รหัสโครงการ SUT3-304-62-12-19

รายงานการวิจัย

การผลิตสารชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบจากระบบการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์

Production of prototype biologic from gene expression system in mammalian cell

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-62-12-19

รายงานการวิจัย

การผลิตสารชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบจากระบบการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์

Production of prototype biologic from gene expression system in mammalian cell

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2562 – 2564

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2564

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2562 โดยมีกรรมการจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. กุณฑลี ร่างน้อย ดร. จุฑามาศ คำสีแก้ว และ นายวิษณุ ศรีลา ที่ได้ร่วมกันทำงานวิจัยนี้ และ ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการ **การผลิตสารชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบจากระบบการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์** นี้ อันที่จริงเป็นโครงการที่วางแผนการดำเนินการเป็นระยะเวลา ๓ ปี แต่ได้รับการสนับสนุนในปีแรกเพียงปีเดียว แล้วต้องปิดโครงการไปก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสามารถรายงานความสำเร็จเฉพาะในขั้นตอนแรก คือการผลิตต้นแบบยารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้าที่ออกฤทธิ์ต่อโมเลกุลที่ทำหน้าที่ยับยั้งกลไกควบคุมภูมิคุ้มกัน ชื่อ อิพิลิมูแมป (Ipilimumab) ชื่อการค้า เยอร์วอย (YERVOY®) ซึ่งมีราคาสูงมาก สามารถใช้ในรักษาแบบภูมิคุ้มกันบำบัด ร่วมกับแนวทางการรักษาอื่น ในโรคมะเร็งระยะร้ายแรง โดยงานวิจัยเริ่มต้นจากการออกแบบเวคเตอร์ และยีน สำหรับการผลิตยาแอนติบอดี ในรูปแบบ อิมมูโนกลอบูลิน ๑ (IgG1) จากนั้นทำการวิเคราะห์ของลำดับ ยีนและกรดอะมิโน แล้วจึงนำเวคเตอร์ไปนำส่งเข้าสู่เซลล์มนุษย์ HEK293 เพื่อให้ผลิตโดยการหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ จากนั้น นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการโครมาโตรกราฟี แล้วนำมาวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีแยกด้วยไฟฟ้าผ่านเจล จากนั้นในขั้นตอนสุดท้าย นำไปทดสอบในการจับกับเป้าหมายของยา คือโปรตีน CTLA-4 โดยผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการทดสอบการจับเป้าหมายอย่างง่าย ด้วยวิธีการ อีไลซ่า (ELISA) ซึ่งประสบผลสำเร็จ อีกทั้งพบว่า ยาที่ผลิตขึ้นมาได้สามารถจับกับเป้าหมายได้ดี ดังนั้นยานี้จึงสามารถใช้เป็นต้นแบบเพื่อ ผลิตในจำนวนมากขึ้น ทั้งจากเซลล์ HEK293 หรือ เซลล์ CHO เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติความคล้ายคลึงกับยาต้นแบบ (biosimilar) หรืออาจนำไปพัฒนาต่อเพื่อพัฒนาเป็นยาในกลุ่ม biobetter โดยผ่านการทดลองตามลำดับขั้น ตั้งแต่การทดลองในหนูทดลอง ไปจนถึงการทดลองทางคลีนิคในขั้นต่าง ๆ ต่อไป นอกจากผลผลิตคือต้นแบบยารักษามะเร็งที่ออกฤทธิ์ผ่านระบบภูมิคุ้มกัน อิพิลิมูแมปแล้ว ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการนี้ คือการสร้าง บุคลากร และเทคโนโลยีฐาน สำหรับการผลิตยาในกลุ่มภูมิคุ้มกันบำบัดเพื่อรักษามะเร็งอื่น ๆ ต่อไปด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research project entitled "Production of prototype biologic from gene expression system in mammalian cell" was originally planed for a period of 3-year. Unfortunately, the project was only supported for the first year; therefore, this is the report of the outputs from the first budget year. In this research project, a prototype of anti-cancer target-based therapy in the group of immune checkpoint inhibitor, i.e., Ipilimumab (Yervoy), which is extremely expensive, was successfully generated. The research project started with the design and construction of appropriate expression vector for the production of the biologic drug in the form of immunoglobulin IgG1. After the integrity of the constructs was confirm by automated DNA sequencing and amino acid sequence analysis, the expression vectors were transfected into human embryonic kidney cell (HEK293) for the secretory production into culture media. After that, the secreted antibody was purified by affinity chromatography and analyzed by sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Finally, an ELISA-based method for the detection of specific binding between the antibody and its target, i.e., CTLA-4 was optimized and established. The ELISA results indicated that the prototype Ipilimumab can bind well to its target; hence, the aim of this project to generate the drug prototype is accomplished. The outputs from this project can be use as the basis for further investigation which will involve the production in a larger scale either in HEK293 or CHO cells for biosimilarity testing or further development into biobetter drug. Then, various steps of drug development process, ranging from animal testing to different clinical trial stages, must be carried out. In addition to generating immune checkpoint inhibitor, Ipilimumab, drug prototype, the outcome of this research is the creation of human resources and platform technology for the manufacturing immunotherapeutic drugs for cancer treatment in the future as well.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญรูปภาพ ..... ฉ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 2

บทที่ 2 3

ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ชีวผลิตภัณฑ์ (Biologics) 3

2.2 ยา Ipilimumab 4

บทที่ 3 8

วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย 8

3.1 การพัฒนา expression vector ที่เหมาะสม สำหรับการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ 8

3.2 การผลิตและทำบริสุทธิ์ชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบในระดับห้องปฏิบัติการ 12

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพทางชีววิทยาของชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ได้พัฒนาขึ้น 14

บทที่ 4 17

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 17

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย 18

ภาคผนวก 19

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร 19

ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน.....20

ประวัตินักวิจัย 22

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ ๑ ขั้นตอนการผลิตยา Biosimilars 5
รูปที่ ๒ กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม check point inhibitors 6
รูปที่ ๓ ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Ipilimumab 8
รูปที่ ๔ ภาพแสดงยีน VH และ VL ในการโคลนเข้าสู่ vector pKRgH101 และ pKRgLk101 11
รูปที่ ๕ ภาพแสดงเวคเตอร์สำหรับผลิตยา Ipilimumab ใน pcDNA 3.4 Vector แบบ monocistronic แบ่งเป็น vector H-chain และ L-chain 11
รูปที่ ๖ ภาพแสดงวิธีการผลิตแอนติบอดีใน ExpiHEK293 cell 12
รูปที่ ๗ ภาพแสดงผลการทำแอนติบอดี Ipilimumab ให้บริสุทธิ์ 14
รูปที่ ๘ ภาพแสดงผลการจับกับ CTLA4 ของแอนติบอดี Ipilimumab 16
รูปที่ ๙ ภาพแสดงผล Checkerboard ELISA 16

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคมะเร็ง ถือเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย จากข้อมูลการรายงานสถิติที่สำคัญของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า อัตราการตายของคนไทยจากโรคมะเร็งเพิ่มจำนวนมากขึ้นทุก ๆ ปี และนอกจากนี้ยารักษาโรคมะเร็งยังมีราคาที่สูงมาก อาทิ ยา เยอร์วอย ที่เป็นเป้าหมายในโครงการวิจัยนี้ มีราคาต่อโดส กว่า ๒ แสนบาท หลายครั้งอาจทำให้ครอบครัวผู้ป่วยต้องสูญเสียทรัพย์ซึ่งเก็บออมมาได้เป็นอันมาก และผู้ป่วยอีกส่วนหนึ่งไม่สามารถเข้าถึงการรักษาที่เหมาะสมที่สุดได้ ดังนั้นหากสามารถสร้างและผลิตยารักษามะเร็งในกลุ่มของยาชีววัตถุ (Biologics) โดยเริ่มตั้งแต่การผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึง (Biosimilar) ก่อนได้เองภายในประเทศแล้ว จะสามารถนำไปจำหน่ายในราคาที่ถูกกว่ายาที่นำเข้าจากต่างประเทศ และอาจส่งขายต่อประเทศเพื่อนบ้านได้ ซึ่งในปัจจุบัน ยารักษาโรคมะเร็งในกลุ่ม Immune Checkpoint Inhibitor เป็นยารักษามะเร็งที่มีประสิทธิภาพ และศักยภาพสูงมากในการใช้รักษาโรคมะเร็งที่ยังไม่มีทางรักษาหายได้ ทั้งในรูปแบบใช้เดี่ยว และใช้ร่วมกับยาตัวอื่น (combinatorial therapy) หรือวิธีการรักษาแบบอื่น แต่ด้วยยามีราคาสูง และเทคโนโลยีการผลิตซับซ้อนมาก ดังนั้นหาก มีการริเริ่มทำ และสร้างบุคลากรในประเทศไทยให้สามารถทำได้ จะทำให้ในระยะยาวผู้ป่วยในประเทศ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ใช้สิทธิ์การรักษาขั้นพื้นฐาน (เช่น สิทธิ์ 30 บาท รักษาทุกโรค และสิทธิ์ประกันสังคม) สามารถเข้าถึงการรักษาด้วยยาชนิดนี้ได้ทั่วถึงกัน

