เธ เธ มิน : วิศวกรรมแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรีย เพื่อการรักษาและตรวจวินิจฉัย (ENGINEERING ANTI-BACTERIAL ANTIBODIES FOR THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC PURPOSES) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย, 229 หน้า.

แอนติบอดีสามารถใช้เป็นยารักษาโรค ตั้งแต่ในช่วงคริสตศักราช 1980 ที่มีการใช้เซรั่มซึ่งประกอบด้วยแอนติบอดีแบบโพลีโคลนอลในการรักษา ก่อนที่จะไม่ได้รับความนิยมเนื่องจากความซับซ้อนของเซรั่ม และมีการค้นพบยาปฏิชีวนะ จนเมื่อมีการพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตแอนติบอดีแบบโมโนโคลนอล (monoclonal antibody) ในปี 1975 และการใช้เทคโนโลยีเฟจ ซึ่งได้เริ่มขึ้นตั้งแต่ปี 1990 เพื่อการตรวจวิเคราะห์ และรักษา จนถึงในปัจจุบัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ถูกใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในการรักษาโรคมะเร็ง และกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง แต่แอนติบอดีสำหรับใช้ในการรักษาโรคติดต่อ (infectious diseases) ชนิดต่าง ๆ นั้นยังมีไม่มากนัก ดังนั้น ในการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ว่าแอนติบอดีชนิดเส้นเดี่ยวส่วนแปรผันสูง (scFv) ที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเทคโนโลยีเฟจนั้น สามารถใช้ในการรักษา และการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวก คือ โพรพิโอนิแบคทีเรียม แอคเน่ (*Propionibacterium acnes*) และแบคทีเรียแกรมลบ คือ ซูโดโมแนส เอโรจิโนซ่า (*Pseudomonas aeruginosa*) จากการคัดเลือกแอนติบอดีโดยใช้คลังย่าโม 1 ซึ่งเป็นคลังที่แสดงชิ้นแอนติบอดีมนุษย์ส่วน scFv บนโปรตีนปกคลุมผิว เป็นแหล่งในการคัดเลือกแอนติบอดีนั้น พบว่าสามารถคัดเลือกแอนติบอดี scFv ที่จับจำเพาะต่อเชื้อ *P. acnes* และ *P. aeruginosa* จำนวน 3 และ 1 โคลน ตามลำดับ โดยแอนติบอดี ต่อเชื้อ *P. acnes* ชื่อโคลน yPac1A8 และ แอนติบอดี ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ชื่อโคลน yPgi3G4 ได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อยืนยันคุณสมบัติการจับจำเพาะด้วยวิธีการต่าง ๆ 6 วิธีคือ วิธีอีไลซ่า, เวสเทอร์นบลอต, โฟลไซโตเมตรี, การส่องดูผ่านกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล กล้องจุลทรรศน์ เดลต้าวิชั่น อัลตร้า และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน จากนั้นเมื่อนำแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. acnes* yPac1A8 มาทดสอบด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยอิมมูน พบว่าแอนติบอดีจับกับโปรตีนชื่อ แคมพ์ แฟคเตอร์ 1 ของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* จากนั้นแอนติบอดีทั้งสองโคลนนี้ได้ถูกนำมาตัดต่อทางพันธุวิศวกรรมเพื่อเชื่อมต่อกับโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ชนิด EmGFP เพื่อใช้การในการทดลองย้อมสีทางอิมมูนแบบขั้นตอนเดียว นอกจากนี้แล้วแอนติบอดียังถูกนำมาเชื่อมต่อกับโปรตีน ไบโอติน ของเชื้อแบคทีเรีย เอสเชอริเชียโคไล (*Escherichia coli*) ได้สำเร็จ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อได้ในอนาคต สุดท้ายนี้แอนติบอดี scFv ทั้งสองโคลนนี้ได้ถูกทำพันธุวิศวกรรมแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีชนิดเต็มรูปแบบ คือ IgG แล้วนำไปใช้ในการศึกษาผลทางชีววิทยาของแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรีย ในรูปแบบต่างๆ คือ กระบวนการเกาะกลุ่มของเซลล์ การทำลายเซลล์ผ่านกระบวนการกระตุ้นปฏิกริยาคอมพลีเมนต์

และการตรึงแบคทีเรียให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิด แมโครเฟจ กิน ผลการศึกษาเหล่านี้แสดงว่า แอนติบอดี yPac1A8 และ yPgi3G4 มีศักยภาพที่จะถูกนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการรักษาในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา Thae

ปีการศึกษา 2563 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

THAE THAE MIN : ENGINEERING ANTI-BACTERIAL ANTIBODIES FOR THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC PURPOSES. THESIS ADVISOR : PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 229 PP.

SINGLE CHAIN FRAGMENT VARIABLE/AFFINITY SELECTION/GRAM-POSITIVE/GRAM-NEGATIVE BACTERIA/SCFV LIBRARY

Antibodies have been used as therapeutic agents. Polyclonal serum therapy started in the 1890s and soon became obsolete because of its complications and the discoveries of antibiotics. After the introduction of monoclonal antibody technology in 1975 and that of phage display antibody technology in 1990, antibodies are once again regarded as therapeutic agents. Nowadays, monoclonal antibodies for cancer and non-communicable diseases are the best-selling drugs on pharmaceutical market. But there are very few antibody biologics available for infectious diseases. This study aimed to prove that single chain fragment variables (scFv) obtained by affinity selection (biopanning) can be engineered into therapeutic and diagnostic agents for bacterial infections using one Gram-positive (*Propionibacterium acnes*) and one Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*) model bacteria and the Yamo-I phage display human scFv library. Three anti-*P. acnes* scFv and one anti-*P. aeruginosa* scFv were identified. Two scFv, yPac1A8 (anti-*P. acnes* scFv) and yPgi3G4 (anti-*P. aeruginosa* scFv) were further studied. Their specific binding property was confirmed by ELISA, Western Blot, flow cytometry, confocal microscopy, deltavision ultra microscopy, and electron microscopy. Anti-*P. acnes* scFv, yPac1A8, was used to immunoprecipitate its target, CAMP factor 1, from *P. acnes*. Both scFv were subcloned to conjugate with EmGFP

and used as a one-step immunostaining reagent. Moreover, both scFv were engineered to couple with the biotin carboxyl carrier protein of *Escherichia coli* and successfully biotinylated for future applications. Finally, both scFv were engineered to become full-length IgG for three functional assays; namely, agglutination of live target bacteria, enhancement of complement-mediated bacteriolysis, and opsonization of target bacteria for phagocytosis by human macrophage cells. The results indicated that both yPac1A8 and yPgi3G4 IgG have the potential to be further developed into antibody therapeutics in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2020

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____