รหัสโครงการ SUT3-304-56-36-16

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ ชนิดเฉียบพลัน (เอ เอ็ม แอล)

Application of phage display antibody technology for the treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-56-36-16

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ ชนิดเฉียบพลัน (เอ เอ็ม แอล)

Application of phage display antibody technology for the treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556 – 2559

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2560

บทคัดย่อภาษาไทย

มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน AML เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดแบบเฉียบพลันที่พบได้มากที่สุด แม้ในปัจจุบันจะมีวิธีการรักษาแบบ chemotherapy และการปลูกถ่าย stem cell ที่มีประสิทธิภาพ แต่ผู้ป่วยด้วยโรคนี้ ยังมีอัตราการตายสูง ดังนั้นจึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องคิดค้น พัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่ที่มุ่งเป้าไปยังโมเลกุลจำเพาะในเซลล์เป้าหมายที่เป็นเซลล์ก่อโรคที่แท้จริง เพื่อลดอาการข้างเคียงของยาซึ่งมีอันตรายสูง และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาได้มากขึ้น หนึ่งในวิธีการที่มีประสิทธิภาพคือ antibody therapy หรือวิธีการกำจัดเซลล์มะเร็งด้วยวิธีจับแบบจำเพาะโดยใช้แอนติบอดี ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสร้างคลังเฟจแอนติบอดี โดยใช้เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ชนิดเฉียบพลันเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนยีนแอนติบอดี เรียกคลังที่ได้สร้างขึ้นนี้ว่า Yamo-AML โดยใช้ cell line AML ชนิด HL-60 ซึ่งแยกมาได้จากผู้ป่วย เป็นเซลล์เป้าหมายในการทำการคัดเลือกหาแอนติบอดีที่จำเพาะ ผลการวิจัย พบว่าสามารถคัดเลือกเฟจที่แสดงแอนติบอดีที่จับต่อเซลล์เป้าหมาย HL-60 ได้ แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นชิ้นส่วนแอนติบอดีอิสระ scFv พบว่าแอนติบอดีนี้กลับไม่สามารถจับกับเซลล์เป้าหมาย ดังนั้นจึงได้ทำการคัดหาแอนติบอดี จากคลังที่สร้างจากเม็ดเลือดขาวของคนปกติ คือคลัง ย่าโม๑ แทน และสามารถคัดหาแอนติบอดีได้ 2 โคลน ซึ่งเมื่อนำแอนติบอดีทั้ง 2 มาตรวจสอบความแรงในการจับเซลล์เป้าหมายด้วยวิธีการ FACS พบว่าแอนติบอดีโคลน 152 หรือ scFv-152 แสดงความสามารถในการจับได้ดีกว่า ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้แอนติบอดีโคลน scFv-152 นี้ ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อเซลล์เป้าหมายต่อไป โดยผู้วิจัยสามารถผลิตแอนติบอดี scFv-152 จากแบคทีเรีย *E. coli* ได้ในปริมาณมาก ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา และความจำเพาะต่อเซลล์ พบว่าแอนติบอดี scFv-152 สามารถจับแบบจำเพาะต่อเซลล์ HL60 เท่านั้น และเมื่อทดสอบความสามารถในการเข้าไปในเซลล์ HL-60 พบว่าชิ้นส่วนแอนติบอดี scFv152 สามารถเข้าไปในเซลล์ได้ นอกจากนั้นแล้วผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาพบว่า แอนติบอดี scFv-152 ที่สร้างขึ้นได้จากโครงการวิจัยนี้ มีคุณสมบัติที่น่าสนใจคือ สามารถจับเฉพาะกับเซลล์ HL-60 ระยะตัวอ่อนเท่านั้น โดยเมื่อได้ทำการการดัดแปลงทางพันธุวิศวกรรมแอนติบอดี ให้ชิ้นส่วนแอนติบอดี scFv-152 เชื่อมเข้ากับโปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียวได้เป็นโมเลกุลแอนติบอดี scFv-152-GFP แล้วผลิตออกมาจากแบคทีเรีย *E coli* พบว่าสามารถนำไปใช้ย้อมเซลล์ HL-60 ให้เรืองแสงได้ จากการตรวจสอบภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ โดยสรุป ผู้วิจัยสามารถผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจ 1 ชนิดคือ แอนติบอดี scFv-152 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงมาก คือจับจำเพาะกับเซลล์ AML ชนิด HL-60 ในระยะที่เป็นตัวอ่อน (immature) เท่านั้น และเมื่อจับแล้ว แอนติบอดีสามารถเคลื่อนเข้าไปในเซลล์ได้ ผู้วิจัยจะได้ทำการจดสิทธิบัตรแอนติบอดีนี้ เพราะมีศักยภาพในการนำไปเป็นยารักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบมุ่งเป้าได้ นอกจากนั้นแล้ว ยังอาจนำเอาไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ และกลไกการเจริญเติบโตและพัฒนาเซลล์ในระบบโลหิต และระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ต่อไปได้

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common type of acute leukemia in adults. Depsite current effective treatment procedure involving chemotherapy and stem cell transpantaion, AML is still highly fatal disease. Thefore, there is a need for target-based therapy for more specific, less toxic drugs. One of the efficient methods is antibody therapy which involve the use of specific monoclonal antibdody against AML cells. In this research, a phage display-antibody library, designated Yamo-AML, was constructed using blood of AML patients as tempates for amplifying antibody genes. The AML cell line HL-60, which as isolated from AML patient, was used as a target cell for affinity selection (biopanning) of phage displayed antibody. Our results indicated that phage displayed antibodies against HL-60 could be isolated from the library; however, when the antibody was converted into soluble scFv form, it couldn't bind the the target cell anymore. Consequntly, another phage display-antibody library, which was constructed from healthy people, designated Yamo I library, was used for biopanning instead. From Yamo I library, 2 clones of phage displayed antibody specific to HL-60 were isolated. Out of these 2 clones, one clone, designated scFv-152, that showed better binding affinity by fluoresecent-activated cell sorting (FACS) analysis was selected for further analysis. The scFv-152 antibody could be produced at a relative high amount from *E. coli* expression system. Biological assay of scFv-152 aginst cell lines indicated that this scFv-152 antibody could specifically bind only to HL-60 cell lines but didn't cross-react to another cell lines. In addition, it could be internalized upon binding to the cell. Moreover, we found that this antibody could bind only to the pre-matured HL-60 cells because it could not bind to the HL-60 cell after differentiation induction. When the scFv-152 was engineered to fused with green fluorescent protein, scFv-152-GFP, this antibody could be used to stain HL-60 cell line when observed under fluorescent microscope. In conclusion, one specific recombinant antibody against AML cell line HL-60, i.e., scFv-152, could be generated using phage display antibody technology. This antibody could bind specifically to undifferentiated HL-60 cell and internalized. The information of antibody will be patented as it has potential to be developed for target-based therapy against AML. Moreover, it can slos be used as a powerful tool for the study of human hematopoietic and immunological systems.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2556 ถึง 2559 โดยมีกรรมการจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวฐิติมา สัมพันธ์อภัย นักศึกษาปริญญาเอก ที่ได้เป็นผู้ช่วยวิจัยหลักในการทำวิจัยนี้ โดยใช้ผลงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก ขอขอบคุณ โรงพยาบาลศิริราช ที่ได้ให้นำตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมาใช้ในการสร้างคลังแอนติบอดี และ ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการเป็นอย่างดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ **3**

บทคัดย่อภาษาไทย **4**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ **5**

สารบัญ **6**

บทที่ 1 : บทนำ **8**

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 8

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 8

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 8

1.4 ทฤษฎี สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 9

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง **10**

2.1 แอนติบอดี (Antibody หรือ Immunoglobulin) (มณฑารพ ยมาภัย, 2008) 10

2.1.1 โมโนโคลนนอลแอนติบอดี (*Monoclonal antibody*) (มณฑารพ ยมาภัย, 2008) 10

2.2 เทคโนโลยีเฟจ (Phage Display Technology) 12

2.3 เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจและแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาโรค (Phage Display Antibody Technology and Therapeutic Antibody) 14

2.4 มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลัน(Acute Myeloid Leukemia, AML) 14

2.5 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจในการวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลัน 15

บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย **17**

3.1 วิธีการสร้างคลังเฟจแอนติบอดี 17

3.2 วิธีการคัดเลือกเฟจ 17

3.2.1 การคัดเลือก แอนติบอดีผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสายเดี่ยว 17

บทที่ 4 : บทสรุป **32**

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 32

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย **35**

ประวัติผู้วิจัยหลัก **39**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก **40**

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร 40

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน 41

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1 : บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ข้อจำกัดที่สำคัญในการใช้แอนติบอดีสำหรับการรักษาโรคมะเร็งนั้น คือหากแอนติบอดีมีต้นกำเนิดมาจากหนูซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตคนละ species กับมนุษย์ จะทำให้เกิดปฏิกริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่อาจรุนแรงจนเสียชีวิตได้ ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะคิดค้นคว้าวิจัยการผลิตแอนติบอดีจากมนุษย์เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคได้อย่างปลอดภัย ซึ่งวิธีการหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากมนุษย์คือการใช้เทคโนโลยีเฟจ (Phage Display Technology) (Thie et al., 2008) ซึ่งเป็นแนวทางของการวิจัยในโครงการนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ (Phage display technology) เพื่อการผลิตแอนติบอดีของมนุษย์ ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลัน แบ่งออกเป็นวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1. เพื่อสร้างคลังแอนติบอดีบนผิวเฟจจากยีนที่ได้มาจากผู้ป่วย AML ในระยะต่างๆ ที่สามารถรวบรวมได้จากโรงพยาบาลศิริราช
2. เพื่อหาวิธีการทำ biopanning หรือการคัดหาเฟจที่จับกับเซลล์มะเร็ง และ/หรือเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดที่มีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งประเภทนี้ โดยจะคัดหาจากคลัง naïve human scFv phage display library และคลังที่สร้างขึ้นจากผู้ป่วย
3. เพื่อผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมชนิด scFv และ scFv-GFP ที่สามารถจับกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้อย่างจำเพาะเจาะจง
4. เพื่อทำการวิเคราะห์ และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และโครงสร้างของแอนติบอดีที่จับแบบจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนบนผิวเซลล์มะร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลันที่ได้จากการคัดเลือก (Bio-panning) และ/หรือ โมเลกุลจำเพาะ (maker) บนผิวเซลล์มะเร็งที่จับกับแอนติบอดีที่คัดหามาได้
5. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ได้พัฒนาขึ้นทั้งในเชิงชีวเคมีและ ผลต่อการทำงานของเซลล์มะเร็ง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จะใช้เลือดของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลันที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลศิริราชเป็นต้นแบบในการสร้างคลังเท่านั้น โดยคลังที่จะสร้างขึ้นเป็นคลังแอนติบอดีเฉพาะส่วน scFv ที่แสดงบนโปรตีน pIII บนผิวเฟจ M13 ส่วนการทดสอบทาง biological effect จะทำเฉพาะใน

ห้องทดลอง *(in vitro)* การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยจะทำภายใต้การยินยอมอนุญาตจาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ทั้งจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งเป็นการเก็บเฉพาะตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจตามปกติแล้ว

1.4 ทฤษฎี สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีสมมุติฐานที่อ้างอิงจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงว่าในผู้ป่วยมะเร็งทั้งที่เป็นมะเร็งชนิด solid tumor และมะเร็งเม็ดเลือด จะมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิด Humoral Immunity ของตัวผู้ป่วยเองให้สร้างแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่อโปรตีนบนผิวเซลล์มะเร็งของตนเอง เรียกแอนติบอดีชนิดนั้นว่า Autoantibody (Caron et al., 2007) ตัวอย่างเช่น แอนติบอดีที่จับกับ HER2/neu ซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์มะเร็งเต้านม (Disis et al., 1994) และแอนติบอดีต่อโปรตีน NuSAP1 ในคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลันที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก (Wadia et al., 2010) ผลจากการศึกษาวิจัยดังกล่าวจึงเป็นองค์ความรู้ที่นำมาเป็นสมมุติฐานในงานวิจัยนี้ นั่นคือผู้ป่วย AML ในระยะต่างๆ จะมีการสร้าง auto-antibody ต่อโมเลกุลจำเพาะบนผิวเซลล์มะเร็ง รวมทั้งเซลล์มะเร็งต้นกำเนิด ซึ่ง auto-antibody เหล่านี้หากนำมาปรับคุณสมบัติให้เหมาะสม อาจเป็นต้นแบบในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคตัวใหม่ได้ นอกจากนั้นแล้วสมมุติฐานอีกประการคือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ในระยะการพัฒนาต่างๆ จะมีโมเลกุลจำเพาะบนผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งแอนติบอดีอาจสามารถตรวจพบโมเลกุลจำเพาะเหล่านี้ได้ และการค้นพบนี้จะมีความสำคัญในการเข้าใจระบบการพัฒนาเม็ดเลือดขาวในร่างกายทั้งในสภาวะปกติ และเมื่อเกิดโรคมะเร็ง รวมทั้งเข้าใจกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเชิงลึกได้ องค์ความรู้พื้นฐานต่างๆ ที่ได้จากการวิจัยนี้ เช่นที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยมะเร็ง, marker บนผิวเซลล์มะเร็ง และ เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง อาจนำไปสู่การค้นพบ วิธีการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลัน แบบใหม่ คือแบบมุ่งเป้า (target-based) ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเก่าในอนาคตต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอนติบอดี (Antibody หรือ Immunoglobulin) (มณฑารพ ยมาภัย, 2008)