จากการที่สิทธิบัตรของยาในกลุ่ม Biologics โดยเฉพาะ Therapeutic antibody กำลังทยอยหมดลง จึงทำให้ยาในกลุ่ม Biosimilars มีความสำคัญมากขึ้นในระบบสาธารณสุข และอุตสาหกรรมยาของโลก เพราะยาชีววัตถุคล้ายคลึงมีราคาต่ำกว่ายาต้นแบบ (originator) จึงทำให้ผู้ป่วยสามารถเข้าถึงยาได้มากขึ้น แต่ด้วยโครงสร้างที่ซับซ้อนของยาในกลุ่ม Therapeutic antibody นี้ จึงทำให้ไม่สามารถผลิตเลียนแบบเหมือนยา originator ได้โดยง่ายเหมือนยาโมเลกุลเล็ก (เช่น พาราเซตามอล ไอบูโพรเฟน และอะม็อกซีซิลิน) เพราะต้องใช้เทคโนโลยีชั้นสูงที่ซับซ้อน รวมถึงการวิเคราะห์คุณภาพในหลากหลายมิติ เช่น การวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลแบบปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิ ซึ่งในยาโมเลกุลขนาดเล็กมักจะวิเคราะห์โครงสร้างแบบปฐมภูมิเท่านั้น และเป็นที่คาดการณ์กันว่าในปีค.ศ. 2025 ตลาด biologics ทั่วโลกจะมีมูลค่าสูงถึง 400 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ โดยคาดว่า monoclonal antibodies จะเป็นสินค้าหลักในตลาด เนื่องจาก monoclonal antibodies ถือว่ามีมูลค่าทางตลาดที่ค่อนข้างสูงและถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคได้หลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มของโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เช่น มะเร็ง และ immune disorders เป็นต้น ปัจจุบัน biologics ได้ถูกระบุให้เป็นหนึ่งใน กลไกขับเคลื่อนเศรษฐกิจเพื่ออนาคต หรือ “New Engines of Growth” เพื่อขับเคลื่อนระบบเศรษฐกิจของประเทศตามนโยบาย Thailand 4.0 เพราะนอกจากจะผลิตยา biosimilars ได้แล้ว ยังอาจใช้เป็นต้นแบบ หรือใช้สำหรับอ้างอิง (reference) ในการผลิต Novel immune

check point inhibitors ตัวอื่น ๆ ได้อีกต่อไปในอนาคต ดังนั้นหากประเทศไทยสามารถผลิตยาต้นแบบ ขึ้นได้เอง จักเป็นประโยชน์ ต่อการพึ่งตนเองได้ในระยะยาว โดยเฉพาะในชีวิตหลังการระบาดใหญ่ของโรค โควิด-๑๙

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคทางวิศวกรรมแอนติบอดี ในการสร้างเทคโนโลยีการผลิต therapeutic antibody ต้นแบบ สำหรับการประยุกต์ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ หรือพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งแบบมุ่งเป้า โดยแบ่งเป็นหัวข้อย่อยดังนี้

- เพื่อพัฒนาและสร้างระบบ expression vector สำหรับการผลิตแอนติบอดีให้สมบูรณ์แบบเหมือนธรรมชาติ เพื่อการรักษาและตรวจวินิจฉัยโรค จากเซลล์สัตว์
- เพื่อพัฒนาระบบการผลิตแอนติบอดีบริสุทธิ์ในปริมาณสูงจากเซลล์สัตว์
- เพื่อพัฒนาระบบการวิเคราะห์ แอนติบอดีเบื้องต้น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

สร้างยีนต้นแบบเพื่อผลิต Ipilimumab ในห้องปฏิบัติการจาก HEK cell และทำการวิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้น เพื่อยืนยันความถูกต้อง ของ prototype ที่ได้สร้างขึ้น เพื่อการพัฒนาต่อยอดต่อไป

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ความรู้ความเชี่ยวชาญของผู้วิจัย ในเชิงอณูเทคโนโลยีชีวภาพ ที่มีมาก่อนหน้านี้ และ ครุภัณฑ์ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ สามารถนำมาใช้ในการสร้าง prototype สำหรับงานวิจัยนี้ได้ โดยผู้วิจัยได้เลือกที่จะผลิตยา Ipilimumab เนื่องจากเป็นยาในกลุ่ม check point inhibitor จึงสามารถรักษามะเร็งได้กว้างขวาง ทั้งนี้ ยาในกลุ่มนี้มีเป้าหมาย หลัก ๓ ชนิดคือ PD-1, PDL-1 และ CTLA-4 เหตุที่ผู้วิจัยเลือกยาที่มุ่งเป้า CTLA-4 เนื่องจากทราบมาว่า ผู้วิจัยท่านอื่น ในมหาวิทยาลัยอื่น กำลังอยู่ในระหว่างพัฒนายาต่อ PD-1, PDL-1 จึงได้เลี่ยงมาพัฒนายาที่ไม่ซ้ำซ้อนกัน และอาจใช้ร่วมกันในลักษณะ combinatorial therapy ได้ ทั้งนี้ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการผลิตยา Ipilimumab ทั้งหมด สามารถนำมาใช้พัฒนายารักษามะเร็งในกลุ่มนี้ตัวอื่นๆ ได้ต่อไป รวมทั้งการพัฒนาเป็น biobetter ด้วย ซึ่งสามารถเลี่ยงปัญหาการทดสอบเพื่อยืนยัน biosimilarity ซึ่งยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงมาก

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวผลิตภัณฑ์ (Biologics)

ชีวผลิตภัณฑ์ (Biologics) คือ ยา หรือ ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิต หรือจากชิ้นส่วนของสิ่งมีชีวิต (U.S. Food and Drug Administration) เช่น น้ำตาล โปรตีน นิวคลีอิคแอซิด ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Biologic ได้แก่ วัคซีน เลือด อินซูลิน หรือยาใหม่ๆ ที่พบเห็นในตลาดยามูลค่าสูงในปัจจุบัน (Birch and Racher, 2006; Dolinar and Reilly, 2013). ชีวผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ผลิตด้วย recombinant DNA technology จึงเป็นยานวัตกรรม ที่มีสิทธิบัตรคุ้มครอง และหลังจากหมดสิทธิบัตร ก็สามารถมี Generic version ซึ่งเรียกว่า Biosimilar ออกมาได้ ทำให้ราคายาในตลาดถูกลงเพราะมีคู่เทียบ ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นสามารถเข้าถึงยาได้ เพราะ ต้นทุนในการผลิตลดต่ำลง ทำให้หลายๆ บริษัทหันมาสนใจลงทุนในกลุ่มอุตสาหกรรมยาประเภทนี้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมียาประเภท Biobetters ซึ่งเป็น recombinant drugs ที่ปรับแต่งขึ้น เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการรักษาและให้มีความปลอดภัยมากขึ้น ยาชนิดนี้สามารถจดสิทธิบัตรคุ้มครองและมีค่าราคาสูงขึ้น (Dolinar and Reilly, 2013; Ventola, 2013) มีการประมาณการว่าการเติบโตของตลาดยา biologics ในปี 2025 จะมีมูลค่าสูงถึง 400 พันล้านเหรียญสหรัฐฯ และยังมีการประมาณการเติบโตของตลาดระบบ expression vectors ว่าจะมีมูลค่าประมาณ 317.1 ล้านเหรียญสหรัฐฯ (http://www.grandviewresearch.com) รวมทั้งมีการประมาณการว่า ปัจจุบันกำลังมีการพัฒนายาจากเทคโนโลยีชีวภาพมากกว่า 650 ชนิด และมากกว่า 1,500 ชนิด อยู่ในระหว่างการทดสอบทางคลินิก ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นโมโนโคลนอแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาโรค (therapeutic antibody) ต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง และภูมิคุ้มกันต้านตัวเอง จนถึงปัจจุบัน ประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตยาในกลุ่ม therapeutic antibody ใช้เองได้ ปัจจุบันต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และยามีราคาสูงมาก ทำให้คนทั่วไปเข้าถึงยาได้ยากมาก

