ซัลมา ฟัวดิยาห์ : การประยุกต์ใช้ระบบไมโครฟลูอิดิกส์เพื่อการคัดแยกโซเซลล์ผลิตแอนติบอดี (APPLICATION OF MICROFLUIDIC SYSTEM FOR SCREENING OF ANTIBODY PRODUCING CHO CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พันธุ์วงค์ คุณธนะวัฒน์, 83 หน้า.

โมโนโคลนอลแอนติบอดี/ไมโครฟลูดิก/รังไข่หนูแฮมสเตอร์จีน (CHO) เซลล์/การสร้างเซลล์ที่เสถียร/การแยกเซลล์เดียว

โมโนโคลนัลแอนติบอดี (mAbs) มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมชีวเภสัชภัณฑ์ เนื่องจากมีการนำไปใช้ในการบำบัดรักษาโรคหลากหลายชนิด เช่น มะเร็ง โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง และโรคติดเชื้อ ความต้องการ mAbs ในตลาดมีแนวโน้มจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งสำหรับการผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี สำหรับการรักษาโรคคือการสร้างเซลล์ไลน์ที่สำหรับการแสดงออกของแอนติบอดีที่เสถียร โซเซลล์ (CHO cell) ถูกใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นมากที่สุด ในการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ตรวจสอบผลของการใช้เวคเตอร์ที่แตกต่างกันสองชนิดที่เหมาะสม สำหรับระบบการแสดงออกของ CHO cell ที่แตกต่างกันสองระบบ นั่นคือ DHFR และ GS ต่อการแยก CHO เซลล์ที่เสถียร CHO เซลล์ที่ยีน GS ถูกน็อคเอาท์ ถูกใช้ทรานส์เฟกด้วยพลาสมิดสองชนิด ได้แก่ พลาสมิดสำหรับการแสดงออกของแอนติบอดี Adalimumab สำหรับระบบ GS (pWS_AdaliH7HC+L1LC) และพลาสมิดการแสดงออก GFP สำหรับระบบ DHFR (Cloned_EmGFP-เข้า-pCHO1.0) จากการทดลองพบว่าเซลล์ไลน์สามารถแสดงออก mAb และ GFP ได้พร้อมกัน รูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันของ mAb และ GFP ซึ่งเป็นผลมาจากการรวมจีโนมแบบสุ่มของเวกเตอร์ทั้งสองสามารถสังเกตได้ ผลจากการศึกษานี้จะเป็นทรัพยากรที่ใช้สำหรับการศึกษาความต่างกันของการแสดงออกของยีน CHO ในอนาคต

การพัฒนาเซลล์ไลน์ที่เสถียรสำหรับการผลิต mAbs สามารถทำได้โดยใช้วิธีการทั่วไป เช่น วิธีลิมิตติงไดลูชั่น (limiting dilution) อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของวิธีดังกล่าวคือ การดำเนินการต้องใช้เวลาและแรงงานมาก และมีโอกาสเกิดโมโนโคลนอลได้น้อยกว่า แม้ปัจจุบันจะมีเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น การคัดแยกเซลล์ด้วยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนท์ (FACS) ที่สามารถใช้แทนวิธี limiting dilution ได้ แต่เทคนิคดังกล่าวไม่ใช่เทคโนโลยีที่เข้าถึงได้ง่ายสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปมีต้นทุนสูง อาศัยทักษะในการใช้งาน ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาการนำอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกเชิงหลุมระดับจุลภาค ที่ได้รับการดัดแปลงจากรายงานโดยกลุ่มของเราก่อนหน้านี้ (MBM) มาประยุกต์ใช้เพื่อแยก CHO เซลล์เดี่ยว เซลล์ในอาหารเหลวถูกโหลดเข้าไปในอุปกรณ์โดยไมโครปิเปต จากนั้นเซลล์ที่ถูกดักจับด้วยไฟฟ้าสถิตของหลุมจะสามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ เมื่อเปรียบเทียบกับ limiting dilution พบว่า อุปกรณ์ MBM ให้จำนวนเซลล์เดี่ยวที่เพิ่มขึ้น 4.7 เท่า ต่อการโหลดเซลล์หนึ่งรอบ และแสดงให้

เห็นว่าเวลาที่ใช้ในการปฏิบัติการทั้งหมดลดลง 1.91 เท่า วิธีการนี้มีต้นทุนต่ำ สามารถดำเนินการได้โดยง่าย มีประสิทธิภาพ และเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการพัฒนาเซลล์ไลน์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SALMA FUADIYAH : APPLICATION OF A MICROFLUIDIC SYSTEM FOR SCREENING OF ANTIBODY PRODUCING CHO CELLS. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PANWONG KUNTANAWAT, Ph.D., 83 PP.

MONOCLONAL ANTIBODY/MICROFLUIDIC/CHINESSE HAMSTER OVARY (CHO) CELLS/STABLE CELL LINE GENERATION/SINGLE CELL ISOLATION

Monoclonal antibodies (mAbs) are dominant in the biopharmaceutical industry due to their function for curing diseases such as cancer, auto immune diseases, and infectious diseases. The demands for mAbs will always be high in the coming years. One of the key steps for the manufacturing of the therapeutic monoclonal antibody is to establish a stable cell line for expressing the antibody, of which the CHO cell is most commonly used. In this research study, we investigated the effect of using two different expression vectors suitable for two different CHO expression systems, i.e., DHFR and GS on the isolation of the stable CHO cell. GS knockout CHO cells were used and transfected with two plasmids, namely the Adalimumab antibody expression plasmid for the GS system (pWS_AdaliH7HC+L1LC) and the GFP expression plasmid for DHFR system (Cloned_EmGFP-into-pCHO1.0). It was found that cell lines could be expressed as mAb and GFP simultaneously. Different expression patterns of mAb and GFP, resulting from random genomic integration of the two vectors, could be observed. Stable cell lines expressing the dual plasmid system that were generated from this study will be valuable resources for the study of heterogeneity of the CHO cell gene expression in the future.

Furthermore, developing a stable cell line for mAbs production could be achieved using conventional methods such as limiting dilution. Unfortunately, the drawback of limiting dilution is time-intensive, laborious, and less probability of monoclonality. Moreover, high-throughput technology such as fluorescence activated cell sorting (FACS) could be used to replace limiting dilution. However, it is cost prohibitive, requires special skills and is less accessible to general laboratories. Here, in this research the implementation of the adapted version of a simple microwell-based microfluidic (MBM) device which was previously reported by our group was used to isolate single CHO cells. Cell suspension was loaded into the device by

simple micropipette, then the electrostatically trapped cells could be observed under an inverted microscope. Compared to the limiting dilution method, the MBM device offered a 4.7-folded increase in the number of single cells found per round of cell loading and demonstrated a 1.91-fold decrease in total working time. This approach could serve as affordable, simple and efficient alternative limiting dilution for cell line development.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2021

Student's Signature
Advisor's Signature
Co-advisor's Signature