antibody คือโปรตีนที่พบได้ในเลือด น้ำเหลือง และสารคัดหลั่งต่างๆ ในร่างกายของสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 โดย Emil von Behring และ Shibasaburo Kitasato ซึ่งได้ทำการศึกษาทดลองและค้นพบว่าใน serum ของสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคคอตีบ (diphtheria) และ บาดทะยัก (tetanus) นั้น มีสารที่เรียกว่า “antitoxic activity” (ต่อมาได้เปลี่ยนไปใช้คำว่า antibody) ซึ่งมีความสามารถในการทำให้สัตว์ที่ไม่เคยมีภูมิคุ้มกันมาก่อนเกิดความต้านทานโรคในระยะสั้นได้ antibody มีหน้าที่ในการไปจับกับสิ่งแปลกปลอมต่างๆที่เข้ามาในร่างกายเช่น แบคทีเรีย ไวรัส หรือสารพิษต่างๆ เมื่อสิ่งแปลกปลอมถูก antibody จับแล้ว จะถูกทำลายความเป็นพิษ (neutralize) หรือถูกนำไปทำลายต่อด้วยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายต่อไป antibody เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายที่เรียกว่าระบบ adaptive immune response คือเป็นระบบการตอบสนองของร่างกายโดยการสร้างภูมิคุ้มกัน อย่างเฉพาะเจาะจงต่อ เชื้อโรคต่างๆ ที่เข้ามาสู่ร่างกาย ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วการตอบสนองประเภทนี้ จะช่วยให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคในกรณีที่ร่างกายได้รับเชื้อซ้ำอีก (protective immunity) อันที่จริงนอกจากเชื้อโรคต่างๆ แล้ว สิ่งแปลกปลอมอีกมากมายที่เข้าสู่ร่างกายก็มีความสามารถกระตุ้นการสร้าง antibody ได้ รวมเรียกสารที่สามารถกระตุ้นให้สิ่งมีชีวิตผลิต antibody ได้ว่า antigen ซึ่งเป็นคำย่อมาจาก antibody generation

antibody มีชื่ออีกชื่อหนึ่งในทางชีวเคมีว่า immunoglobulin (หรือเรียกโดยย่อว่า Ig) เพราะประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐานคือ immunoglobulin domain ซึ่งประกอบด้วย β sheets 2 แผ่นเชื่อมต่อกันอยู่ด้วย disulfide bridge มีโครงสร้างเรียกว่า β barrel เพราะมีลักษณะคล้ายถัง antibody ในร่างกายมนุษย์มีหลายประเภท แต่มีโครงสร้างหลักที่คล้ายกันคือมีส่วนที่เป็นสายยาว heavy chain และสายสั้น light chain ในส่วนตรงปลายด้านบนเป็นส่วนที่มีความหลากหลายสูง มีหน้าที่ในการจับกับเป้าหมายต่างๆ (antigen) ได้อย่างหลากหลายและเฉพาะเจาะจง เรียกส่วนนี้ว่า variable region หรือ V region ซึ่งความสามารถในการจับอย่างเฉพาะเจาะจงนี้เองทำให้ antibody สามารถถูกนำมาประยุกต์ใช้ทั้งในการวิจัยและการแพทย์

2.1.1 โมโนโคลนนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) (มณฑารพ ยมาภัย, 2008)

monoclonal antibody ไม่ใช่สารที่เกิดจากธรรมชาติ แต่เกิดจากการที่มนุษย์คิดค้นวิธีการสร้างขึ้นด้วยเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาในปี พ.ศ. 2518 วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการผลิต monoclonal antibody นั้น ทำได้โดยการฉีด antigen เข้าไปในหนูเพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ antigen ชนิดนั้นๆ จากนั้นจึงใช้เทคนิคการสร้างเซลล์ผสม (hybridoma technology) ระหว่าง B lymphocyte และ myeloma cell

หรือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อผลิตให้ได้เป็น monoclonal antibody ชนิด เซลล์ผสมที่ถูกสร้างขึ้นให้มีความสามารถในการผลิต monoclonal antibody นั้น สามารถเก็บรักษาไว้ให้เป็นแหล่งผลิต monoclonal antibody ได้ตลอดไป การผลิต monoclonal antibody ชนิดหนึ่งๆ แต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลานาน (4-5 เดือนขึ้นไป) และ การลงทุนเป็นจำนวนสูง นอกจากนั้นแล้วยังต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูง รวมทั้งยังต้องเกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองคือ หนู อีกด้วย ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าขบวนการการผลิต monoclonal antibody ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นค่อนข้างยุ่งยาก บางครั้งนักวิจัยไม่มีเวลาหรือบุคลากรเพียงพอ จึงต้องสั่งทำจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง นอกจากนั้นแล้วในขั้นตอนการผลิต monoclonal antibody ให้ได้เป็นจำนวนมาก (large scale) เพื่อการนำไปใช้ต่อนั้นก็มีความยุ่งยากและต้องใช้เครื่องมือราคาแพงเช่นกัน วิธีการที่นิยมใช้ในการผลิต monoclonal antibody ให้ได้เป็นจำนวนมากนั้นมี 2 วิธีคือ การนำ hybridomas ไปเลี้ยงในลักษณะที่เป็นมะเร็งในช่องท้องของหนู (ascites tumor) แล้วสกัดเอา ascites fluid ที่มี monoclonal antibody ออกมา วิธีนี้เป็นที่นิยมเพราะสามารถผลิตได้ monoclonal antibody ในปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงในห้องทดลองถึง 1,000 – 10,000 เท่า แต่เป็นวิธีการที่สร้างความเจ็บปวดและทรมานให้กับหนูทดลอง นอกจากนั้นแล้ว monoclonal antibody ที่เตรียมได้ยังปนเปื้อนด้วย immunoglobulin ของหนู ไวรัส หรือสาร cytokine อื่นๆจากหนูซึ่งอาจไม่เป็นผลดีต่อการประยุกต์ใช้ต่อไป วิธีการอีกวิธีหนึ่งในการผลิต monoclonal antibody เป็นจำนวนมากคือการเลี้ยงใน bioreactor ชนิดต่างๆได้แก่ standard static หรือ agitated suspension cell cultures, membrane-based หรือ matrix-based culture systems, และ high cell-density bioreactors แต่ข้อจำกัดของวิธีการเหล่านี้คือเป็นเทคโนโลยีที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงมากรวมทั้งอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ก็มีราคาสูงมากเช่นกัน

นอกจากการผลิตโมโนโคลนอล antibody โดยวิธีการดั้งเดิมนั้นจะมีความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายที่สูงแล้ว ยังมีข้อจำกัดที่เกิดจากเทคโนโลยีนี้หลายอย่างเช่น ข้อจำกัดในชนิดของ antigen ที่จะใช้ เพราะต้องเป็น antigen ที่ไม่เป็นพิษต่อหนูทดลอง นอกจากนั้นแล้วยังต้องไม่เป็น antigen ที่คล้ายกับ antigen ของหนู เช่น antigen ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในขั้นต้นของลำดับการวิวัฒนาการ (conserved antigens) หรือใช้ได้เฉพาะกับ antigen ที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนู (immunogenicity) ได้เท่านั้น นอกจากนั้นแล้วผลที่ได้จากการกระตุ้นหนูทดลองยังมีความแปรปรวนสูงขึ้นกับสุขภาพของหนูแต่ละตัว ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือจำนวนชนิดของ antigen ที่จะใช้ในการสร้าง monoclonal antibody โดยปกติการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen แต่ละชนิดมักต้องใช้หนูทดลอง 3-5 ตัวขึ้นไป ในยุคปัจจุบันซึ่งเป็นยุคหลังการค้นพบลำดับยีโนม (post-genomic era) ของมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด ความสำคัญในการศึกษาวิจัยจึงมุ่งไปสู่การศึกษาการทำงานของยีโนม หรือโปรตีน (functional genomics หรือ proteomics) ซึ่งการวิจัยเหล่านี้จำเป็นต้องเกี่ยวกับโปรตีนจำนวนมหาศาล การสร้าง monoclonal antibody จำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีนเหล่านี้โดยวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบันจึงเป็นไปไม่ได้ หรือต้องการค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody ที่กำลังได้รับความสนใจอยู่มากอีกประการหนึ่งในปัจจุบันนี้ ได้แก่การนำ monoclonal antibody ที่ผลิตได้จากหนูไปปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเป็นเหมือนของมนุษย์ (humanization) เพื่อให้สามารถใช้ในการบำบัดโรคต่างๆ (human therapy) ปัจจุบันมี monoclonal antibody ที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่นมะเร็งเต้านมขั้นสุดท้ายออกจำหน่ายแล้ว (Herceptin) การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้นับวันจะมีความสำคัญและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะใช้เทคโนโลยีอื่นในการผลิต monoclonal antibody ที่ไม่ยุ่งยากและรวดเร็ว กว่าวิธีการ hybridoma ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

2.2 เทคโนโลยีเฟจ (Phage Display Technology)

เฟจ (phage) คือ ไวรัสที่ “กิน” หรือมีชีวิตอยู่โดยอาศัยแบคทีเรีย (bacteriophage) มีหลายชนิด ชนิดที่นำมาใช้สำหรับเทคโนโลยีเฟจนี้เป็นประเภทเส้นใย เรียกว่า filamentous phage (Ff) ของแบคทีเรียแกรมลบ มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เชื่อมต่อกันเป็นวงกลม ลักษณะเป็นท่อยาว ประมาณ 900-2,000 nm เทคโนโลยีการแสดงโปรตีน เปปไทด์ หรือแอนติบอดีบนผิวของ bacteriophage เป็นเทคนิคที่เกิดขึ้นมาแล้วกว่า 25 ปี (Smith, 1985) โดยนับตั้งแต่ได้มีการคิดค้นเทคนิคนี้ขึ้นมา ได้มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการค้นคว้าวิจัยเรื่องต่างๆทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวาง ในประเทศที่พัฒนาแล้วมีผลงานการวิจัยและบทความเกี่ยวกับเทคโนโลยีนี้เป็นจำนวนมากที่ได้รับการตีพิมพ์ (Hoogenboom et al., 1991; Kay et al., 1996; Smith, 1985) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันในหมู่นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายว่า เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ เป็นนวัตกรรมที่ยังให้มนุษย์สามารถทำให้เกิดการวิวัฒนาการในห้องทดลองได้ ทั้งนี้เนื่องจากอันตรกริยาหรือการจับกันอย่างเหมาะสมระหว่างโมเลกุลคู่หนึ่ง สามารถถูกคัดเลือกให้เกิดขึ้นได้ในห้องทดลองในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งการหาคู่จับที่เหมาะระหว่างโมเลกุล 2 ชนิดเช่นนี้ หากเกิดขึ้นเองตามระบบวิวัฒนาการตามธรรมชาติอาจต้องใช้เวลาร่วมหลายร้อยล้านปี การแสดงออกของโปรตีนบนเฟจ สามารถทำได้โดยใช้เทคโนโลยีพื้นฐานทางการตัดต่อยีนและทางชีวจุลินทรีย์ ในการเชื่อมต่อโปรตีนที่ต้องการแสดงกับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผิวเฟจ (capsid) เปปไทด์หรือโปรตีนที่เชื่อมติดอยู่บนผิวเฟจนี้สามารถจับกับโมเลกุลอื่น ๆ ได้อย่างมีอิสระ โดยเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีความหลากหลายจำนวนมหาศาล ซึ่งถูกถอดรหัสมาจากสายนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) นี้จะเชื่อมอยู่กับส่วนปลายทางด้านอะมิโน (N-terminus) ของโปรตีนหลักชื่อ pVIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 2500 ชิ้น หรือโปรตีนรองชื่อ pIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 5 ชิ้น บนผิวของเฟจของแบคทีเรีย (bacteriophage) ชนิด M13, fi หรือ fd ซึ่งแต่ละระบบเกิดจากใช้เวคเตอร์ต่างชนิดกัน คลังของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีความแตกต่างกันเป็นจำนวนมหาศาลคือประมาณ 108-1011 ชนิด สามารถถูกสร้างขึ้น โดยการนำเวคเตอร์จำนวนมากที่ได้ถูกตัดต่อขึ้นใส่ลงไป (transform) ในแบคทีเรีย *E. coli* โดยวิธีการผ่านทางกระแสไฟฟ้า (electroporation)

นับตั้งแต่เทคโนโลยีนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นได้มีการตีพิมพ์ผลงานจำนวนมากที่แสดงความสำเร็จในการประยุกต์ใช้คลังของเฟจที่แสดงเปปไทด์ที่มีความหลากหลายสูงที่มีความยาวตั้งแต่ 6-43 กรดอะมิโน ในงานวิจัยด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง มีรายงานจำนวนมากที่ได้แสดงถึงความสำเร็จในการคัดเลือกเปปไทด์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายชนิดต่าง ๆ เช่น แอนติบอดี รีเซฟเตอร์บนผิวเซลล์ โปรตีนภายในเซลล์ และเอนไซม์ ชนิดต่าง ๆ (Marks and Marks, 1996) ซึ่งเปปไทด์ที่ได้รับการคัดเลือกมาเหล่านี้สามารถจะนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการพัฒนายาต่อไป