จากเหตุการณ์การระบาดโรคโควิด - ๑๙ ยิ่งเป็นการเร่งความต้องการยาในกลุ่ม biologics โดยเฉพาะวัคซีน และยาควบคุมภาวะ cytokine storm รวมทั้งกระตุ้นการผลิต therapeutic antibody อื่น ๆ อีกด้วย จากรายงานของ Mordor Intelligence ในเดือน พฤษภาคม ๒๕๖๔ ตลาด biologics ปี 2020 มีมูลค่า 303 พันล้านเหรียญสหรัฐ และคาดว่าจะเพิ่มถึง 509 พันล้านเหรียญสหรัฐ ในปี 2026 จึงมีอัตราการโตของตลาดโดยรวม (CAGR) ถึงร้อยละ ๙ ทั้งนี้พบว่าตลาดที่โตเร็วที่สุดคือตลาดในแถบ Asia Pacific ซึ่งรวมถึงยาในกลุ่ม biosimilars ด้วย (GaBi online และ Biosimilars council) ในประเทศไทยจนถึงปัจจุบัน ยังไม่มียาในกลุ่ม biologics ที่ผลิตในประเทศ ด้วยเทคโนโลยีหลักที่พัฒนาโดยคนไทยออกจำหน่าย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

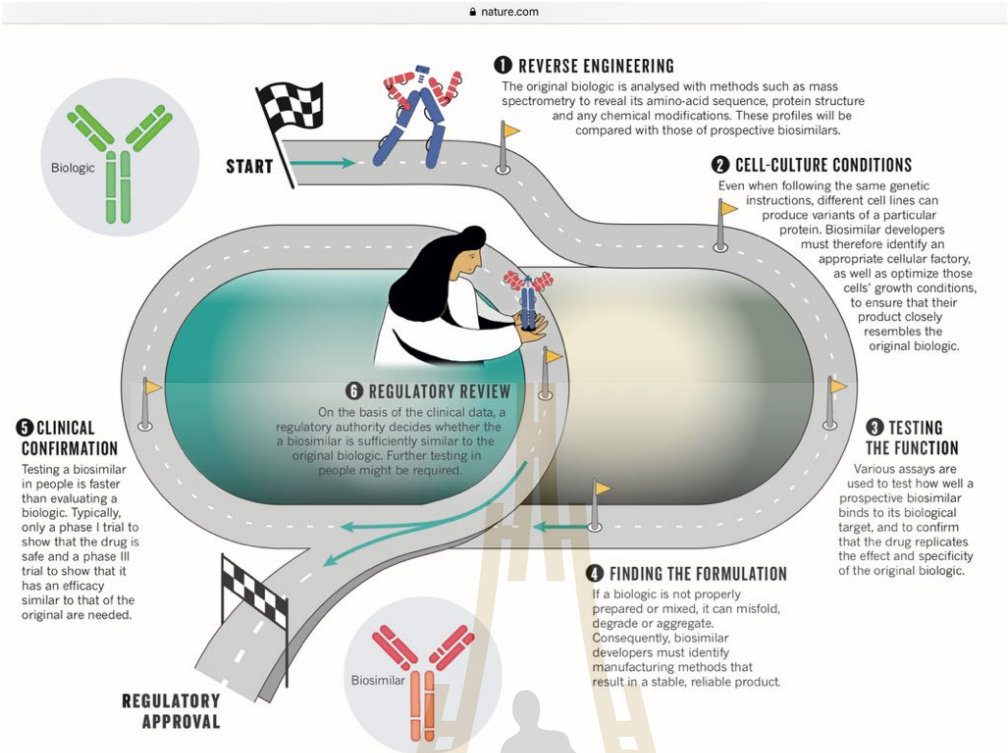
2.2 ยา Ipilimumab

โรคมะเร็ง ถือเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย จากข้อมูลการรายงานสถิติที่สำคัญของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า อัตราการตายของคนไทยจากโรคมะเร็งเพิ่มจำนวนมากขึ้นทุกๆปี และนอกจากนี้ยารักษาโรคมะเร็งมีราคาค่อนข้างสูงมาก ซึ่งอาจทำให้ประชาชนบางส่วนไม่สามารถเข้าถึงการรักษาที่เหมาะสมได้ ดังนั้นหากสามารถสร้างและผลิต ยารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้าได้เอง จะทำให้สามารถจำหน่ายในราคาที่ถูกกว่ายาที่นำเข้าจากต่างประเทศ ก็จะทำให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้สามารถเข้าถึงการรักษาได้มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะยาในกลุ่ม Immune Checkpoint Inhibitor ซึ่งเป็นยาทางเลือกใหม่ ที่มีประสิทธิภาพ และศักยภาพสูงมากในรักษามะเร็ง จึงอาจช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น มีการพยากรณ์โรคที่ดีขึ้น และมีระยะเวลาปลอดโรคยาวนานขึ้น ทำให้ผู้ป่วยสามารถต่อสู้กับมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าเดิม ถือเป็นการรักษาแบบ targeted therapy ซึ่งต้องใช้ร่วมกับแนวทางการรักษาโรคแบบ pharmacogenomics หรือ personalized medicine

ทั้งนี้ จากการที่สิทธิบัตรของยาในกลุ่ม Biologics โดยเฉพาะ Therapeutic antibody กำลังทยอยหมดลง จึงทำให้ยาในกลุ่ม Biosimilars กำลังจะมีความสำคัญมากขึ้นในระบบสาธารณสุข และอุตสาหกรรมยาของโลก เพราะมีราคาต่ำกว่ามาก ซึ่งเป็นข้อดีที่จะให้ผู้ป่วยสามารถเข้าถึงยาได้มากขึ้น แต่ด้วยโครงสร้างที่ซับซ้อนของยาในกลุ่มนี้ จึงทำให้ไม่สามารถผลิตเลียนแบบเหมือนยา generic ได้โดยง่าย เพราะต้องการเทคโนโลยีชั้นสูงที่ซับซ้อน (Eisenstein et al., 2019) ขั้นตอนการผลิตจนถึงผ่านการรับรองแสดงดังรูปด้านล่าง

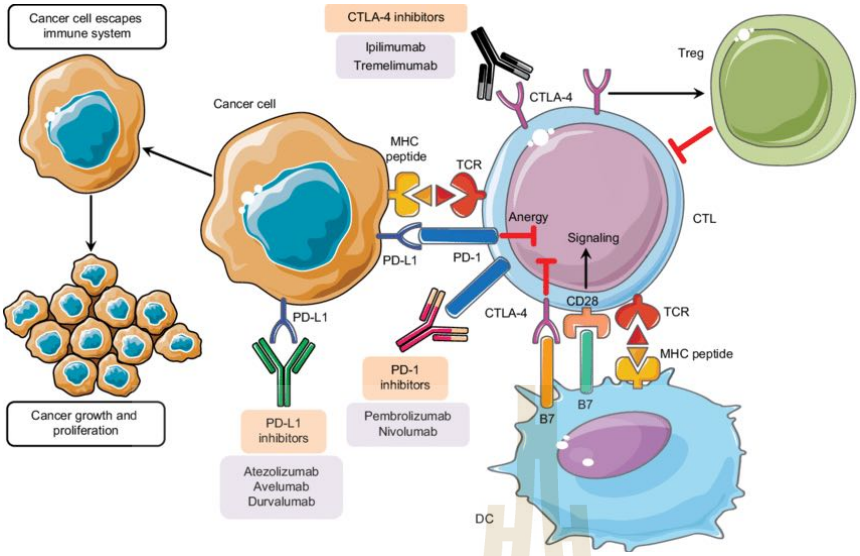
อนึ่งถึงแม้สิทธิบัตรยาในกลุ่ม check point inhibitor ยังไม่หมด แต่อาจเริ่มทำการวิจัยรอไว้ก่อนได้เพื่อสามารถแข่งขันทางการตลาดได้ทันท่วงทีเมื่อสิทธิบัตรหมดลง รวมถึงอาจใช้เป็นแนวทางการพัฒนายาตัวใหม่อื่นๆ ในกลุ่มนี้ต่อไปได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ ๑ ขั้นตอนการผลิตยา Biosimilars

