลิตวัคซีน หรือยารักษาโรคสำหรับโรคไข้เลือดออกนี้ได้เป็นผลสำเร็จ ในระยะหลังจึงมีการพัฒนายารักษาโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส โดยการใช้สารที่ชื่อว่า “โมโนโคลนอลแอนติบอดี” จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาของทีมผู้วิจัยเราสามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีมนุษย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้เป็นผลสำเร็จโดยใช้วิธีไฮบริโดมา ซึ่งจากทั้งหมด 136 โคลนที่พัฒนาขึ้น มีทั้งหมด 19 โคลนที่เป็นแอนติบอดีชนิด IgG ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ดีที่สุด ซึ่งทั้ง 19 โคลนนี้จับกับ envelop protein ของเดงกี่ไวรัส (Setthapramote et al., 2012) ดังนั้น เพื่อเป็นการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของโมโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 19 โคลน ชิ้นส่วน VH และ VL ได้ทำการแยกออกจากเซลล์ไฮบริโดมา โดยสกัด Ribonucleic acid (RNA) สังเคราะห์ Complementary Deoxyribonucleic acid (cDNA) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยวิธีปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำไปหาลำดับเบส โดยใช้ฐานข้อมูล IMGT ในการวิเคราะห์โมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งได้ทำการศึกษาถึงกลไกการทำให้เกิดความหลากหลายของแอนติบอดีแต่ละตัว ทำให้ทราบถึงชนิดของ antibody germline ที่ใช้, การรวมกันของส่วน variable, diversity และ joining (VDJ recombination), การจับคู่กันระหว่าง VH และ VL และการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่ง (Somatic hypermutation, SHM) ซึ่งพบว่าแอนติบอดีทั้ง 19 โคลน เกิดจากแอนติบอดี germline ที่ไม่เหมือนกันของ heavy chain (HC) ถึง 10 แบบ และ light chain (LC) จำนวน 11 แบบ ซึ่งสังแกตุว่าแอนติบอดีแต่ละโคลนมีการประกอบของ HC และ LC ที่ต่างกัน ซึ่งส่งผลให้แอนติบอดีแต่ละโคลนมีความสามารถในการจับกับเดงกี่ไวรัสได้ไม่เหมือนกัน นอกจากนี้เรายังพบว่าแอนติบอดีบางตัวมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกันมาก มีการใช้ลำดับกรดอะมิโนของ antibody จาก germline เดียวกัน แต่มีความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ไม่เหมือนกัน ส่งผลให้ความสามารถในการจับและยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่แตกต่างกันด้วย ซึ่งสามารถตั้งสมมุติฐานได้ว่า ตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้แอนติบอดีนั้นๆ สามารถจับกับเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ดีขึ้น ซึ่งมีประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนต่อไปในอนาคต

นอกจากการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของแอนติบอดีแต่ละตัวแล้ว เราได้คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน (1A10H7, 1B3B9, 1G7C2) ที่สามารถยังยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ได้ดีที่สุด (Sasaki et al., 2013) มาใช้ในการผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีในรูปแบบรีคอมบิแนนท์ (rIgG) โดยทำการศึกษาในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian cells) โดยเริ่มจากการตัดต่อชิ้นส่วน VH และ VL เข้าใน mammalian expression plasmid pQCX ทั้งหมด 3 ชนิด คือ pQCXIP-CH ที่มี human constant region (C) ตัดต่ออยู่ก่อนแล้ว ซึ่งใช้ในการตัดต่อส่วน VH เข้ากับส่วน constant heavy (CH) เพื่อให้ได้เป็น heavy chain ทั้งเส้น ส่วนพลาสมิดอีก 2 ชนิด คือ pQCXIH-CL และ pQCXIH-CK ซึ่งมีส่วนของ constant lambda light chain (CL) และ constant kappa light chan (CK) ตัดต่ออยู่ตามลำดับ โดย variable lambda (VL) หรือ variable kappa (VK) ที่แยกได้จากเซลล์ไฮบริโดมาได้ถูกตัดต่อเข้าพลาสมิดทั้งสองชนิดนี้แล้วแต่ชนิดของ variable light chain ที่ได้ พลาสมิดของ heavy chain และ light chain ที่ได้จึงนำไปทำการ transfection เข้าในเซลล์ HEK293T เพื่อใช้ในการผลิตเป็น rIgG แลวเก็บน้ำเลี้ยง

เซลล์ที่มีแอนติบอดีไปทดสอบการจับกับเชื้อเดงกี่ไวรัสด้วยวิธี immunofluorescense assay (IFA) และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ทั้ง 4 ซีโรไทป์ด้วยวิธี Focus Reduction Neutralization Test (FRNT) ซึ่งพบว่า rIgG ที่ได้ทั้ง 3 โคลนสามารถจับ และยับยั้งเชื้อเดงกี่ไวรัสได้คล้ายคลึงกับแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากเซลล์ไฮบริโดมา จากนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน (1B3B9) ได้ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปสร้างเป็น stable cell ในเซลล์ CHO ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการนำไปใช้ในการผลิตในระดับใหญ่หรือระดับอุตสาหกรรม (Kim et al., 2012) โดยทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกี่ของแอนติบอดีที่ได้จาก stable cell อีกครั้งหนึ่ง พบว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจาก stable cell สามารถยังยั้งเชื้อเดงกี่ไวรัสได้คล้ายคลึงกับแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาเช่นกัน Stable cell ที่สร้างขึ้นได้สามารถนำไปพัฒนาต่อโดยการปรับเปลี่ยนให้กลายเป็นเซลล์ลอย และสามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงที่ปราศจากซีรั่มได้ เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในปริมาณมากขึ้นต่อไปได้

4. วิธีทดลอง

4.1 การแยกชิ้นส่วน VH และ VL จากเซลล์ไฮบริโดมา

เซลล์ไฮบริโดมา จำนวน 19 โคลน ได้ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM ที่เติม 15% Fetal Bovine Serum จนได้ เซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ (1 × 10 cm dish) แล้วจึงสกัด RNA จากเซลล์ที่ได้ เพื่อนำมาใช้ในการสังเคราะห์ cDNA จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแอนติบอดียีนส์ดังตารางที่ 1 ซึ่งจะเป็นไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ของ VH ทั้งหมด 12 คู่ V kappa 10 คู่ และ V lampda 4 คู่