นอกจากการแสดงเปปไทด์บนผิวเฟจแล้ว โปรตีน เช่น โดเมนและเอนไซม์ชนิดต่างก็สามารถนำมาแสดงบนผิวเฟจได้ ผลจากการศึกษาได้พบว่า โดยส่วนใหญ่เอนไซม์หรือโปรตีนโดเมนยังมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาหรือมีอันตกริยาเหมือนปกติ แม้เมื่อถูกนำมาเชื่อมอยู่กับโปรตีนบนผิวเฟจทั้งชนิด หลัก (pVIII) และรอง (pIII) มีรายงานที่แสดงว่าโปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดต่างๆ สามารถถูกนำมาปรับแปลงให้มีลักษณะต่างๆ กันได้อย่างหลากหลาย (mutagenized) แล้วแสดงบนผิวของเฟจ(Barbas et al., 1991; Griffiths et al., 1993; Vaughan et al., 1996) จากนั้นนำไปคัดเลือกหาคุณสมบัติใหม่ที่ต้องการ การใช้วิธีนี้จึงเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพและน่าสนใจในการสร้างแอนติบอดีชนิดใหม่ (antibody engineering) (Kristensen and Winter, 1998) หรือการปรับปรุงเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานอีกจำนวนมากที่แสดงถึงความสำเร็จในการใช้คลังของ cDNA ที่แสดงบนผิวเฟจ ในการศึกษาอันตรกริยาระหว่างโปรตีนชนิดต่าง ๆ การคัดเลือกโปรตีนที่ต้องการจากคลังของ cDNA โดยใช้เทคโนโลยีการแสดงของโปรตีนบนเฟจจึงถือเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจอีกอันหนึ่งในการศึกษาอันตรกริยาระหว่างโปรตีน

การให้ความสนใจที่จะนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจมาใช้เป็นแหล่งในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นได้เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี 2543 โดยในขั้นแรกเป็นการสร้างคลังของแอนติบอดีจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนแล้ว โดยทำการแสดงเฉพาะส่วนของแอนติบอดีที่มีหน้าที่ในการจับคือ ส่วน Fab (McCafferty et al., 1990) หรือ สร้างเป็นแอนติบอดีเส้นเดี่ยวที่มีเฉพาะส่วนที่มีหน้าที่ในการจับ (scFv) (Hoogenboom et al., 1991; Kay et al., 1996; Smith, 1985) แอนติบอดีเหล่านี้จะถูกแสดงออกบนโปรตีนที่ปกคลุมบนผิวเฟจได้หลายรูปแบบ เช่น โปรตีนปกคลุมชนิดรอง (pIII) หรือชนิดหลัก (pVIII) พบว่ามีความสำเร็จจากการใช้คลังเหล่านี้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนหลายชนิด แต่ข้อจำกัดประการสำคัญของการใช้วิธีการนี้คือต้องทำการกระตุ้นสัตว์ทดลองก่อนจึงเป็นการเสียเวลา และยังเป็นคลังที่มีเฉพาะแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ใช้ อย่างไรก็ตามความสำเร็จนี้นับเป็นเครื่องชี้ว่าสามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจมาใช้ในการคัดเลือกและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับอย่างมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้จริง

หลังจากนั้น นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการสร้างคลังของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนได้สำเร็จ (nonimmune library หรือ naïve library) (Pansri et al., 2009; Sheets et al., 1998) อาจเรียกคลังชนิดนี้ว่าเป็นคลัง “ปฐมภูมิ” ซึ่งมีข้อดีกว่าคลังประเภท immunized library คือสามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยได้กว้างขวางกว่าคลังที่สร้างจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนหลายเท่า เพราะสามารถใช้ในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนเกือบทุกชนิดที่ต้องการ เนื่องจากคลังของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นนี้เป็นตัวแทนความเป็นไปได้ทั้งหมดจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ตามธรรมชาติ โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกมาได้นั้นมีคุณภาพดีคือมีความสามารถในการจับ (affinity ในช่วง 1-200 nM) และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูงเท่ากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก hybridoma (Winter et al., 1994)

2.3 เทคโนโลยีการแสดงแอนดิบอดีบนผิวเฟจและแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาโรค (Phage Display Antibody Technology and Therapeutic Antibody)

ในทางอุตสาหกรรมยา มียาที่ผลิตขึ้นจากเทคโนโลยีเฟจที่ผ่านการยอมรับในสหรัฐอเมริกาเมื่อปี คศ.2003 คือ Adalimumab (Humira®) สำหรับใช้ในการรักษาโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ส่วนยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆนั้นยังอยู่ในระหว่างการศึกษาทางคลินิกอยู่ (Dubel, 2007)

2.4 มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลัน(Acute Myeloid Leukemia, AML)

มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (Acute leukemia) เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อนอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ไขกระดูกไม่สามารถสร้างเซลล์เม็ดเลือดที่ปกติได้ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมักเกิดกับเด็ก โดยผู้ป่วยจะต้องได้รับการรักษาอย่างรวดเร็ว มิเช่นนั้นแล้วอาจจะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตภายในไม่กี่เดือน มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิลอยด์ (Acute myeloid leukemia, acute myelogenous leukemia, AML) มีลักษณะเฉพาะของโรคคือมีการเจริญผิดปกติอย่างรวดเร็วของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดไมอิลอยด์ และสะสมในไขกระดูกจนรบกวนการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดปกติ เป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในผู้ใหญ่ และมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นตามช่วงอายุ แม้มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิลอยด์จะเป็นโรคที่ค่อนข้างพบน้อยโดยนับเป็น 1.2% ของการตายจากมะเร็งในประเทศสหรัฐอเมริกา (American Cancer Society, 2009) อุบัติการณ์ของโรคนี้มีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นจากการที่ประชากรมีอายุยืนยาวขึ้น อาการของมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิลอยด์เกิดจากการที่เซลล์ในไขกระดูกถูกแทนที่โดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด จึงทำให้ร่างกายมีจำนวนเม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด และเม็ดเลือดขาวปกติน้อยลง อาการเหล่านี้เช่น อาการอ่อนเพลีย หายใจเหนื่อย เลือดออกง่าย มีจ้ำตามตัวง่าย ติดเชื้อง่าย ถึงแม้จะมีการค้นพบปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิลอยด์แล้วหลายอย่างก็ตามแต่สาเหตุที่แท้จริงของโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และเช่นเดียวกันกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดอื่นๆ มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิ

ลอยด์จะมีการดำเนินโรคที่รวดเร็วและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ภายในเวลาเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือนหากไม่ได้รับการรักษา มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิลอยด์มีหลายชนิด แต่ละชนิดมีวิธีการรักษาและพยากรณ์โรคแตกต่างกัน อัตรารอดชีวิตที่ห้าปีมีตั้งแต่ 15-70% และอัตราการกลับเป็นซ้ำมีตั้งแต่ 78-33% แล้วแต่ชนิด (American Cancer Society, 2009) การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิลอยด์ในระยะแรกนั้นใช้การรักษาด้วยเคมีบำบัดโดยมุ่งเหนี่ยวนำให้โรคสงบ โดยผู้ป่วยอาจต้องได้รับเคมีบำบัดเพิ่มเติมหรือต้องได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโลหิตในไขกระดูก การพิจารณาเลือกใช้ยาเคมีบำบัดขึ้นกับชนิดของโรค ซึ่งมักต้องใช้ยาสองถึงสามกลุ่มร่วมกัน (Tong et al., 2009) ได้แก่ Anthracycline (เช่น daunorubicin, daunomycin, idarubicin, mitoxantrone), Cytarabine (เช่น cytosine arabinoside), ara-C, 6-thioguanine (6-TG) หรือ hydroxyurea ร่วมกับ Prenisone อย่างไรก็ตามการใช้เคมีบำบัดมีผลทำลายเซลล์ปกติด้วย ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ในผู้ป่วย ที่พบบ่อยเช่น ผมร่วง เยื่อบุช่องปากและทางเดินอาหารอักเสบ ติดเชื้อง่าย เลือดออกง่าย ไม่อยากอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น (American Cancer Society, 2009) อีกทั้งการรักษามักไม่หายขาด มีอัตรารอดชีวิตเกินห้าปีประมาณ ร้อยละ 30-34 แต่ ในผู้ป่วย ที่อายุมากกว่า 65 ปี มีเพียงร้อยละ 10 (Lübbert et al., 2008) งานวิจัยใหม่ๆ ทางด้านพันธุศาสตร์เกี่ยวกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอิลอยด์ช่วยให้มีการทดสอบที่สามารถทำนายได้ว่ายาชนิดใดจะได้ผลดีกับผู้ป่วยรายใดโดยเฉพาะและยังทำให้ทราบได้ว่าผู้ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตมากเท่าใดอีกด้วย ระบบการจำแนกประเภทแบบฝรั่งเศส-อเมริกัน-อังกฤษได้แบ่งโรคออกเป็นชนิดย่อย 8 ชนิด ตั้งแต่ M0 ถึง M7 ตามชนิดและระยะการเจริญของเซลล์ที่เจริญขึ้นเป็นมะเร็งเม็ดเลือด ซึ่งทำได้โดยการตรวจเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์และ/หรือตรวจด้วยวิธีการทางเซลล์พันธุศาสตร์เพื่อหาความผิดปกติทางโครโมโซมของเซลล์ชนิดย่อยแต่ละชนิดของมะเร็ง มีพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกันไป แม้ระบบการจำแนกประเภทขององค์การอนามัยโลกจะให้ประโยชน์ทางคลินิกมากกว่าแต่ระบบการจำแนกประเภทแบบฝรั่งเศส-อเมริกัน-อังกฤษก็ยังเป็นที่นิยมใช้ทั่วไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.5 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจในการวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลัน

มีงานวิจัยที่ตีพิมพ์มาก่อนหน้าที่ได้กล่าวถึงการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจมาผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลัน โดยมีการใช้คลังแอนติบอดีของมนุษย์แบบปฐมภูมิ (ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น) เพื่อทำการคัดเลือกชิ้นแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเป้าหมาย รวมทั้งมีการสร้างคลังแอนติบอดีจากหนูที่ได้รับการกระตุ้น ด้วย CD123 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีจำนวนสูงบนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอิลอยด์ชนิดเฉียบพลัน แล้วทำการคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดนี้ที่เป็น marker ของเซลล์มะเร็งดังกล่าว จากนั้นทำ antibody engineering เพื่อเชื่อมต่อโมเลกุลแอนติบอดีกับ toxin ให้เป็น immunotoxin conjugate หรือ ต่อกับชิ้นโปรตีนที่

สามารถชักนำ effector cell มาทำลายเซลล์มะเร็งเป้าหมาย ผลการศึกษาพบว่าแอนติบอดีสามารถทำลายเซลล์มะเร็งเมื่อทำการตรวจสอบแบบ *in vitro* ได้ (Stein et al., 2010)

จากที่ได้กล่าวมาทั้งหมดจึงเห็นได้ว่า งานวิจัยนี้มีความน่าสนใจและท้าทาย เพราะจะได้นำเอาองค์ความรู้เกี่ยวกับ auto-antibody ที่สร้างขึ้นจากร่างกายคนไข้เอง มาร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจ ซึ่งการประยุกต์โดยการเอาสองส่วนนี้มารวมกันนั้น ยังไม่มีผู้ใดเคยทำมาก่อน อีกทั้งแอนติบอดีที่คัดหามาได้นั้น ไม่ว่าจะจากคลัง naïve หรือคลังของผู้ป่วย อาจนำไปใช้เป็นต้นแบบในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือแม้แต่มะเร็งอื่นๆ อีกต่อไป ขึ้นแอนติบอดี ที่จะสร้างขึ้นมาได้จริงจากโครงการนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

3.1 วิธีการสร้างคลังเฟจแอนติบอดี

ทำการสร้างคลังเฟจด้วยวิธีการที่ได้พัฒนามาก่อนแล้วในห้องปฏิบัติงานของหัวหน้าโครงการวิจัย ซึ่งได้รับการตีพิมพ์ไปแล้วดังนี้

Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., and Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnol 9, 6.