Immune checkpoint เป็นกลุ่มของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกัน ที่ทำหน้าที่ขัดขวางการปลุกฤทธิ์และการทำหน้าที่ของ T cells ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่ทำงาน เพื่อป้องกันไม่ให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานมากเกินไปในภาวะปกติ ด้วยเซลล์มะเร็งจัดเป็นสิ่งแปลกปลอมอย่างหนึ่ง จึงถูกควบคุมโดยระบบภูมิคุ้มกัน แต่อย่างไรก็ตาม เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยกลไกการกระตุ้นระบบ Immune checkpoint ส่งผลให้ระบบ ภูมิคุ้มกันไม่สามารถทำงานเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งได้ (Chen et al., 2013 and Fife et al., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงเกิดกลุ่มยาใหม่ในการพัฒนายารักษามะเร็งในปัจจุบัน ที่มุ่งเป้าไปที่การยับยั้ง Immune checkpoint molecule ต่าง ๆ อาทิ PD-1, PD-L1 และ CTLA-4 เป็นต้น ดังแสดงในภาพด้านล่าง (Ayoub, Al-Shami, & Yaghan, 2019) เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายตรวจจับเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น โดยยาในกลุ่ม Immune checkpoint inhibitor มีข้อบ่งใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งปอด มะเร็งไต มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น



รูปที่ ๒ กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม check point inhibitors

ยา Ipilimumab เป็นยาที่เป็น therapeutic antibody ในกลุ่ม Immune checkpoint ประเภท recombinant humanized monoclonal IgG1 antibody ของบริษัท บริสตอล-ไมเยอร์ส สควิบบ์ ภายใต้ชื่อการค้า เยอร์วอย (Yervoy) เป็นยาที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ต่อสู้กับมะเร็ง โดยมุ่งเป้าไปที่โปรตีนที่เรียกว่า Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) Yervoy เป็นยาใหม่ที่ได้รับการรับรองอนุมัติใน USA ในปี ค.ศ. 2011 นับเป็นยาตัวแรกที่สามารถยืดอายุคนไข้ที่เป็นโรคมะเร็งผิวหนังระยะก้าวหน้า และเป็นชนิดที่รุนแรงจนถึงแก่ชีวิตได้ (Evan et al., 2011) ยาตัวนี้เกิดจากการคิดค้นของ Prof. James Allison ซึ่งเป็นผู้ที่ได้รับรางวัลโนเบลสาขาสรีรวิทยาและการแพทย์ในปี 2561

ข้อมูลจาก (wonkarnpat.com) ได้รายงานสรุป ผลงาน ตีพิมพ์ ใน New England Journal of Medicine ปี 2018 บทความเรื่อง Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma ว่า การรักษาด้วย nivolumab ร่วมกับ ipilimumab มีการตอบสนองในผู้ป่วยมะเร็งไตระยะท้าย คณะผู้ศึกษาวิจัยได้ดำเนินการศึกษาระยะที่ 3 ประเมินผลการรักษาด้วย nivolumab ร่วมกับ ipilimumab เทียบกับ sunitinib ในผู้ป่วย clear-cell advanced renal-cell carcinoma ที่ไม่เคยได้รับการรักษา โดยคณะผู้ศึกษาวิจัยสุ่ม (1:1) ให้ผู้ป่วยได้รับ nivolumab (3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ร่วมกับ ipilimumab (1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ทางหลอดเลือดดำทุก 3 สัปดาห์ รวม 4 โด๊ส แล้วจึงได้รับ nivolumab (3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ทุก 2 สัปดาห์ หรือ sunitinib (50 มิลลิกรัม) แบบยารับประทานวันละครั้งรวม 4 สัปดาห์ (ไซเคิล 6 สัปดาห์) จุดยุติปฐมภูมิ ได้แก่ การรอดชีพโดยรวม (ค่า alpha เท่ากับ 0.04) การตอบสนองต่อการรักษา (ค่า alpha เท่ากับ 0.001) และการรอดชีพโดยโรคสงบ (ค่า alpha เท่ากับ 0.009) ในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงปานกลางหรือความเสี่ยงสูง คณะผู้ศึกษาวิจัยสุ่มผู้ป่วย 1,096 รายได้รับการรักษาด้วย nivolumab ร่วมกับ ipilimumab (550 ราย) หรือsunitinib (546 ราย) โดยพบผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงปาน

กลางหรือความเสี่ยงสูง 425 ราย และ 422 ราย ตามลำดับ จากมัธยฐานการตรวจติดตาม 25.2 เดือนใน ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงปานกลางหรือความเสี่ยงสูงพบว่า อัตราการรอดชีพโดยโดยรวมที่ 18 เดือน เท่ากับร้อย ละ 75 (95% CI 70-78) จาก nivolumab ร่วมกับ ipilimumab และร้อยละ 60 (95% CI 55-65) จาก sunitinib จากการศึกษายังไม่มีผลลัพธ์มัธยฐานการรอดชีพโดยรวมจากการรักษาด้วย nivolumab ร่วมกับ ipilimumab ขณะที่มัธยฐานการรอดชีพโดยรวมเท่ากับ 26.0 เดือนจาก sunitinib (hazard ratio สำหรับ การเสียชีวิตเท่ากับ 0.63; $p < 0.001$) อัตราการตอบสนองต่อการรักษาเท่ากับร้อยละ 42 เทียบกับร้อยละ 27 ($p < 0.001$) และอัตราการตอบสนองโดยสมบูรณ์เท่ากับร้อยละ 9 เทียบกับร้อยละ 1 มัธยฐานการรอด ชีพโดยโรคสงบเท่ากับ 11.6 เดือน และ 8.4 เดือน ตามลำดับ (hazard ratio สำหรับการลุกลามหรือการ เสียชีวิตเท่ากับ 0.82; $p = 0.03$ ซึ่งไม่ถึงระดับที่มีนัยสำคัญตาม threshold ที่ 0.009) เหตุการณ์ไม่พึง ประสงค์จากการรักษาเกิดขึ้นในผู้ป่วย 509 รายจาก 547 ราย (ร้อยละ 93) ในกลุ่มที่ได้รับ nivolumab ร่วมกับ ipilimumab และใน 521 รายจาก 535 ราย (ร้อยละ 97) ในกลุ่มที่ได้รับ sunitinib เหตุการณ์ไม่พึง ประสงค์ระดับ grade 3 หรือ 4 เกิดขึ้นในผู้ป่วย 250 ราย (ร้อยละ 46) และ 335 ราย (ร้อยละ 63 ตามลำดับ) เหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ซึ่งนำไปสู่การหยุดการรักษาเกิดขึ้นในร้อยละ 22 และร้อยละ 12 ตามลำดับ

โดยสรุปอัตราการรอดชีพโดยรวมและการตอบสนองต่อการรักษาสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญจากการ รักษาด้วย nivolumab ร่วมกับ ipilimumab เทียบกับ sunitinib ในผู้ป่วยมะเร็ง advanced renal-cell carcinoma ซึ่งมีความเสี่ยงปานกลางหรือความเสี่ยงสูง และไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน

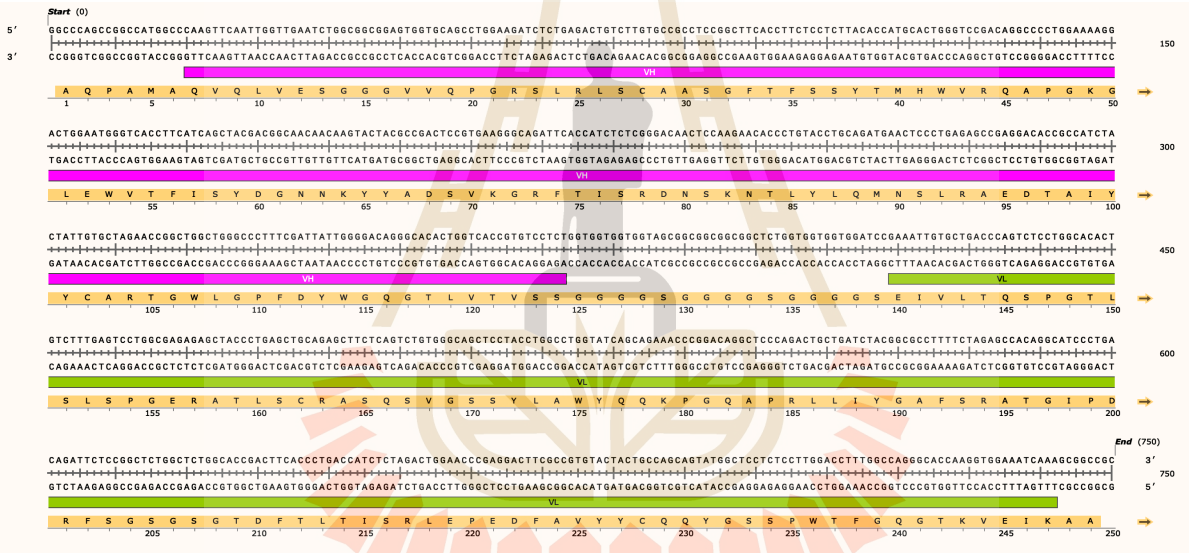
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการวิจัย

3.1 การพัฒนา expression vector ที่เหมาะสม สำหรับการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ

ทำการสร้าง vector สำหรับการผลิตแอนติบอดีโครงสร้างเต็มรูปแบบ (whole human IgG) โดยใช้ IgG MY Lab platform ที่ได้พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมี vector pcDNA3.4 เป็น backbone ในงานวิจัยนี้ใช้แอนติบอดี Ipilimumab เป็นต้นแบบในการศึกษา ซึ่งเป็นยาที่ได้รับการ อนุมัติจาก US FDA ในปี 2011 ออกฤทธิ์จับจำเพาะกับ cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4)

ขั้นตอนที่ 1 สังเคราะห์ยีน Ipilimumab ส่วน variable chain ผ่านบริษัท GeneART, Thermo Fisher Scientific โดยให้มีการทำ codon optimized ให้เหมาะสมในการ expression ในเซลล์มนุษย์



รูปที่ ๓ ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Ipilimumab สีชมพูแสดงส่วน VH และสีเขียวแสดงส่วน VL

ขั้นตอนที่ 2 การโคลนยีนส่วน VH (variable heavy chain) และ ส่วน VL (vatiable light chain) เข้าสู่ vector ที่มีส่วนของ constant part ของแอนติบอดีอยู่ ชื่อว่า vector pKRgH101 และ pKRgLk101 ซึ่งเป็น vector ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ

1. ทำการสังเคราะห์ชิ้นส่วนแอนติบอดี VH และ VL ใช้ primer ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้เอนไซม์ pfu DNA polymerase

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. ทำการตรวจ DNA โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 1%agarose gel (agarose gel electrophoresis) เพื่อแยกชิ้นส่วน DNA ตามขนาด ยีนของชิ้นส่วน VH และ VL ต้องมีขนาดประมาณ 400 bp ทำการตัดเจลตรงที่มีชิ้นส่วน DNA ให้ถูกต้องตามขนาดดังที่กล่าวไปข้างต้น

3. ทำการสกัด DNA ออกจากเจลให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Gel extraction kit จากบริษัท Promega, USA โดยสกัด DNA จาก column ด้วยน้ำ ปริมาตร 50 µl

4. นำ pKRgH101 และ pKRgLk101 มาตัดด้วยเอนไซม์ (restriction enzyme) *XhoI*/NheI และ *XhoI*/BsiWI ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับ vector ให้ทำการตัด phosphate group ออกจากปลาย 5’ ของ vector โดยตัดด้วยเอนไซม์ CIP (Calf intestinal phosphatase) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้มี background (คือ vector ที่จะเกิดการเชื่อมต่อกันเองโดยไม่มี insert เมื่อทำการเชื่อมต่อในขั้นตอนที่ 7 ให้น้อยที่สุด

5. จากนั้นทำการตรวจ DNA โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่าน 1% agarose gel (agarose gel electrophoresis) เพื่อแยกชิ้นส่วน DNA ตามขนาด ซึ่ง vector ต้องมีขนาดประมาณ 7000 base pairs (bp) ทำการตัดเจลตรงที่มีชิ้นส่วน DNA ของ vector ให้ถูกต้องตามขนาดดังที่กล่าวไปข้างต้น

6. ทำการสกัด DNA ออกจากเจลให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Gel extraction kit (Promega, USA) โดยสกัด DNA จาก column ด้วยน้ำ ปริมาตร 50 ul

7. ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน scFv เข้าสู่ vector โดยใช้ชุด GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit

8. จากนั้นนำ DNA ที่เชื่อมต่อแล้ว transfrom เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* Top10 (เป็นเซลล์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการอ่อนแอของผนังเซลล์ ด้วยแคลเซียม) จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มี 100 µg/ml Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน

9. นำแบคทีเรียโคโลนี่เดี่ยวที่ได้ ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB ที่มี 100 ug/ml Ampicillin จำนวน 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน เขย่าที่ 250 rpm

10. นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 3,300g, 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (supernatant) ด้านบนทิ้ง เก็บเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้ในการสกัด DNA

11. ทำการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ DNA extraction kit (Qiagen miniprep, Germany) โดยสกัด DNA จาก column ด้วยน้ำ ปริมาตร 50 µl

12. ทำการตรวจสอบยีน VH ด้วยการตัด DNA ที่สกัดได้จากข้อ 11 มาตัดด้วย restriction enzyme *XbaI*/*Nhe*I ถ้าประสบผลสำเร็จ ต้องมี DNA ขนาดประมาณ 400 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่แสดงชิ้นส่วน VH ส่วนการตรวจสอบยีน VL ตัด DNA ที่สกัดได้จากข้อ 11 มาตัดด้วย restriction enzyme

EcoRI/*EcoR*V ถ้าประสบผลสำเร็จ ต้องมี DNA ขนาดประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่แสดงชิ้นส่วน VL และบางส่วนของ vector

13. ส่งโคลนที่มีชิ้นส่วนดังที่กล่าวไปข้างต้น เพื่อไปตรวจสอบลำดับเบส (sequence) เพื่อตรวจความถูกต้องก่อนนำไป expression ในเซลล์

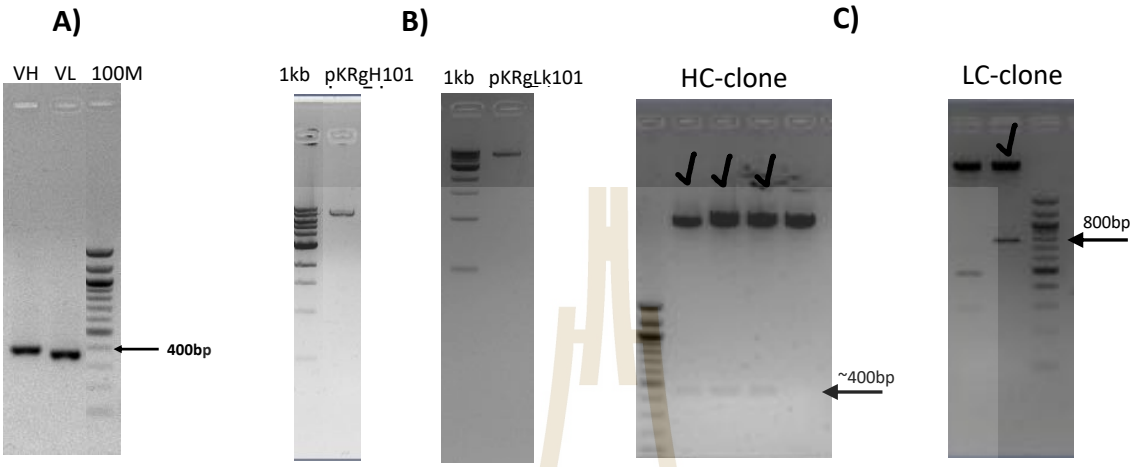
ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีน VH และ VL

Primer	Base
<u>สังเคราะห์ VH</u>	
spXhoIpiVH Fw	5’ tccagcgcctactccCAAGTTCAATTGGTTGAATCTGG 3’
CHNheIIpiVH Rv	5’ GGGTCCCTTGGTgctagcAGAGGACACGGTGACCAG 3’
<u>สังเคราะห์ VL</u>	
spXhoIpiVL Fw	5’ ctgtccctgggcatcGAAATTGTGCTGACCCAGTCTCC 3’
CLKBsiWIIpiVL Rv	5’ AGGAGCGGCCACcgtacgTTTGATTTCCACCTTGGTGCCCTG3’