ซึ่งขั้นตอนการสร้างคลังโดยละเอียด สามารถดูได้จากรายงานการวิจัย เรื่อง “การพัฒนาเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจเพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี (Application of phage display technology for the production of monoclonal antibody) รหัสโครงการ SUT3-304-47-24-11

ทั้งนี้ความแตกต่างของการสร้างคลังคือ ต้นแบบของ mRNA เพื่อจะใช้สร้างเป็นคลังแอนติบอดีได้มาจากผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันที่ได้รับการวินิจฉัยว่าหายขาดจากโรค (complete remission) จำนวน 21 คน ผลการวิเคราะห์คุณภาพคลังพบว่ามีขนาดเล็กกว่าคลังย่าโม ๑ คือ มีค่า diversity ประมาณ 2.27×10^6 และมีความสมบูรณ์ของ recombinant antibody insert ประมาณร้อยละ 80

3.2 วิธีการคัดเลือกเฟจ

วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้ สามารถใช้ในการคัดหาเฟจที่จับจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน จากทั้งคลังแอนติบอดีปฐมภูมิ (คลังย่าโม ๑) และคลังทุติยภูมิชื่อ Yamo-AML ที่ได้สร้างขึ้นจากโครงการวิจัยนี้

3.2.1 การคัดเลือก แอนติบอดีผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสายเดี่ยว

ใช้หลักการ การคัดเลือกความสามารถในการจับกับเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง (affinity selection) ในหลอดอิมูโน (immunotube) โดยผู้วิจัยได้ตัดสินใจใช้เซลล์ HL-60 เป็นเซลล์เป้าหมาย (target cell) ในการคัดเลือกในโครงการวิจัยนี้ เพราะเซลล์นี้มีคุณลักษณะที่จัดอยู่ในประเภท M2 ตามการแยกประเภทของ French American British (FAB) classificatiom ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว AML ที่อยู่ในขั้นต้นของการพัฒนาการมากที่สุด คือมีความเป็นเสต็มเซลล์สูงที่สุดเท่าที่จะสามารถหาซื้อได้จาก

แหล่งเก็บรวบรวมเซลล์ ทั้งนี้ยังมีรายงานว่าเป็นชนิดที่มีอุบัติการณ์มากที่สุดเมื่อเทียบกับประเภทอื่น วิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมาจนสำเร็จ สรุปได้ดังนี้

<u>ขั้นที่ 1 การคัดเลือกรอบแรก</u>

1.1 เติมคลังของเฟจปริมาณ 10^{14} ที่เจือจางอยู่ใน 4 % w/v นมปลอดไขมัน (MPBS) ใส่ลงในหลอดอิมูโน (immunotube) ปิดฝาด้วยจุกที่มากับหลอดอิมูโนแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

1.2 นำคลังเฟจที่บล็อคแล้วใส่ลงในหลอดอิมูโน (immunotube) ที่มี $5x10^6$ เซลล์ Jurkat ปิดฝาด้วยจุกที่มากับหลอดอิมูโนแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3 ปั่นตกเซลล์ที่ 350 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารน้ำที่มีคลังเฟจใส่ลงใน $5x10^6$ เซลล์ HL-60 ปิดฝาด้วยจุกที่มากับหลอดอิมูโนแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.4 ปั่นตกเซลล์ที่ 350 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารน้ำที่มีคลังเฟจที่ไม่จับกับเซลล์ HL-60 ทิ้ง

1.5 ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. ของ 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS เป็นจำนวน 5 ครั้ง (ปั่นตกเซลล์ที่ 350 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที)

1.6 ทำการสกัด (elute) เฟจที่จับกับแอนติเจน โดยใส่ 500 µl 50 mM Citric acid pH 2.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารสกัดที่ทำให้เป็นกลาง (neutralize) โดยการเติม 500 µl Tris-HCl pH 7.4

1.7 ใส่สารสกัดเฟจที่ได้ลงในหลอดที่มีแบคทีเรีย *E. coli* TG1 ที่กำลังโตอยู่ในช่วงชี้กำลัง (log phase) ในน้ำเลี้ยง 2xYT จำนวน 5 ml

2.9 ทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ถูกติดเชื้อ (infect) ด้วยเฟจที่ได้จากการคัดเลือกในรอบที่ 1 บนจานเลี้ยงเชื้อผสมวุ้น 2xYT ที่มี 100 ul/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 1% w/v โดยปั่นแยกเซลล์ที่ได้ให้ตกลงมาที่ความเร็วประมาณ 3000 xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทน้ำเลี้ยงทิ้งให้เหลือประมาณ 100 ul แล้วเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C ข้ามคืน โดยในขั้นตอนนี้ก่อนที่จะเกลี่ยเชื้อลงทั้งหมดต้องนำเชื้อส่วนหนึ่งมาเจือจางลงทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ก่อน แล้วจึงนำไปเกลี่ย (spread) ลงบนจานวุ้นเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เป็นแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว (single colony) เพื่อให้สามารถคำนวณจำนวนของเฟจที่คัดเลือกมาได้ในรอบนี้

<u>ขั้นที่ 2 การเตรียมเฟจเพื่อทำการคัดเลือกรอบที่สอง</u>

2.1 ทำการเก็บรวบรวมโคโลนีของแบคทีเรียที่โตขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อโดยใส่น้ำเลี้ยง 2xYT จำนวน 1 ml ลงไปแล้วใช้แท่งแก้วขูดเอาแบคทีเรียออกมาให้หมด กระจายเชื้อให้เข้ากันดี อย่าให้ติดกันเป็นก้อน

2.2 นำแบคทีเรียจากขั้นแรกจำนวน 1 มล. ไปเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ 1% w/v น้ำตาลกลูโคส จำนวน 100 ml

2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมกับเขย่าไปด้วยอย่างแรงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.4 เติมเฟจตัวช่วย (M13KO7) จำนวน 100 µl

2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C โดยไม่ต้องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที

2.6 นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

2.7 แยกเอาส่วนใสด้านบนออก แล้วใส่อาหารเหลว 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin, 50 ug/ml kanamycin และ น้ำตาลกลูโคส 0.1% w/v จำนวน 100 ml กระจายแบคทีเรียที่อยู่ก้นหลอดให้ดีในอาหารเหลวนี้

2.8 นำแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C พร้อมกับเขย่าไปด้วยอย่างแรงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

ขั้นที่ 3 การคัดเลือกรอบที่สอง

3.1 ทำการแยกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฟจอยู่จากขั้นที่แล้วโดยการ ปั่นตกตะกอน ที่ความเร็ว 3300 xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) ไว้ในหลอดทดลองที่สะอาด

3.2 ทำการตกตะกอนเฟจโดยการเติมสารละลาย PEG/NaCl (20% Polyethylene glycol 8000, 2.5M NaCl) ลงใน supernatant และผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 1 ชั่งโมง

3.3 นำไปปั่นตกตะกอนที่ 3300 g เป็นเวลา 30 นาที

3.4 กำจัดส่วนใสด้านบน (PEG/NaCl) ออกแล้วปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ 3300 g เป็นเวลา 5 นาที

3.5 กำจัด PEG/NaCl ออกให้หมด

3.6 เติม PBS ปริมาณ 500 ul แล้วผสมกับตะกอนเฟจให้เข้ากันดี

3.7 นำเฟจทั้งหมดที่ได้ไปทำการคัดเลือกรอบที่ 2 ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ในขั้นที่ 1

* ถ้าต้องการคัดเลือก 3 รอบ ให้ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นที่ 1 และ 2 อีกครั้งหนึ่ง

ผู้วิจัยได้ใช้เวลาในการทำการทดลองวิจัยในขั้นนี้เป็นเวลาร่วม ๒ ปี เพราะต้องพยายามปรับปรุงวิธีการต่างๆ รวมทั้งความเชี่ยวชาญของผู้ช่วยวิจัย สรุปผลของการคัดเลือกเฟจในวิธีต่างๆถูกแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งแสดงว่าการคัดเลือกด้วยคลัง Yamo-AML สามารถคัดเลือกได้เฟจที่จับกับเซลล์มะเร็ง HL-60 แต่เมื่อเปลี่ยน จากเฟจแอนติบอดี (แอนติบอดีที่แสดงอยู่บนผิวเฟจ) เป็นชิ้นส่วนแอนติบอดีอิสระ (scFv) ชิ้นส่วนแอนติบอดีที่คัดเลือกมาได้ไม่สามารถจับกับเซลล์HL-60 ส่วนคลัง Yamo I สามารถคัดเลือกแอนติบอดีที่สามารถจับกับเซลล์ HL-60 ได้

ตารางที่ 1 การทดลองคัดเลือกเฟจแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 ด้วยคลังแอนติบอดี Yamo-AML และ คลัง Yamo I ในแบบต่างๆ

Library	Method	Round	Phage	scFv antibody
Yamo-AML	Magnetic biopanning	3	No	No
Yamo-AML	Subtractive biopanning PBMC >U937> HL-60	3	Yes	No
Yamo-AML	Unamplified biopanning	3	Yes	No
Yamo	Subtractive biopanning Jurkat T cell> HL-60	3	N/A	Yes

Yes: there was phage or scFv antibody that bound to target
No: there was phage or scFv antibody that didn't bind to target
N/A: not analysis

3.3 การผลิตชิ้นแอนติบอดีอิสระที่ไม่อยู่บนผิวเฟจ

วิธีการนี้ใช้ในการผลิตชิ้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี แบบใดก็ได้ถ้าในโครงสร้างของเฟจมิดมีรหัส TAG ซึ่งเป็น amber stop codon ระหว่างชิ้นของ แอนติบอดี กับ pIII ดังที่ได้อธิบายแล้วข้างต้น โดยชิ้นแอนติบอดีที่ไม่อยู่บนผิวเฟจอาจอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อหรืออยู่ในช่องว่างในผนังเซลล์ (periplasmic space) ของแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ หลังจากที่ได้ชิ้นแอนติบอดีที่ไม่อยู่บนผิวเฟจแล้ว สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ได้ต่อไป ในกรณีที่มีโคลนของ scFv จำนวนมากที่ต้องการทดสอบ อาจทำการผลิตทีละหลายๆโคลนในปริมาณน้อยๆโดยการเลี้ยงใน จานวัดปริมาณระดับอณู 96 หลุม รายละเอียดของการทำในขั้นตอนต่างๆที่ได้กล่าวมาข้างต้นอธิบายได้ดังนี้

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การเตรียม ชิ้นแอนติบอดีที่ไม่อยู่บนผิวเฟจ ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

1. ทำการจิ้มโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้จากขั้นตอนการคัดเลือกไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 ug/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 2% w/v อยู่ แล้วบ่มที่ 30°C โดยการเขย่าไปด้วยข้ามคืน
2. นำแบคทีเรียจากขั้นที่แล้วจำนวน 10 μl ไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 μg/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 1% w/v จำนวน 10 ml ที่ 37°C โดยการเขย่าไปด้วยจนโตได้ค่า OD600 = 0.9 (ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง)

3. นำไป ปั่นตกตะกอน ที่ 3000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำไปผสมให้เข้ากันดี (resuspend) ใน น้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 μg/ml ampicillin + 1mM IPTG แล้วเลี้ยงที่ 30°C เป็นเวลา 20 ชั่งโมง
4. ทำการปั่นแยกเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการ ปั่นตกตะกอน ที่ 5000 g 4°C เป็นเวลา 15 นาที ชิ้นแอนติบอดีอิสระ จะอยู่ในส่วนน้ำใสด้านบน (supernatant)
5. นำไปใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการจับกันเซลล์เป้าหมายด้วยวิธี Flow cytometer analysis หรือนำไปเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ต่อไป

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การเตรียมชิ้นส่วนแอนติบอดีอิสระในปริมาณมาก

เมื่อทำการผลิตแอนติบอดีแบบอิสระในขนาดเล็กเพื่อทำการทดสอบเบื้องต้นแล้ว จำเป็นต้องผลิตชิ้นส่วนแอนติบอดีในขนาดใหญ่ด้วยเพื่อให้เพียงพอต่อการทดลองอื่นๆต่อไป ในที่นี้เราจึงทำการเปรียบเทียบแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต ระหว่าง *E. Coli* สายพันธุ์ TG1 และ HB2151 ว่าชนิดใดสามารถผลิตแอนติบอดีได้มากกว่า โดยที่ขั้นตอนการผลิตเหมือนกันทุกประการ ขั้นตอนมีดังนี้

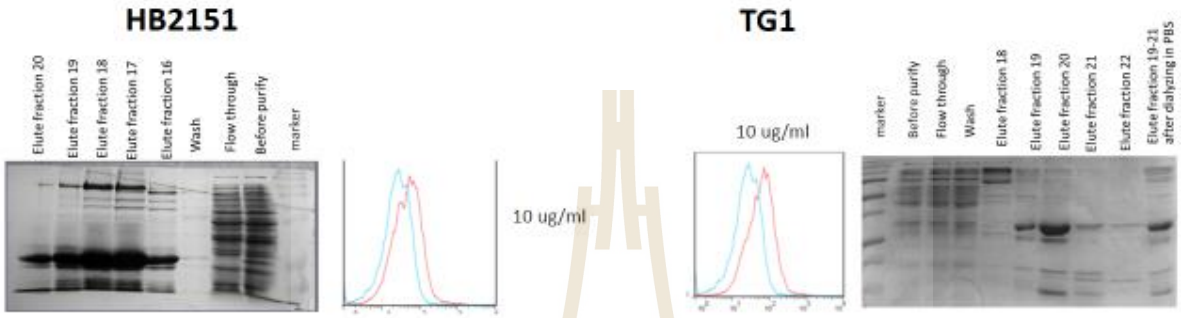
1. ทำการจิ้มโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้จากขั้นตอนการคัดเลือกไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 μg/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 2% w/v อยู่ แล้วบ่มที่ 30°C โดยการเขย่าไปด้วยข้ามคืน
2. นำแบคทีเรียจากขั้นที่แล้วอัตราส่วน 4 ml ไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 μg/ml ampicillin และ น้ำตาลกลูโคส 1% w/v จำนวน 400 ml ที่ 37°C โดยการเขย่าไปด้วยจนโตได้ค่า OD600 = 0.9 (ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง)
3. นำไป ปั่นตกตะกอน ที่ 3000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำไปผสมให้เข้ากันดี (resuspend) ใน น้ำเลี้ยง 2xYT ที่มี 100 μg/ml ampicillin + 1mM IPTG แล้วเลี้ยงที่ 30°C เป็นเวลา 20 ชั่งโมง
4. ทำการปั่นแยกเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการ ปั่นตกตะกอน ที่ 5000 g 4°C เป็นเวลา 15 นาที ชิ้นแอนติบอดีอิสระ จะอยู่ในส่วนน้ำใสด้านบน (supernatant)
5. นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลหลังจากการทำให้บริสุทธิ์สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *E. coil* สายพันธุ์ HB2151 มาสามารถผลิตแอนติบอดีได้มากกว่า แบคทีเรีย *E. coil* สายพันธุ์ TG1 ดังรูป