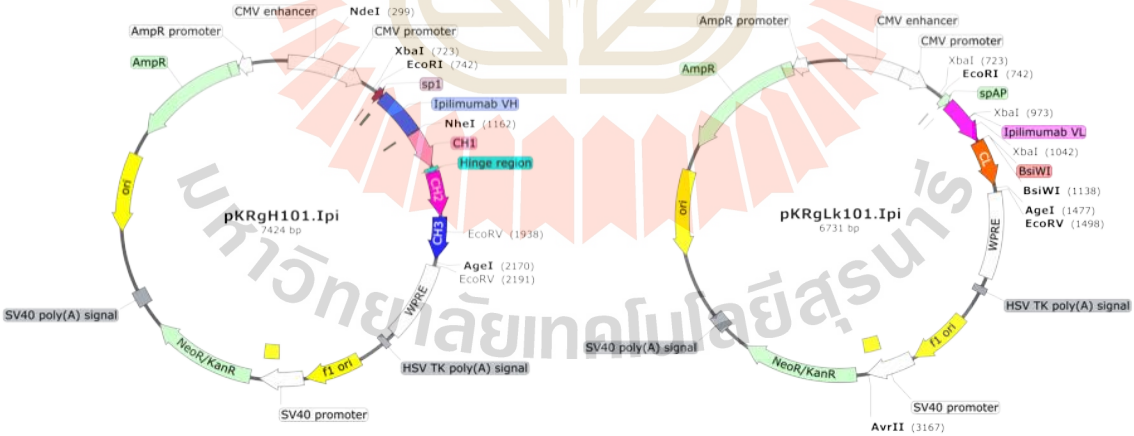
<u>ผลการทดลอง</u>

หลังจากที่สังเคราะห์เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL แล้ว เมื่อแยก DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซีส พบว่ามีขนาดยีนประมาณ 350-400 เบส (รูปที่ 4A) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดจากอะกาโรสเจล โดยใช้ชุดสกัดจากบริษัท promega เพื่อนำไปโคลนเข้าสู่ vector pKRgH101 และ pKRgLk101 โดยใช้ GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit ซึ่ง VH จะถูกโคลนเข้าสู่ vector pKRgH101 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Nhe*I ส่วน VL จะถูกโคลนเข้าสู่ vector pKRgLk101 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *BsiW*I และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดจากอะกาโรสเจล (รูปที่ 4B) หลังจากได้โคลนจากการโคลนแล้วทำการตรวจสอบ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *xba*I และ *Nhe*I สำหรับ VH ที่โคลนเข้า pKRgH101 มี 3 โคลนที่แสดง DNA ขนาดประมาณ 400 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีนที่แสดงชิ้นส่วน VH ดังแสดงในภาพที่ 4C ส่วน VL ที่โคลนเข้า pKRgLk101 ตรวจสอบ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR*I และ *EcoR*V มี 1 โคลนแสดง DNA ขนาดประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้องถ้าการ

โคลนประสบผลสำเร็จ โคลนทั้งหมดมีการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยบริษัท Macrogen, Korea นำมาเข้าโปรแกรม snapgene สร้างเป็น vector map ชื่อ pKRgH101.Ipi และ pKRgLk101.Ipi แสดงในรูปที่ 5



รูปที่ ๔ ภาพแสดงยีน VH และ VL ในการโคลนเข้าสู่ vector pKRgH101 และ pKRgLk101 A) การสังเคราะห์ชิ้นส่วนแอนติบอดี Ipilimumumab สายหนัก(VH) และสายเบา (VL) B) ยีนของ vector pKRgH101และ pKRgLk101 C) ผลการตัด vector ที่ผ่านการโคลนแล้ว โคลนที่มีเครื่องหมาย √ แสดงถึงโคลนที่ประสบผลสำเร็จ

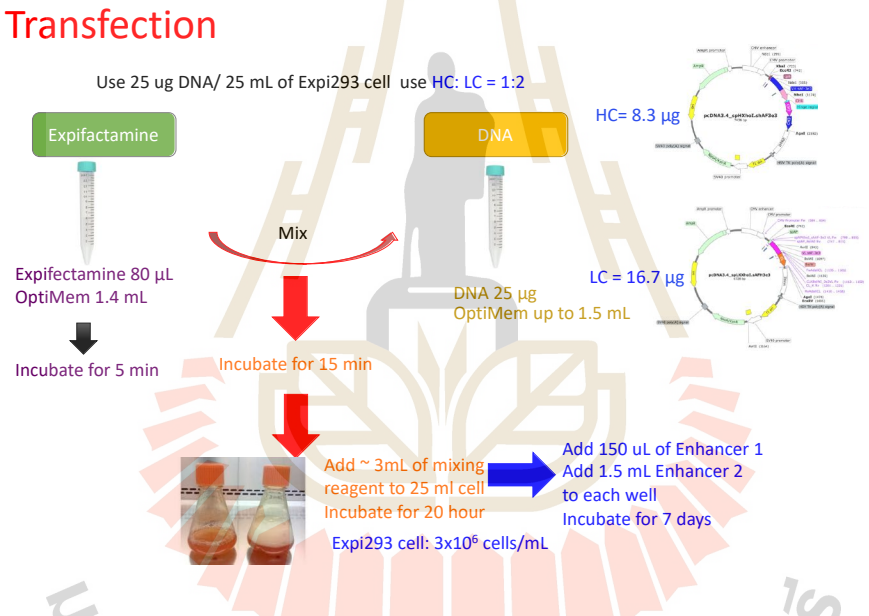


รูปที่ ๕ ภาพแสดงเวคเตอร์สำหรับผลิตยา Ipilimumab ใน pcDNA 3.4 Vector แบบ monocistronic แบ่งเป็น vector H-chain และ L-chain

3.2 การผลิตและทำบริสุทธิ์ชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบในระดับห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนที่ 1 การผลิตแอนติบอดีในเซลล์มนุษย์ HEK293

ขั้นตอนการทำดังแสดงในรูปที่ 6 ใช้ ExpiHEK293 (Thermo Fisher Scientific, USA ในการผลิต ทำการ transfect vector pKRgH101.Ipi และ pKRgLk101.Ipi เข้าสู่ ExpiHEK293 โดย Ratio ที่ใช้ระหว่าง HC: LC เท่ากับ 1 µg : 2 µg โดยใช้ ExpiFectamine 293 transfection reagent เป็น cationic lipid-based Ratio เป็นสื่อนำพา DNA เข้าสู่ cell หลังจากการ transfection 1 วัน ทำการเติม Enhancer ให้แก่ cell จากนั้นเลี้ยงต่ออีก 5 วัน แอนติบอดีจะออกจาก cell มาสู่อาหารเลี้ยง cell จากนั้นนำ cell มาปั่นที่ความเร็ว 1300g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วน supernatant ด้านบน ปริมาณ DNA ที่ transfect จะเท่ากับปริมาตร cell ที่ใช้ ยกตัวอย่างเช่น ต้องการผลิต IgG ด้วย cell ปริมาตร 25 ml ทำได้โดย ใช้ ExpiHEK293 cell 25 ml



รูปที่ ๖ ภาพแสดงวิธีการผลิตแอนติบอดีใน ExpiHEK293 cell

ขั้นตอนที่ 2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง FPLC

scFv-Fc และ IgG สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ HiTrapTM MabSelectTM PrismA 1 mL (GE healcare, UK) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจับกับ IgG ได้ มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการ Pump wash purified ทั้งระบบด้วย DI ที่ผ่านการกรอง จากนั้น ทำการ Pump wash purified ให้สาย A เป็น binding buffer (20 mM sodium phosphate (NaH_2PO_4), 0.15 M NaCl; pH7.2) และ B เป็น elution buffer (0.1M Citric acid; pH3)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. ตั้งค่าโดยใช้โปรแกรมของเครื่อง AKTA (GE healcare, UK) sample flow: 0.5 ml/min, Method base: sample pump, Flow path: injection vavle, Alam pressure: 0.5 mPa จากนั้นทำการติดตั้ง HiTrapTM MabSelectTM PrismA column เข้ากับเครื่อง

3. ล้าง column ด้วย DI 5 ml ผ่านสาย sample จากนั้น กดปุ่ม pause เปลี่ยน DI เป็น binding buffer และล้างต่อไปอีกประมาณ 5 ml

4. นำสาย sample ใส่ลงใน tube ที่มี supernatant ที่ได้มาจากการผลิตแอนติบอดี (กรองด้วย 0.45 µm ตั้งค่า auto zero เพื่อให้ค่า OD เป็น 0 โหลด sample ผ่าน column จนเกือบหมด เมื่อโหลด sample เครื่องจะวัด OD ไปด้วย จากจอแสดงผลจึงเห็นเส้นกราฟค่า OD เริ่มสูงขึ้น โดยระหว่างที่โหลด sample นี้ให้ตั้งค่าเครื่องให้ทำการเก็บ fraction ซึ่ง fraction ที่เก็บได้นี้คือ Flow through นำไปรัน SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการจับของแอนติบอดีกับ column

5. กดปุ่ม pause เปลี่ยนหลอด sample เป็น binding buffer ล้าง 20 ml จนค่า OD จะเข้าใกล้ 0 หรือจนถึง 0 ในระหว่างนี้ทำการเก็บ fraction นี้เพื่อรัน SDS-PAGE จากนั้นกดปุ่ม pause อีกครั้ง