The expression level comparison between HB2151 and TG1

	HB2151	TG1
Antibody clone	152	152
Culture volume	400 ml	400 ml
Volume after dialysis	3 ml	3 ml
Concentration after dialysis	6.5 mg/ml	1.12 mg/ml
Total yield	48.75 mg/L	8.445 mg/L



ภาพที่ 1 ตารางการสรุป ผลเจล SDS-PAGE และผลการวิเคราะห์การจับของชิ้นส่วนแอนติบอดีกับเซลล์ เพื่อเปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีระหว่างแบคทีเรีย *E. coil* สายพันธุ์ HB2151 และ TG1

เมื่อได้ชิ้นส่วนแอนติบอดีบริสุทธิ์ในปริมาณที่มากพอจึงสามารถนำแอนติบอดีนี้ไปใช้ในการทดสอบต่างๆต่อไป

3.4 การตรวจสอบความสามารถในการจับกับเซลล์เป้าหมายด้วยวิธี Flow cytometer analysis

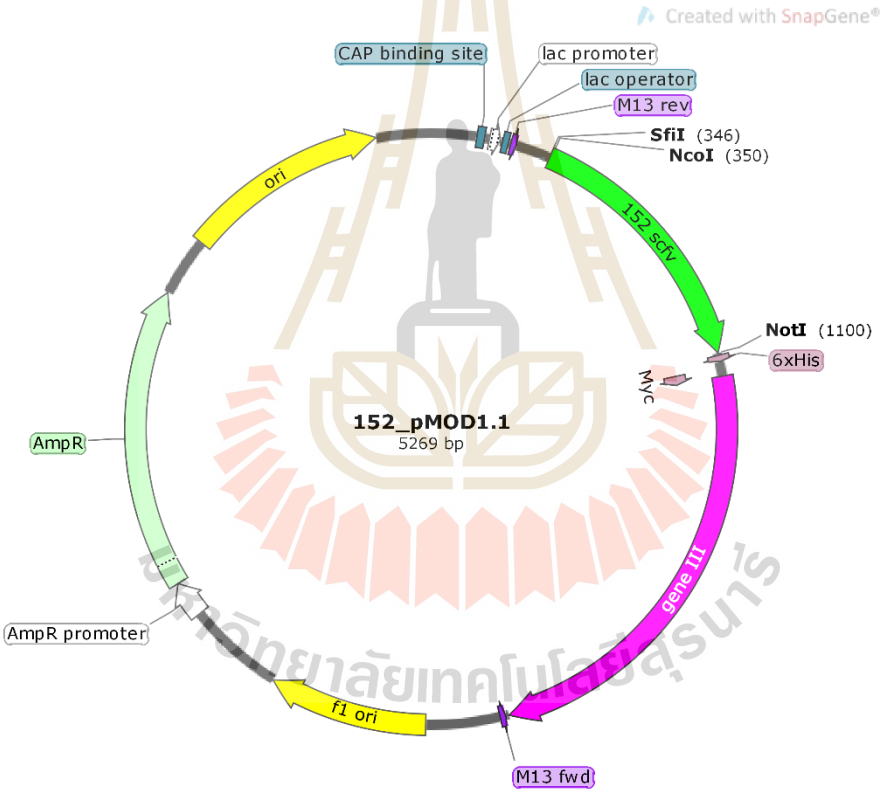
1. บล็อกเซลล์ HL-60 ด้วยแอนติบอดีมนุษย์ (human IgG) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
2. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
3. เติมน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนในด้านบนที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว (culture supernatant) ที่มีชิ้นแอนติบอดีอิสระ ปริมาณ 200 μl บ่มโดยแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
5. เติมตัวตรวจสอบ myc (rabbit anti-myc tag) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 ul แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
7. เติมตัวตรวจสอบ Donkey anti-Rabbit ที่เชื่อมกับสารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 647 nm. ที่เจือจาง 1:2,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 ul แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

8. ทำการวัดค่าความเข้มของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง flow cytometer
9. คัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการจับดี เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

ผลของการทดสอบการจับของชิ้นส่วนแอนติบอดีต่อเซลล์ HL-60 ด้วยคลัง Yamo ได้โคลนแอนติบอดีที่จับกับเซลล์ Hl-60 2 จาก 180 โคลน ที่มีลำดับดีเอ็นเอแตกต่างกัน

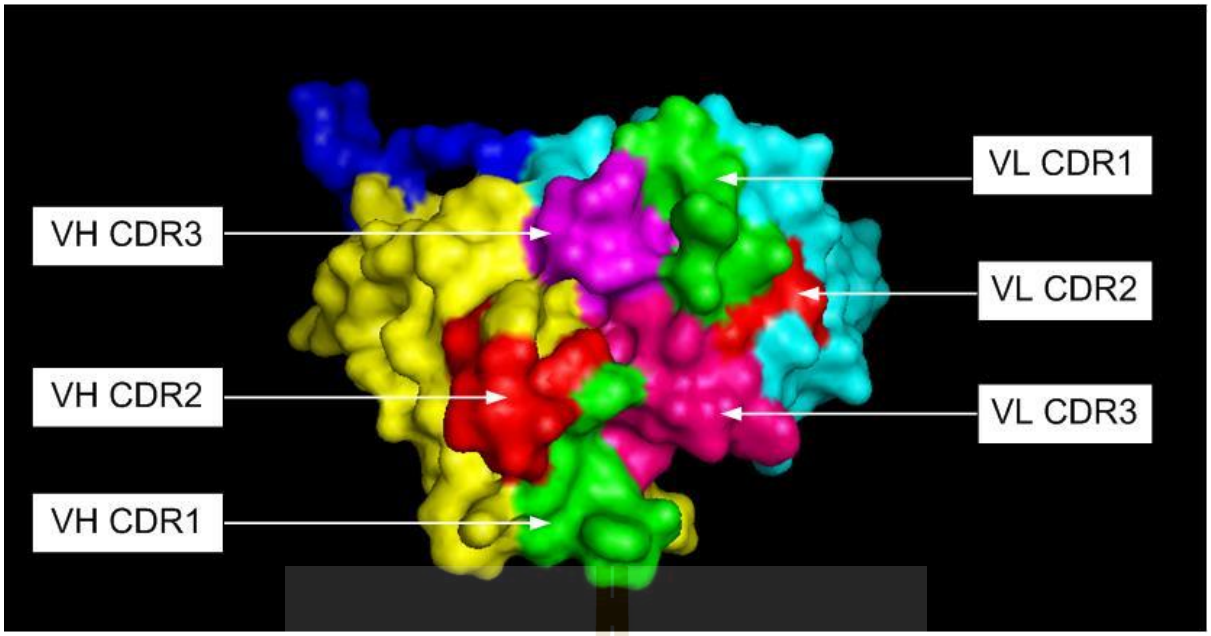
3.3 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอและโครงสร้างโปรตีน

ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอสามารถบ่งชี้ได้ว่า มีโคลนแอนติบอดี เพียง โคลน ตั้งชื่อว่า 152 ที่มีลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ คือมีองค์ประกอบของลำดับดีเอ็นเอชิ้นส่วนแอนติบอดีทั้งสายหนักและสายเบา (heavy chain variable fragment VH และ light chain variable fragment VL) ยีนดีเอ็นเอชิ้นส่วนแอนติบอดีนี้อยู่ในเฟจมิดเวคเตอร์ สามารถแสดงแผนผังของเฟจมิดเวคเตอร์นี้ดังภาพ



ภาพที่ 2 แผนผังลำดับส่วนประกอบของยีนในเฟจมิดเวคเตอร์

ลำดับสายดีเอ็นเอของแอนติบอดีนี้ได้ถูกเปลี่ยนเป็นสายโปรตีนและนำไปวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติด้วยโปรแกรม Pymol ปรากฏโครงสร้างสามมิติดังรูป

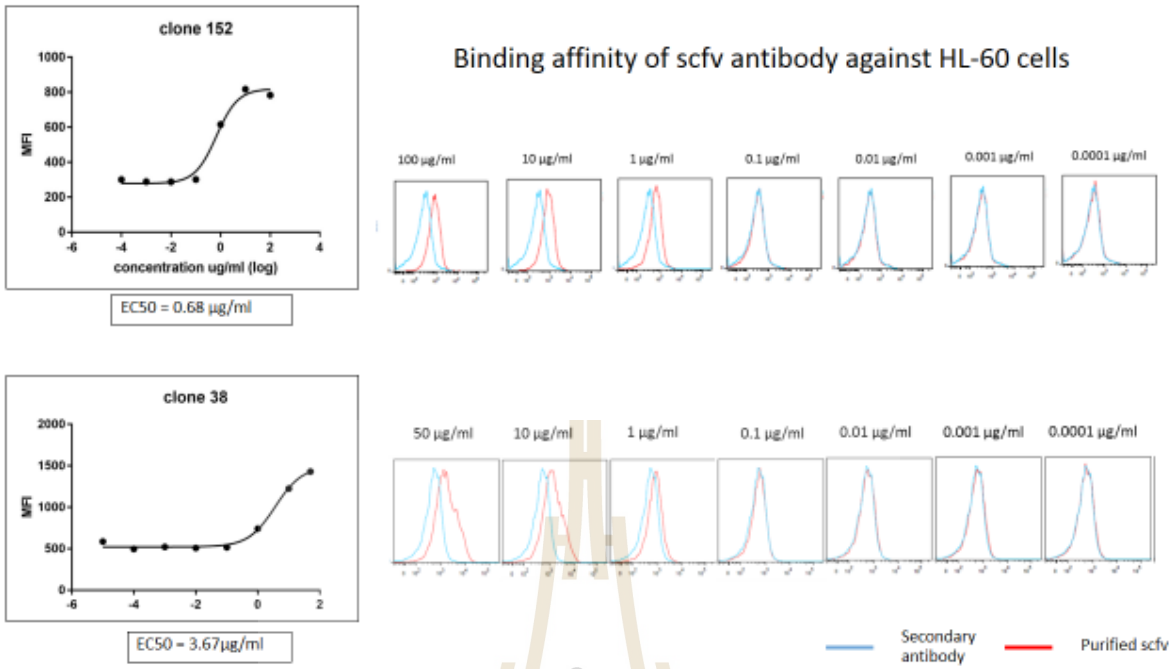


ภาพที่ 3 ภาพโคลงสร้างสามมิติของชิ้นส่วนแอนติบอดี

3.5 การตรวจสอบความสารถในการจับของชิ้นส่วนแอนติบอดี (Affinity binding test)

1. ชิ้นส่วนแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วที่ความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 100 μg/ml ถึง 0.0001 μg/ml ถูกบ่มพร้อมกับเซลล์ HL-60 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
5. เติมตัวตรวจสอบ myc (rabbit anti-myc tag) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 μl แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
7. เติมตัวตรวจสอบ Donkey anti-Rabbit ที่เชื่อมกับสารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 647 nm. ที่เจือจาง 1:2,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 μl แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
8. ทำการวัดค่าความเข้มของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง flow cytometer
9. สร้างกราฟและคำนวณความสามารถในการจับของชิ้นส่วนแอนติบอดีด้วยซอฟแวร์ GraphPad Prism

ผลการตรวจสอบความสารถในการจับของชิ้นส่วนแอนติบอดีปรากฏว่า โคลน 152 มีความสามารถในการจับเซลล์ HL-60 มากกว่า โคลน 38 ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ความสามารถในการจับของชิ้นส่วนแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 100 μg/ml ถึง 0.0001 μg/ml ต่อเซลล์ HL-60

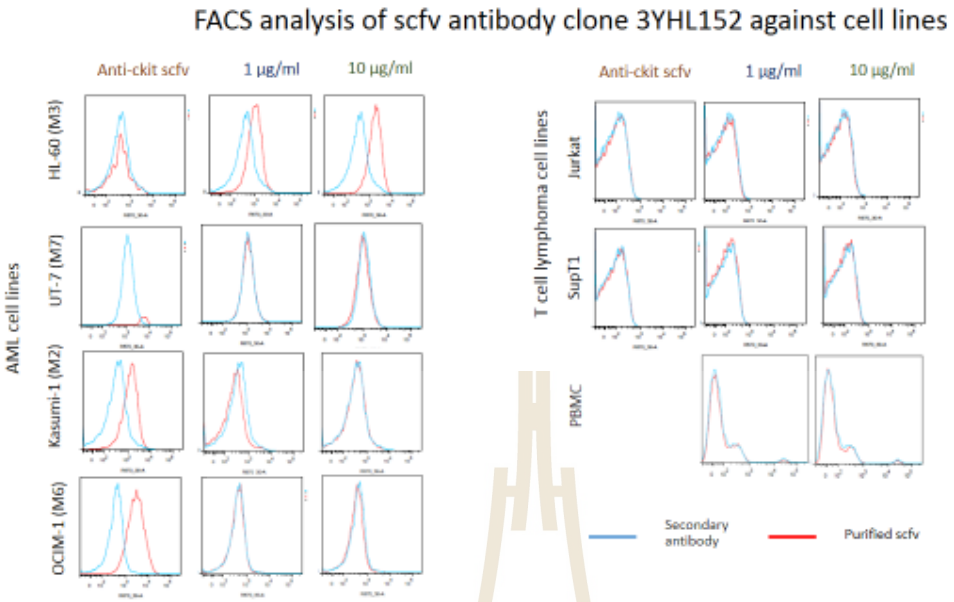
ค่า EC50 ของแอนติบอดีโคลน 152 มีค่าน้อยกว่าโคลน 38 จึงสามารถสรุปได้ว่า โคลน 152 สามารถจับกับเซลล์ HL-60 ได้แรงกว่าโคลน 38 ดังนั้นแอนติบอดีโคลน 152 นี้จึงถูกนำไปทดสอบความสามารถด้านต่างๆต่อไป