6. เริ่มทำการ elute แอนติบอดี โดยการตั้งค่า Gradient: 100% B, Fracination: 20 ml เก็บ fraction ละ 1 ml เก็บ tube ที่ แสดง peak ของ protein ซึ่ง fraction ที่เก็บมานี้คือ แอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจาก buffer ที่ ใช้ในการ elute สารมีความเป็นกรด สามารถทำให้ neutralized ด้วยการเติม 1M Tris-HCl pH9 รัน SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบ

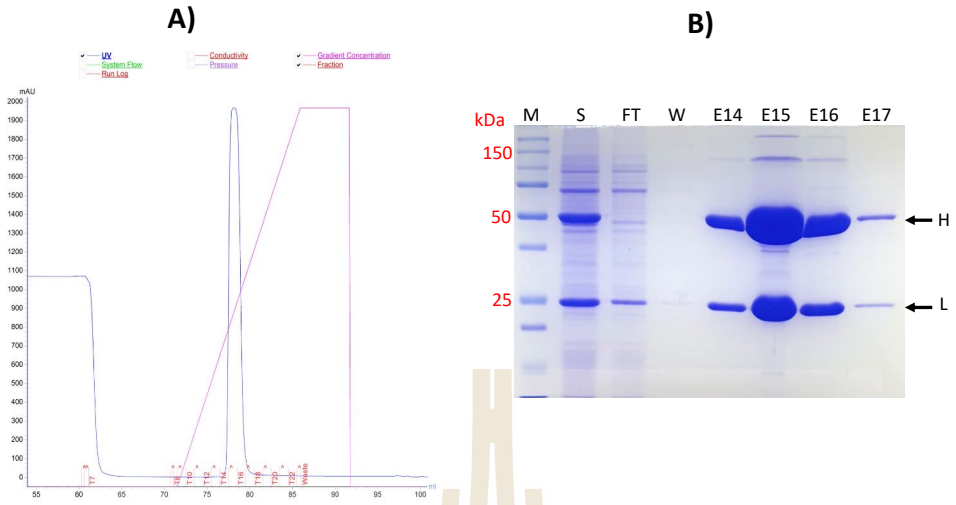
HiTrapTM MabSelectTM PrismA column นี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยต้องทำการ Regenerate column ด้วย 0.5 M NaOH ประมาณ 5 ml หลังจากนั้น pump ด้วย DI หลังจากนั้นนำสายทุกสาย A และ B ใส่ลงใน 20%ethanol ป้อนคำสั่งให้เครื่องโหลด 20% ethanol เข้าไปในสายทุกสายและ column จากนั้นทำการถอด columm ออกแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

7. ทำการวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยการวัด OD_{280} nm จากเครื่อง nanodrop เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

<u>ผลการทดลอง</u>

จากการทำแอนติบอดี Ipilimumab ให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง FPLC ทำการเก็บ fraction ที่แสดง peak protein โดยเก็บ Elution fraction ที่ 14-17 ดังแสดงในรูปที่ 7A จากนั้นทำการตรวจสอบการทำให้บริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE ในสภาวะ reducing แอนติบอดีจะมี 2 band คือ band H-chain ขนาดประมาณ 50 kDa band L-chain ขนาดประมาณ 25 kDa ดังแสดงในรูปที่ 7B ผลของความเข้มข้นของ Ipilimumab ที่วัดได้แสดงดังตารางที่ 2 สามารถคำนวณ yield ในการผลิตได้ คือ 335.9 mg/L

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ ๗ ภาพแสดงผลการทำแอนติบอดี Ipilimumab ให้บริสุทธิ์ A) กราฟแสดง fraction การ elute แอนติบอดี B) SDS-PAGE ของ fraction ต่างๆในการทำ Ipilimuman ให้บริสุทธิ์ M; All blue Protein marker (NEB, USA), S; Supernatant, FT; Flow through, W; wash, E14-17; Elution แอนติบอดี

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของแอนติบอดี Ipilimumab

	Nanodrop (mg/mL)
E1 (E45+E15+E16)	18.012
E2 (E17)	2.718

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพทางชีววิทยาของชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ได้พัฒนาขึ้น

<u>การทดสอบประสิทธิภาพการจับของแอนติบอดี Ipilimumab กับ Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) ด้วยวิธี ELISA</u>

1. ทำการ immobilized target ด้วย Recombinant human CTLA4 protein (Active) (abcam, UK; ab167727) 1 และ 2 µg/ml ละลายใน PBS 100 µl ลงไปในหลุมของจาน ELISA ให้เท่ากับจำนวนแอนติบอดีที่ต้องการทำการวิเคราะห์ โดยมีแอนติบอดีอื่น (Adalimumab) และ CHO medium เป็นตัวแปร

ควบคุม (background) โดยควรทำการทดสอบแบบ สองซ้ำ (duplicate) เพื่อความถูกต้อง ปิดปากหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

2. ทิ้ง CTLA-4 จากนั้นล้างหลุมด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) จำนวน 3 รอบเติมนมปลอดไขมัน 2% MPBS (2%skimmed milk in PBST) (ปริมาณ 200 µl ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกัน (block) การจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific binding)

3. คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST 3 รอบ

4. เติมแอนติบอดี Ipilimumab (10 µg/ml) Adalimumab (28 µg/ml) และ CHO medium ปริมาณ 100 µl ที่ ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1ชั่วโมง

5 คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST 3 รอบ

6 เติม Peroxidase AffiniPure F(ab')2 fragment Goat anti-human IgG (H+L) HRP ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน blocking buffer ปริมาณ 100 µl ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7. ล้างด้วย PBST 3 รอบ

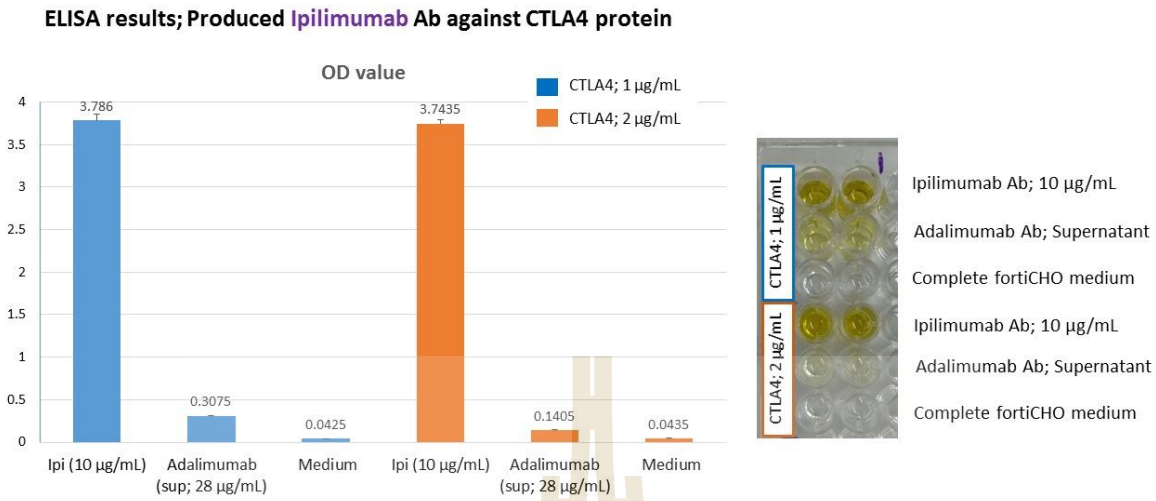
8. เติมสาร 1-StepTM Ultra TMB-ELISA solution ปริมาณ 100 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15นาทีเพื่อรอให้เกิดสี

9. เติม 50 µL of 2M H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยาการเกิดสี

10. ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวแสง 450 nm

ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบความสามารถจับของ Ipilimumab กับโปรตีนเป้าหมาย (CTLA-4) พบว่าเมื่อทดสอบการจับของ Ipilimumab ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml กับ CTLA-4 ที่ความเข้มข้นต่างกัน แสดงผลการจับที่เท่าๆกัน (รูปที่ 8) เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่มากไป จึงแสดงค่าเป็นความอิ่มตัว ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบปริมาณที่เหมาะสมของโปรตีนเป้าหมาย และแอนติบอดี โดยการทำ Checkerboard titration



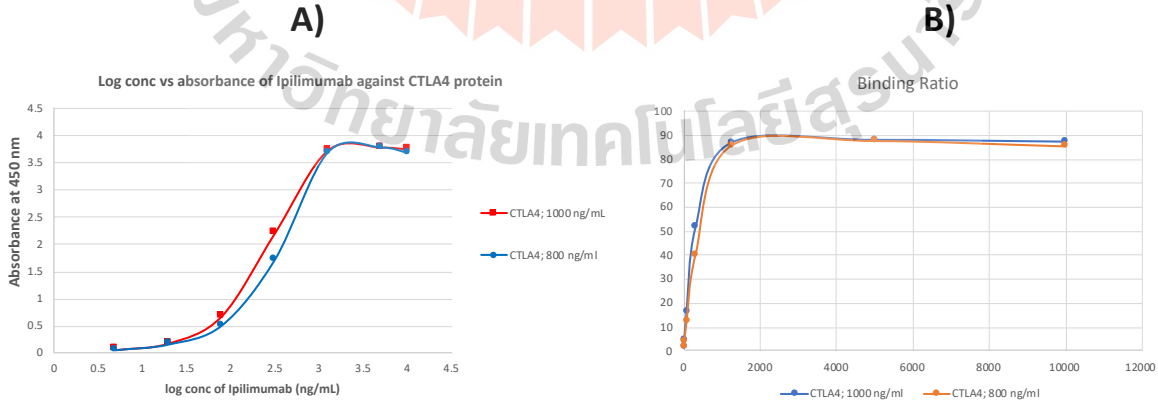
รูปที่ ๘ ภาพแสดงผลการจับกับ CTLA4 ของแอนติบอดี Ipilimumab

<u>การปรับสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA (checkerboard titration)</u>

การปรับสภาวะในการทำ ELISA ให้เหมาะสมโดยการเทียบตัวแปร 2 ตัว ได้แก่ ความเข้มข้นต่างๆ ของ Ipilimumab อาทิเช่น จากความเข้มข้น 4.9-10,000 ng/ml ต่อหลุม และความเข้มข้นของ CTLA-4 ที่ 800 และ 1000 ng/ml ซึ่งตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธี ELISA ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

<u>ผลการทดลอง</u>

จากผล checkerboard ELISA พบว่าค่า Binding ratio ของ Ipilimumab 300 ng/ml เมื่อใช้ CTLA-4 1000 ng/ml สูงกว่า 800 ng/ml แสดงว่าความเข้มข้นของ CTLA4 ที่เหมาะสมคือ CTLA-4 ที่ 1000 ng/ml (รูปที่ 9)



รูปที่ ๙ ภาพแสดง**ผล Checkerboard ELISA** A) **แสดงค่า Log concentration VS absorbance of Ipilimumab against CTLA-4 B) แสดงค่า Binding ratio**

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

โครงการ การผลิตสารชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบจากระบบการแสดงออกของยีนในเซลล์สัตว์ นี้ อันที่จริงเป็นโครงการที่วางแผนการดำเนินการเป็นระยะเวลา ๓ ปี แต่ได้รับการสนับสนุนในปีแรกเพียงปีเดียว แล้วต้องปิดโครงการไปก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสามารถรายงานความสำเร็จเฉพาะในขั้นตอนแรก คือการผลิตต้นแบบยารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้าที่ออกฤทธิ์ต่อโมเลกุลที่ทำหน้าที่ยับยั้งกลไกควบคุมภูมิคุ้มกัน ชื่อ อิพิลิมูแมป ชื่อการค้า เยอร์วอย ซึ่งมีราคาสูงมาก สามารถใช้ในรักษาแบบภูมิคุ้มกันบัด ร่วมกับแนวทางการรักษาอื่น ในโรคมะเร็งระยะร้ายแรง โดยงานวิจัยเริ่มต้นจากการออกแบบ เวคเตอร์ และยีน สำหรับการผลิตยาแอนติบอดีในรูปแบบ อิมมูโนกลอบูลิน ๑ จากนั้นทำการวิเคราะห์ของลำดับ ยีนและกรดอะมิโน แล้วจึงนำเวคเตอร์ไปนำส่งเข้าสู่เซลล์มนุษย์ HEK293 เพื่อให้ผลิตโดยการหลังออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ จากนั้น นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการโครมาโตรกราฟี แล้วนำมาวิเคราะห์ โครงสร้างด้วยวิธีแยกด้วยไฟฟ้าผ่านเจล จากนั้นในขั้นตอนสุดท้าย นำไปทดสอบในการจับกับเป้าหมายของยา คือโปรตีน CTLA-4 โดยผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการทดสอบการจับเป้าหมายอย่างง่าย ด้วยวิธีการ อีไลซ่า ซึ่งประสบผลสำเร็จ อีกทั้งพบว่า ยาที่ผลิตขึ้นมาได้สามารถจับกับเป้าหมายได้ดี ดังนั้นยานี้จึงสามารถใช้เป็นต้นแบบเพื่อ ผลิตในจำนวนมากขึ้น ทั้งจากเซลล์ HEK293 หรือเซลล์ CHO เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติความคล้ายคลึงกับยาต้นแบบ (biosimilar) หรืออาจนำไปพัฒนาต่อเพื่อพัฒนาเป็นยาในกลุ่ม biobetter โดยผ่านการทดลองตามลำดับขั้น ตั้งแต่การทดลองในหนูทดลอง ไปจนถึงการทดลองทางคลีนิคในขั้นต่าง ๆ ต่อไป นอกจากผลผลิตคือต้นแบบยารักษามะเร็งที่ออกฤทธิ์ผ่านระบบภูมิคุ้มกัน อิพิลิมูแมป แล้ว ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการนี้ คือการสร้าง บุคลากร และเทคโนโลยีฐานสำหรับการผลิตยาในกลุ่มภูมิคุ้มกันบำบัดเพื่อรักษามะเร็งอื่น ๆ ต่อไปด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Ayoub, N. M., Al-Shami, K. M., & Yaghan, R. J. (2019). Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: recent advances and combination therapeutic approaches. Breast cancer (Dove Medical Press), 11, 53–69. https://doi.org/10.2147/BCTT.S175360

Birch, JR, & Racher, AJ. (2006). Antibody production. Adv Drug Deliv Rev, 58(5-6), 671-85. doi: 10.1016/j.addr.2005.12.006

Chen DS, Mellman I. (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity 39:1.

Dolinar, RO, & Reilly, MS. (2013). The future of biological therapy: a pathway forward for biosimilars. *GaBI J, 2*(1), 36-40.

Eisenstein, M. (2019). Bring on the biosimilars. Nature 569, S2-s3.

Evan J. Lipson and Charles G. Drake. (2011). Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. Clin Cancer Res 17(22): 6958–6962.

Fife BT, Bluestone JA. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. Immunol Rev 224:166.

Ventola, CL. (2013). Biosimilars: Part 1: Proposed Regulatory Criteria for FDA Approval. *Pharmacy and Therapeutics, 38*(5), 270-87.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร

ผลงานวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของทุนสนับสนุนแก่คณาจารย์ที่มีผลผลิตด้านวิจัยสูงเพื่อจ้างนักวิจัยหลังปริญญาเอก (Full-time Doctoral) จำนวน 1 คน คือ นางสาวกุณฑลี ร่างน้อย ที่ได้เป็นผู้ช่วยวิจัยหลักในการทำวิจัยนี้

ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน

ผลงานจากโครงการนี้ ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ ดังนี้

ก. งานประชุมระดับนานาชาติ

ยังไม่มี (แต่อาจจะมีต่อไปถ้าได้ทุนสนับสนุนเพิ่มเติม)

ข. ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

ยังไม่มี (แต่อาจจะมีต่อไปถ้าได้ทุนสนับสนุนเพิ่มเติม)

ค. สิทธิบัตร

ยังไม่มี (แต่อาจจะมีต่อไปถ้าได้ทุนสนับสนุนเพิ่มเติม)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

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 ได้ทุน NIH ไปทำ postdoctoral research ที่ห้องปฏิบัติการของ 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 ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นศาสตราจารย์ และหัวหน้าห้องปฏิบัติการอณูเทคโนโลยชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) เพื่อสร้าง ชีวเภสัชภัณฑ์ มูลค่าสูง มีผลงานตีพิมพ์ใน ฐาน ISI 52 เรื่อง h-index 21, citation 1999 ฐาน Scopus 65 เรื่อง h-index 23, citation 2238 ฐาน Google Scholar 70 เรื่อง h-index 26, citation 3267 เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาระดับ หลังปริญญาอก 9 คน ปริญญาเอก 13 คน ระดับปริญาโท 9 คน และมัธยมศึกษา 10 คน

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;

Website : http://mylab.sut.ac.th/home.html