3.6 การตรวจสอบการจับจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายของชิ้นส่วนแอนติบอดี (Specific binding test)

1. เซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันจำนวน 4 เซลล์ไลน์ (HL-60, UT-7, Kasumi-1, OCIM-1) และเซลล์ไลน์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันและเม็ดเลือดขาวที่สกัดมาจากคนปกติ (Jurkat, SupT1, PBMC) ได้ถูกนำมาบ่มกับชิ้นส่วนแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 และ 10 μg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนน้ำแข็ง
2. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
3. เติมตัวตรวจสอบ myc (rabbit anti-myc tag) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 ul แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. เติมตัวตรวจสอบ Donkey anti-Rabbit ที่เชื่อมกับสารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 647 nm. ที่เจือจาง 1:2,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 ul แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที



6. ทำการวัดค่าความเข้มของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง flow cytometer

ผลการทดสอบความสามารถในการจับของชิ้นส่วนแอนติบอดีกับเซลล์ HL-60 แบบจำเพาะได้แสดงตามภาพที่ 3 ดังนี้

ภาพที่ 5 การตรวจสอบการจับจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายของชิ้นส่วนแอนติบอดี

สามารถสรุปได้ว่าชิ้นส่วนแอนติบดี โคลน 152 นี้สามารถจับเซลล์ HL-60 เท่านั้น ไม่จับกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นและไม่จับกับเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

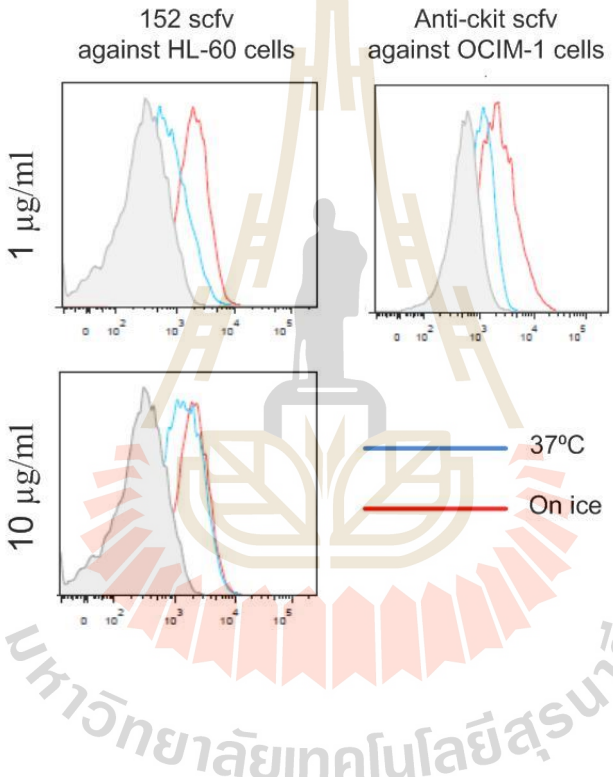
3.7 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีที่มีผลกระทบต่อเซลล์ (Biological activity)

3.7.1 การทดสอบความสามารถในการเข้าไปในเซลล์ (Internalization activity)

1. เซลล์ HL-60 ถูกแบ่งเป็นสองชุด ชุดแรกบ่มพร้อมชิ้นส่วนแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ชุดที่สองบ่มพร้อมชิ้นส่วนแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml บนน้ำแข็ง เซลล์ทั้งสองชุดถูกบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที

3. เติมตัวตรวจสอบ myc (rabbit anti-myc tag) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 ul แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
5. เติมตัวตรวจสอบ Donkey anti-Rabbit ที่เชื่อมกับสารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 647 nm. ที่เจือจาง 1:2,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 ul แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
6. ทำการวัดค่าความเข้มของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง flow cytometer

หมายเหตุ การทดลองนี้มี ชิ้นส่วนแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ c-kit บนเซลล์ OCIM-1 เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)



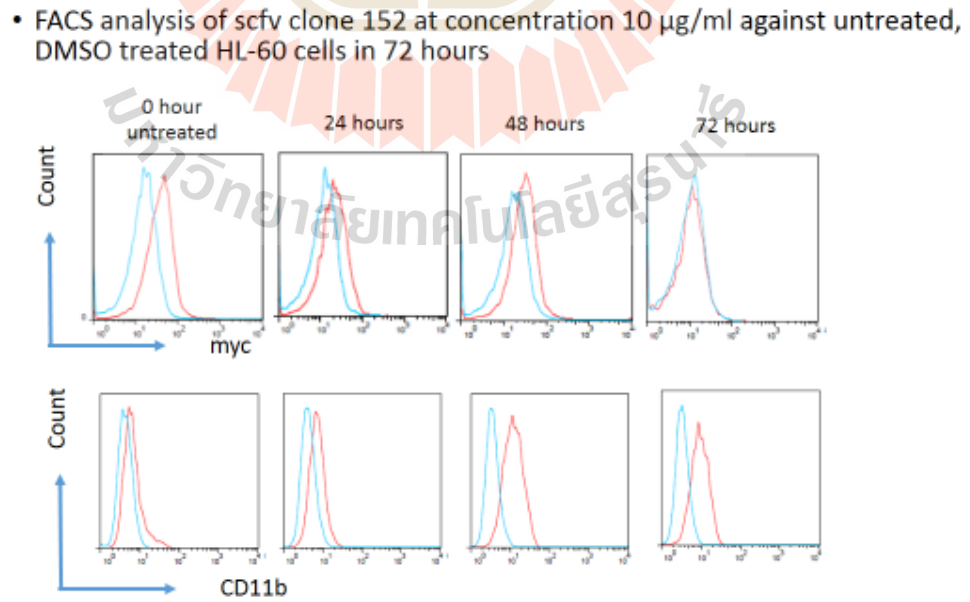
ภาพที่ 6 การทดสอบความสามารถในการเข้าไปในเซลล์ของชิ้นส่วนแอนติบอดี

ผลการทดลองปรากฏว่าเมื่อเปรียบเทียบสัญญาณการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนระหว่างเซลล์ที่บ่มด้วยชิ้นส่วนแอนติบอดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซสมีค่าลดลงต่างจากเซลล์ที่ใส่แอนติบอดีและบ่มที่บนน้ำแข็งจึงสรุปได้ว่าชิ้นส่วนแอนติบอดีอาจสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ด้วยกระบวนการ (endocytosis) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.7.2 การทดสอบความสามารถของชิ้นส่วนแอนติบอดีในการแยกแยะเซลล์ HL-60 ในสภาวะที่เป็นเซลล์ตัวอ่อน (immature stage) และสภาวะที่พัฒนาเป็นเม็ดเลือดขาวเต็มวัย (differentiated stage)

1. แบ่งเซลล์ HL-60 เป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกบ่มเซลล์HL-60 ด้วย 1.5% DMSO เป็นเวลา 72 ชั่วโมง กลุ่มที่สองไม่บ่ม และทำการตรวจสอบความสามารถในการจับกับเซลล์ของชิ้นส่วนแอนติบอดีของทั้งสองกลุ่มในทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยบ่มเซลล์กับชิ้นส่วนแอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 10 μg/ml
2. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
3. เติมตัวตรวจสอบ myc (rabbit anti-myc tag) ที่เจือจาง 1:1,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 μl แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ล้างเซลล์ด้วย 5 มล. 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปั่นตกที่ 350 g นาน 5 นาที
5. เติมตัวตรวจสอบ Donkey anti-Rabbit ที่เชื่อมกับสารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 647 nm. ที่เจือจาง 1:2,000 เท่าใน 0.1% BSA ที่ละลายใน PBS ปริมาณ 100 ul แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
6. เพื่อติดตามว่าเซลล์ที่ถูกบ่มด้วย DMSO นั้นพัฒนาเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวเต็มวัย แอนติบอดีต่อ CD11b ที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนสีเขียวถูกย้อมร่วมด้วยกับชิ้นส่วนแอนติบอดีในเซลล์เดียวกัน
7. ทำการวัดค่าความเข้มของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง flow cytometer



ภาพที่ 7 ผลของ Flow cytometer analysis เพื่อวัดความสามารถของชิ้นส่วนแอนติบอดีในการแยกแยะเซลล์ HL-60 ระหว่าง ระยะตัวอ่อนและระยะที่ถูกเหนี่ยวในให้เกิดการพัฒนาเม็ดเลือดขาวเต็มวัย

จากผลการทดลองจะพบว่าชิ้นส่วนแอนติบอดีสามารถจับกับเซลล์ที่เป็นเซลล์มะเร็งตัวอ่อน แต่เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้พัฒนากลายเป็นเม็ดเลือดขาวเต็มวัยแล้วชิ้นส่วนแอนติบอดีไม่สามารถจับกับเซลล์ได้

3.8 การดัดแปลงทางพันธุวิศวกรรมของชิ้นส่วนแอนติบอดี (Antibody engineering)

ชิ้นส่วนแอนติบอดีถูกพัฒนาเพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยตัดแต่งทางพันธุวิศวกรรมแอนติบอดีโดยเชื่อมกับสารฟลูออเรสเซนเรืองแสงสีเขียวในเวคเตอร์ที่เหมาะสำหรับการผลิตโปรตีนและใส่ในแบคทีเรียเฉพาะที่ช่วยในการผลิตโปรตีน

<u>ขั้นตอนที่ 1</u>

1. ตัดสายดีเอ็นเอของยีนชิ้นส่วนแอนติบอดีและเวคเตอร์มีสารเรืองแสงด้วยเอนไซน์ตัดจำเพาะ Nco-I และ Not-I เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. ทำชิ้นส่วนยีนที่ถูกตัดด้วยเอนไซน์ตัดจำเพาะให้บริสุทธิ์โดยผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า
3. เชื่อมต่อสายดีเอ็นเอของยีนแอนติบอดีกับเวคเตอร์ที่มีสารเรืองแสงด้วยเอนไซม์ไลเกส (Ligase)
4. ใส่ชิ้นส่วนยีนที่เชื่อมต่อกันเข้าแบคทีเรียโดยใช้ความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที และทำการเลี้ยงเชื้อลงในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมพลิซิลินเป็นตัวคัดเลือกแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนยีนที่เชื่อมต่อกัน
5. จิ้มโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี แอมพลิซิลินและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดที่ประกอบด้วยยีนแอนติบอดีและยีนสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ
6. ส่งพลาสมิดไปตรวจสอบลำดับเบสโดยบริษัทแมคโคเจนที่ประเทศเกาหลี
7. ตรวจสอบลำดับเบสด้วยซอฟแวร์

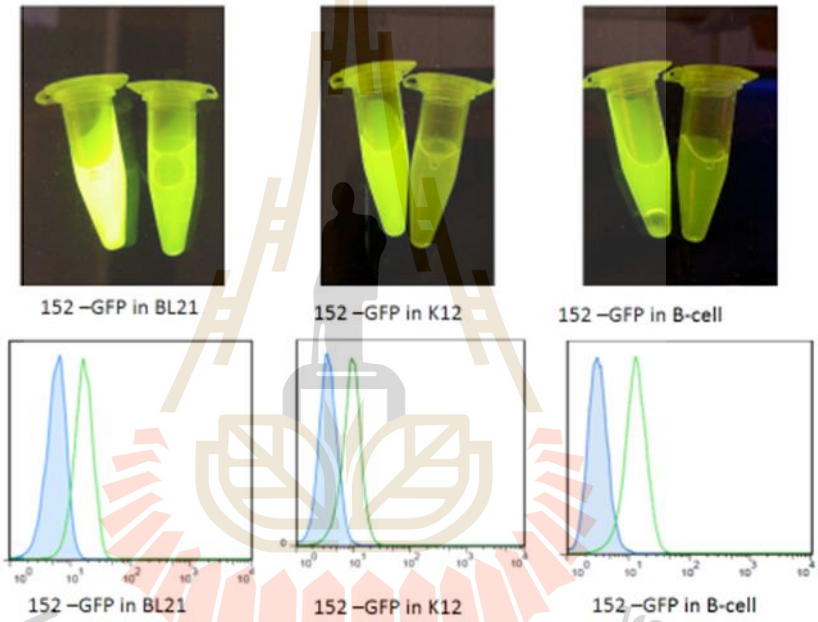
<u>ขั้นตอนที่ 2</u>

1. ใส่พลาสมิดที่มียีนแอนติบอดีและสารฟลูออเรสเซนในแบคทีเรียสำหรับผลิตโปรตีนด้วยวิธีผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซส เป็นเวลา 90 วินาที และทำการเลี้ยงเชื้อลงในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมพลิซิลินเป็นตัวคัดเลือกแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนยีนที่เชื่อมต่อกัน
2. จิ้มโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี แอมพลิซิลินและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน
3. ใส่เชื้อที่บ่มข้ามคืนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี แอมพลิซิลินและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าความเข้มของเซลล์ถึง 0.9 แล้วจึงเติม 0.4 mM IPTG และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน
4. ปั่นตกเซลล์แบคทีเรียและทำการแตกเอาโปรตีนภายในเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ปั่นตกโปรตีนและทำการทดสอบโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี flow cytometer analysis

การทดสอบนี้เป็นการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตโปรตีนแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสงสีเขียวในแบคทีเรียชนิดต่างกันจากภาพจะพบว่า แอนติบอดีที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. Coli* สายพันธุ์ BL21 สามารถเปล่งแสงของสารเรืองแสงได้มากที่สุดแต่แอนติบอดีที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ B-cell มีความสามารถในการจับกับเซลล์ HL-60 ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ดังนั้นแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ B-cell จึงเหมาะสำหรับการผลิตชิ้นส่วนแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสงสีเขียว



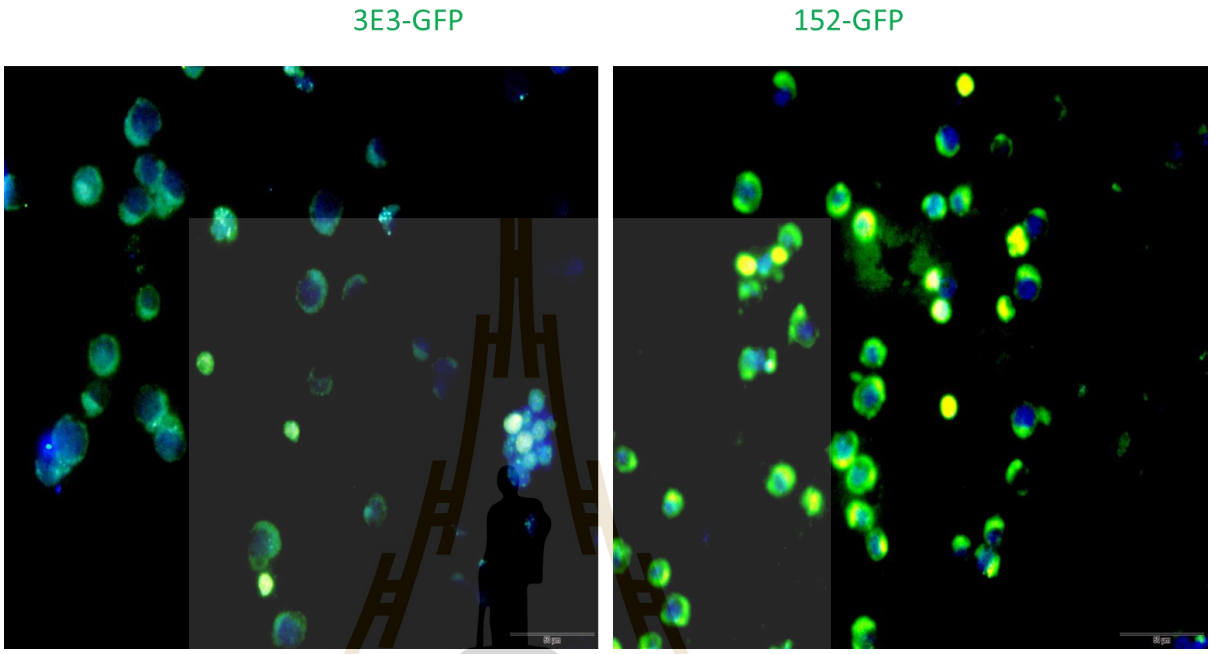
ภาพที่ 8 การทดสอบการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซสสีเขียวที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนแอนติบอดี

เมื่อได้แบคทีเรียที่เหมาะสมใน การผลิตชิ้นส่วนแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับโปรตีนเรืองแสงแล้วจึงทำการผลิตโปรตีนขึ้นในปริมาณที่เพิ่มขึ้นและทำการย้อมกับเซลล์ HL-60 และส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ โดยข้อดีของการติดสารเรืองแสงเข้ากับชิ้นส่วนแอนติบอดีคือสามารถลดขั้นตอนการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิซึ่งจะสามารถลดเวลาในการย้อมเซลล์ลงได้ ขั้นตอนการย้อมเซลล์จะแสดงรายละเอียดด้านล่าง

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การย้อมเซลล์ด้วยชิ้นส่วนแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสง

1. นับจำนวนเซลล์ $2x10^6$ เซลล์ต่อหนึ่งการทดลอง
2. ล้างเซลล์และบล็อกด้วย human IgG เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. ล้างและทำการตรึงเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4. ล้างและใส่ชิ้นส่วนแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสงลงไปบ่มกับเซลล์ เป็นเวลา 2 ชม. บนน้ำแข็ง
5. ล้างและย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI
6. ล้างและหยอดเซลล์ลงบนสไลด์แก้วพร้อมทั้งใส่สารชะลอการจางของสีเรืองแสง
7. ปิดด้วย cover slide และเพื่อการเก็บรักษาสไลด์ได้นานขึ้นทาขอบ cover slide ด้วยน้ำยาทาเล็บแบบใส เก็บสไลด์ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ส่องกล้อง



ภาพที่ 9 เซลล์ HL-60 ถูกย้อมด้วยสารฟลูออเรสเซนสีเขียวที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนแอนติบอดีและส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงฟลูออเรสเซนส์

ผลการทดลองจะเห็นว่าแอนติบอดีที่จับแบบจำเพาะต่อเซลล์ HL-60 ที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสงจับที่ผิวของเซลล์และในการทดลองนี้ได้ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับสารอะฟลาทอกซิน (3E3-GFP) นำมาเชื่อมต่อกับสารเรืองแสงเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) จะเห็นว่าในการส่องแสงฟลูออเรสเซนที่เท่ากันแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์ HL-60 สามารถเปล่งแสงออกมาได้มากกว่าตัวควบคุมเชิงลบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4 : บทสรุป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน AML เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดแบบเฉียบพลันที่พบได้มากที่สุด และผู้ป่วยด้วยโรคนี้ยังมีอัตราการตายสูงมาก คือร้อยละ ๕๐ ในผู้ป่วยที่ยังอายุน้อย และ มากถึงร้อยละ ๘๐ ในผู้ป่วยที่อายุมากกว่า ๖๐ ปี แม้ในปัจจุบันจะมีวิธีการรักษาแบบ chemotherapy และการปลูกถ่าย stem cell ที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคิดค้นพัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่ที่มุ่งเป้าไปยังโมเลกุลจำเพาะบนเซลล์เป้าหมาย (targeted therapy) ที่เป็นเซลล์ก่อโรคที่แท้จริง เพื่อลดอาการข้างเคียงของยาซึ่งมีอันตรายสูง และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาได้ดียิ่งขึ้น วิธีการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ชนิดเฉียบพลันในปัจจุบัน ต้องใช้เคมีบำบัด ซึ่งก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เจ็บปวดทรมานจากการทำลายเซลล์ปกติในร่างกายสูง และพบว่ามีอัตราการเกิดโรคซ้ำ ได้บ่อย จากเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดที่ยังคงหลงเหลืออยู่ วิธีการรักษาแนวใหม่ที่มีศักยภาพ และกำลังมีการดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ differentiation therapy, epigenetic therapy และ immunotherapy (Dombret, H. and C. Gardin, 2016). ในบรรดาวิธีการเหล่านี้ antibody therapy หรือวิธีการกำจัดเซลล์มะเร็งด้วยวิธีจับแบบจำเพาะโดยใช้แอนติบอดี เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคแบบมุ่งเป้าแนวใหม่ ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสร้างคลังเฟจแอนติบอดี โดยใช้เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน ที่หายแล้ว (complete remission) เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนยีนแอนติบอดี เรียกคลังที่ได้สร้างขึ้นนี้ว่า Yamo-AML และใช้ cell line AML ชนิด HL-60 เป็นเซลล์เป้าหมายในการทำการคัดเลือกหาแอนติบอดีที่จำเพาะ เนื่องจากเซลล์ HL-60 นี้ถูกแยกจากคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (J. Collins, C. Gallo, & E. Gallagher, 1977) และได้ถูกใช้เป็นที่แพร่หลายในการทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาและกลไกการพัฒนาเซลล์จากระยะตัวอ่อนสู่เซลล์ตัวเต็มวัย(Birnie, 1988; Newburger, Chovaniec, Greenberger, & Cohen, 1979) ทั้งนี้เซลล์นี้ยังถูกจัดอยู่ในชนิด M2 จาก FAB classification (M0-M7) (Quentmeier et al., 2005) ซึ่ง AML ชนิดนี้ได้ถูกรายงานว่ามีอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงที่สุด ("American Cancer Society Cancer, Facts & Figures 2017," 2017) เซลล์ HL-60 ยังมีรายงานว่าแสดงออกโปรตีนบนผิวเซลล์ CD33 ซึ่งพบมากในผู้ป่วย AML แต่พบน้อยในคนปกติ (Krupka et al., 2013) ดังนั้นจึงเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจในการหาแอนติบอดีต่อเซลล์นี้ ผลจากการวิจัย พบว่าสามารถคัดเลือกเฟจที่แสดงแอนติบอดีที่จับต่อเซลล์เป้าหมาย HL-60 จากคลังได้ แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นชิ้นส่วนแอนติบอดีอิสระ scFv พบว่าแอนติบอดีนี้ไม่สามารถจับกับเซลล์เป้าหมาย HL-60 แม้จะได้พยายามใช้เวลาปรับเปลี่ยนวิธีการคัดหาแอนติบอดี (biopanning) อยู่เป็นเวลานาน ซึ่งแสดงว่าแอนติบอดีต้องการผิวเฟจร่วมด้วยในการจับกับเซลล์ HL-60 ซึ่งแสดงว่าการทำ biopanning ด้วยเทคโนโลยีเฟจนั้นไม่มีปัญหา แต่ไม่สามารถนำโคลนแอนติบอดีที่คัดหามาใช้ต่อไปได้ ความล้มเหลวในการคัดเลือกแอนติบอดีจากคลังผู้ป่วย Yamo-AML นี้ อาจเนื่องมาจากความหลากหลายและขนาดของคลังไม่ใหญ่พอ เนื่องจากในตอนสร้างคลังนักวิจัยผู้สร้างยังมีประสบการณ์น้อย และอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการยังไม่ดีพอ อีกทั้งอาจเป็นเพราะลักษณะ

โครงสร้างของยีนของแอนติบอดีของผู้ป่วยที่ใช้เป็นต้นแบบในการสร้างโมเลกุลแอนติบอดีนั้น เป็น B cell ที่มีความผิดปกติเป็นส่วนใหญ่ คือไม่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีโครงสร้างสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงไม่ประสบความสำเร็จในการคัดหาแอนติบอดีที่มีความสามารถจับกับเซลล์เป้าหมายได้ ดังนั้นในขั้นต่อไปผู้วิจัยจึงเปลี่ยนไปคัดหาจากคลังเฟจ แอนติบอดีที่สร้างจากเม็ดเลือดขาวของคนปกติแทน (คลังย่าโม ๑) ด้วยวิธีการ biopanning ที่ใช้กับคลัง Yamo-AML ซึ่งคลัง ย่าโม ๑ นี้เป็นคลังเฟจที่แสดงแอนติบอดีมนุษย์ส่วน scFv ที่ได้สร้างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการของหัวหน้าโครงการ โดยใช้ยีนต้นแบบสำหรับสร้างโมเลกุลแอนติบอดีจากอาสาสมัครสุขภาพดี 140 คน มีชื่อเรียกว่า คลังย่าโม ๑ เป็นคลังที่ความหลากหลาย $5x10^8$ ซึ่งสูงกว่าคลัง Yamo-AML ที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้ ผลการคัดเลือกแอนติบอดีที่สามารถจับกับเซลล์ HL-60 จากคลัง ย่าโม๑ พบว่าได้แอนติบอดี 2 โคลน และเมื่อนำแอนติบอดีทั้ง 2 มาตรวจสอบความแรงในการจับเซลล์เป้าหมายด้วยวิธีการ FACS พบว่าแอนติบอดีโคลน 152 หรือ scFv-152 แสดงความสามารถในการจับได้ดีกว่าผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้แอนติบอดีโคลนนี้เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อเซลล์เป้าหมายต่อไป โดยผู้วิจัยสามารถทำการผลิตแอนติบอดี scFv-152 ออกจากแบคทีเรีย *E. coli* ได้ในปริมาณมาก และใช้เวลาเพียง 2 วัน ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตแอนติบอดี scFv ของแบคทีเรีย *E. Coli* สองสายพันธุ์คือ TG1 และ HB2151 ผลปรากฏว่าแบคทีเรีย *E. Coli* สายพันธุ์ HB2151 สามารถผลิตได้มากกว่า เมื่อได้แอนติบอดีปริมาณมากพอจึงนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา และความจำเพาะต่อเซลล์ โดยได้นำแอนติบอดี scFv-152 มาทดสอบความสามารถในการจับกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสี่ชนิดซึ่งถูกจัดอยู่คนละประเภทของ FAB classification ได้แก่ HL-60, OCIM-1, Kasumi-1 และ UT7 รวมทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิดอื่น และเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ ผลปรากฏว่าแอนติบอดี scFv-152 สามารถจับแบบจำเพาะต่อเซลล์ HL60 เท่านั้น โดยชิ้นส่วนแอนติบอดี (single chain variable fragment, scFv) นั้น มีขนาดเล็กจึงมีข้อดีกว่าแอนติบอดีเต็มตัว (IgG) คือสามารถเข้าไปในเซลล์ (internalize) ได้ดีกว่า จึงอาจสามารถใช้เป็นตัวพาสารพิษเข้าเซลล์เพื่อทำลายเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งเมื่อผู้วิจัยได้ทดสอบความสามารถในการเข้าไปในเซลล์ HL-60 ของแอนติบอดีโคลน หโอ-152 พบว่าชิ้นส่วนแอนติบอดีนี้ สามารถเข้าไปในเซลล์ได้จริง จึงแสดงว่าแอนติบอดี scFv-152 นี้อาจสามารถนำไปพัฒนาให้กลายเป็นยาสำหรับทำลายเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนั้นแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการจับของแอนติบดี scFv-152 กับเซลล์ HL-60 เพิ่มเติม เนื่องจากเซลล์ HL-60 มีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถเปลี่ยนจากระยะเซลล์ตัวอ่อนเป็นเซลล์เม็ดเลือดตัวเต็มวัยเมื่อถูกกระตุ้นด้วย DMSO ได้ แอนติบอดี scFv-152 จึงถูกนำมาทดสอบความสามารถในการแยกระยะของการเจริญเติบโตจากเซลล์มะเร็งตัวอ่อนและเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวเต็มวัย ผลการศึกษาพบว่า แอนติบอดี scFv-152 ที่สร้างขึ้นได้จากโครงการวิจัยนี้สามารถจับเฉพาะกับเซลล์ HL-60 ระยะตัวอ่อน เท่านั้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจ จึงควรที่จะได้ทำการวิจัยเพิ่มเติม เพื่อศึกษาเพิ่มเติมว่าโมเลกุลบนผิวเซลล์ HL-60 ที่จับจำเพาะต่อแอนตอบอดี scFv-152 นี้ มีโครงสร้างและคุณสมบัติเป็นอย่างไรต่อไป เพื่อความเข้าใจเชิงลึกในระดับโมเลกุลของกระบวนการการพัฒนาเซลล์ในระบบเม็ดเลือดของมนุษย์ และการพัฒนายารักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีประสิทธิภาพดีอีกด้วย นอกจากนั้นแล้วผู้วิจัยยังได้ทำการการดัดแปลงทางพันธุวิศวกรรมแอนติบอดีด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล ให้ชิ้นส่วนแอนติบอดี scFv-152 เชื่อมเข้ากับโปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียวได้เป็นโมเลกุลแอนติบอดี scFv-152-GFP แล้วผลิตออกมาจากแบคทีเรีย *E coli* แล้วจึงนำไปย้อมเซลล์ HL-60 ผลที่ได้คือพบว่า

แอนติบอดี scFv-152-GFP สามารถจับกับเซลล์ HL-60 ได้ จากการตรวจสอบภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์ การดัดแปลงโดยเชื่อมต่อแอนติบอดีกับสารฟลูออเรสเซนส์นี้สามารถทำให้ขั้นตอนการย้อมสีเซลล์สะดวกและรวดเร็วขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจสอบเซลล์มะเร็งในโรงพยาบาลได้ในอนาคต

โดยสรุป ผู้วิจัยสามารถผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจ 1 ชนิดคือ แอนติบอดี scFv-152 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงมาก คือจับจำเพาะกับเซลล์ AML ชนิด HL-60 ในระยะที่เป็นตัวอ่อน (immature) เท่านั้นเมื่อจับแล้ว แอนติบอดีสามารถเคลื่อนเข้าไปในเซลล์ได้ ผู้วิจัยจะได้ทำการจดสิทธิบัตรแอนติบอดีนี้ เพราะมีศักยภาพในการนำไปเป็นยารักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบมุ่งเป้าได้ นอกจากนั้นแล้ว ยังอาจนำเอาไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ และกลไกการเจริญเติบโตและพัฒนาเซลล์ในระบบโลหิต และระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ต่อไปได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Abbas, K. A., Lichtman, H. A., and Pillai, S. (2007): Cellular and Molecular Immunology 6th edition: The immune system in defense and disease. Elsevier. Pennsylvania.

American Cancer Society (2009), Medical Reviews [On-line].

Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A., and Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88 (18): : 7978–7982.

Birnie, G. D. (1988). "The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation." Br J Cancer Suppl 9: 41-45. Borghesi, L., and Milcarek, C. (2006). From B cell to plasma cell. mmunological Reviews. 36: 27-32.

Caron, M., Choquet-Kastylevsky, G., and Joubert-Caron, R. (2007). Cancer Immunomics Using Autoantibody Signatures for Biomarker Discovery. Molecular&Cellular Proteomics. 6: 1115-1122.

Collins, S. J., R. C. Gallo and R. E. Gallagher (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." Nature 270(5635): 347-349.

Disis, M. L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A. E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E., Livingston, R. B., Moe, R., and Cheever, M. A. (1994). Exixtent T-Cell and Antibody Immunity to HER-2/neu Protein in Patients with Breast Cancer. Cancer Research. 54: 16-20.

Dubel, S. (2007): Handbook of Therapeutic Antibody. Wiley-VCH.

Dombret, H. and C. Gardin (2016). "An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia." Blood 127(1): 53-61.

Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., and Hughes-Jones, N. C. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. EMBO Journal. 12: 725-734.

Hoogenboom, H. R. (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. Trends in Biotechnology. 15: 62-70.

Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., and Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage:

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains Nucleic Acids Research. 19(15): 4133-4137.

Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. New England Journal of Medicine. 357: 39-51.

Kaufman, D. W., Anderson, T. E., and Issaragrisil, S. (2009). Risk factors for leukemia in Thailand. Annual Hematology. 68: 1079-1088.

Kay, B. K., Winter, J., and McCaffererty, J. (1996): Phage display peptide and proteins: laboratory manual. Acadimic press. San diago.

Kristensen, P., and Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. Folding and Design. 3(5): 321-328.

Krupka, C., P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, J. Bogeholz, T. Kohnke, F. S. Lichtenegger, S. Schneider, K. H. Metzeler, M. Fiegl, K. Spiekermann, P. A. Baeuerle, W. Hiddemann, G. Riethmuller and M. Subklewe (2014). "CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330." Blood 123(3): 356-365.

Lübbert, M., Müller-Tidow, C., Hofmann, W. K., and Koeffler, H. P. (2008). Advances in the treatment of acute myeloid leukemia: From chromosomal aberrations to biologically targeted therapy. Journal of Cellular Biochemistry. 104(6): 2059-2070.

Marks, C., and Marks, J. D. (1996). Phage libraries. A new route to clinically useful antibodies. The New England Journal of Medicine. 335(10): 730-733.

McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., and Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature Medicine. 348(6310): 552-554.

Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., and Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. BMC Biotechnology. 9(1): 6.

Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindqvist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J. C., and Marks, J. D. (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: The production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95(11): 6157-6162.

Sievers, E. L. (2001). Efficacy and safety of germtuzumab ozogomicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. Expert Opinion on Biological Therapy. 1: 893-901.

Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 228(4705): 1315-1317.

Stein, C., Kellner, C., Kügler, M., Reiff, N., Mentz, K., Schwenkert, M., Stockmeyer, B., Mackensen, A., and Fey, G. H. (2010). Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells. British Journal of Haematology. 148: 879-889.

Thie, H., Meyer, T., Schirrmann, T., Hust, M., and Dubel, S. (2008). Phage Display Derived Therapautic Antibodies. Current Pharmaceutical Biotechnology. 9: 439-445.

Tong, H., Lu, C., Zhang, J., Liu, Z., and Ma, Y. (2009). Immunophenotypic, cytogenetic and clinical features of 192 AML patients in China. Clinical and Experimental Medicine. 9: 149-155.

Udomsakdi-Auewarakul, C., Promsuwicha, O., U-Pratya, Y., Pattanapanyasat, K., and Issaragrisil, S. (2003). Immunophenotypic profile of adult acute myeloid leukemia (AML): analysis of 267 cases in Thailand. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 21: 153-160.

Udomsakdi-Auewarakul, C., Tocharoentanapol, C., Wanachiwanawin, W., and Issaragrisil, S. (2004). Monosomy 7 in patients with aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with evolution into acute myeloid leukemia. Journal of the Meducal Associateion of Thailand. 87: 717-721.

Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J., and Johnson, K. S. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. Nature Biotechnology. 14: 309-314.

Newburger, P. E., M. E. Chovaniec, J. S. Greenberger and H. J. Cohen (1979). "Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation." J Cell Biol 82(2): 315-322.

Quentmeier, H., M. P. Martelli, W. G. Dirks, N. Bolli, A. Liso, R. A. Macleod, I. Nicoletti, R. Mannucci, A. Pucciarini, B. Bigerna, M. F. Martelli, C. Mecucci, H. G. Drexler and B. Falini (2005). "Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin." Leukemia 19(10): 1760-1767.

Wadia, P. P., Coram, M., Armstrong, R. J., Mindrinos, M., Butte, A. J., and Miklos, D. B. (2010). Antibodies specifically target AML antigen NuSAP1 after allogeneic bone marrow transplantation. Blood. 115: 2077-2087.

Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., and Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. Annual Review of Immunology. 12: 433-455.

มณฑารพ ยมาภัย: เอกสารคำสอน: เรื่อง การผลิต โมโนโคลนอล แอนติบอดี ด้วยเทคโนโลยีฟาจ พิมพ์ที่ สานักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มทส นครราชสีมา: สานักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มทส; 109 หน้า, 2551.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร

ผลงานวิจัยนี้ ได้ใช้เป็นส่วนหนึ่งวิทยานิพนธ์ ของนักศึกษาปริญญาเอก 1 คน คือ นางสาว ฐิติมา สัมพันธ์อภัย

ภาคผนวก ก การเผยแพร่ผลงาน

ผลงานจากโครงการนี้ ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ ดังนี้

ก. งานประชุมระดับนานาชาติ

1. Sumphanapai T. and Yamabhai M., Construction of phage display antibody library from Acute Myeloid Leukemia (AML) patient, The 2nd Biotechnology International Colloquium, 25th-29th September, 2013. At Suranaree University of technology, Thailand (Poster presentation)
2. Sumphanapai T. and Yamabhai M., Production of recombinant scFv antibody against acute myeloid leukemia (AML) cell lines. The 3rd Biotechnology International Colloquium, 1st-3rd September, 2014. At Suranaree University of technology, Thailand (Oral presentation)
3. Sumphanapai T. and Yamabhai M., Construction of phage display antibody library from Acute Myeloid Leukemia (AML) patient. The RGJ-Ph.D. Congress XVI, 11th -13th, 2015. At Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pattaya, Thailand (Poster presentation)
4. Sumphanapai T. and Yamabhai M., Selection of scFv antibody specifically bound to AML cell line by the human naïve phage display scFv antibody library. The 5th RGJ congress and seminar series 118, 1st -2nd May, 2017. At Suranaree University of technology, Thailand (Poster presentation)

ข. ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ (ดังแนบท้ายรายงานวิจัยนี้)

ยังไม่มี (แต่จะมีต่อไป)

ค. สิทธิบัตร

ยังไม่มี (แต่จะมีต่อไป)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การประเมินผลหลังสิ้นสุดการวิจัย

รายงานการวิจัย เรื่อง การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ ชนิดเฉียบพลัน (เอ เอ็ม แอล)

หัวข้อ	ไม่สามารถประเมินผลได้*	ความเห็นในการประเมินผล (P) (ระดับคะแนน A=1.0, B=0.8, C=0.6, D=0.4, E=0.2, F=0.0)	น้ำหนักคะแนน (X)	คะแนนรวม (PX)
1. การบรรลุวัตถุประสงค์หลักของการวิจัย		1	20	20
2. ความมีคุณค่าของผลการวิจัย		1	20	20
3. ความคุ้มค่าของผลการวิจัย		1	20	20
4. ผลลัพธ์ของการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์		0.8	15	12
5. การเผยแพร่ผลการวิจัยและทรัพย์สินทางปัญญาที่เกิดจากการวิจัย		0.8	15	12
6. ผลกระทบ (Impacts) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้		0.8	10	8
รวม			100	92

หมายเหตุ : * โปรดระบุสาเหตุที่ไม่สามารถประเมินได้ .....

.....

ผลสรุปคุณภาพโดยรวมของผลการวิจัย

Σ PX	=	88 – 100	☑ ดีมาก
		75 – 87	☐ ดี
		62 - 74	☐ ดีพอใช้
		50 - 61	☐ พอใช้
		< 50	☐ ควรปรับปรุง

สรุปผลการพิจารณา

☑ ยอมรับโดยไม่มีการแก้ไข (Accepted as it is)

☐ ยอมรับโดยแก้ไขเล็กน้อย (Accepted with minor revisions)

☐ แก้ไขรายละเอียดสำคัญในเนื้อหาและส่งกลับให้พิจารณาใหม่ (Major revisions)

☐ ปฏิเสธ (Rejected)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ข้อเสนอแนะของผู้ประเมินผลจากการพิจารณาร่างรายงานการวิจัย

(ระบุประเด็น/เรื่องที่ควรปรับปรุงแก้ไขในร่างรายงานการวิจัย)

เป็นงานวิจัยที่ดีมาก ควรสนับสนุนต่อยอดนำไปใช้ประโยชน์ต่อในชุมชนได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัยหลัก

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ 8 มกราคม 2510 เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. 2532 แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา 1 ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี 2536 ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา 9 เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. 2541 จากนั้นในปี พ.ศ. 2543-2545 ได้ทุนไปทำ postdoctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. 2546-2547 ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Insititute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธรัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ดิฏฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2547 และมีบุตร 1 คน ชื่อ ด.ญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นศาสตราจารย์ และหัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering)

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทร 044 224152-4 224234 หรือ 244388 โทรสาร 044 224150

Email: montarop@g.sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี