รหัสโครงการ SUT3-304-61-12-04

รายงานการวิจัย

การพัฒนาระบบการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศ

Development of a system for the production of biologics for bio-industry in Thailand

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-61-12-04

รายงานการวิจัย

การพัฒนาระบบการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศ

Development of a system for the production of biologics for bio-industry in Thailand

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. เภสัชกรหญิง มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม ๒๕๖๔

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๑ เพียง ๑ ปี โดยมีกรรมจากสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ เป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภญ. สลินทิพย์ จารุสินธนากร นางสาวรัญญา ประนมพนธ์ นายวิษณุ ศรีลา นักศึกษาปริญญาเอก และ ดร. กุณฑลี ร่างน้อย นักวิจัยหลังปริญญาเอกทุนสนับสนุนคณาจารย์ที่มีผลผลิตด้านวิจัยสูงเพื่อจ้างนักวิจัยเต็มเวลาคุณวุฒิปริญญาเอก (Full-time Postdoctoral Researcher) รวมทั้ง ดร. จุฑามาศ คำสีแก้ว ที่ได้ช่วยกันเรียนรู้ และทำวิจัย ในโครงการนี้ จนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี รวมทั้งขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงินและงานธุรการ เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการ "การพัฒนาระบบการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศ" นี้ อันที่จริงเป็นโครงการที่วางแผนการดำเนินการเป็นระยะเวลา ๓ ปี แต่ได้รับการสนับสนุนในปีแรกเพียงปีเดียว แล้วต้องปิดโครงการไปก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสามารถรายงานความสำเร็จได้เฉพาะในช่วงแรก คือการสร้างเซลล์ไลน์เพื่อการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ อะดาลิมูแมป ที่มีชื่อการค้า ฮิวมิร่า ซึ่งเป็นยาที่มีมูลค่าทางการตลาดสูงเป็นอันดับต้นๆ ในโลก โดยโครงการนี้ผู้วิจัยได้รับเงินสนับสนุนให้จัดซื้อครุภัณฑ์ที่จำเป็นหลายรายการในการพัฒนาเทคโนโลยีฐานเพื่อการผลิตยาชีววัตถุ ในส่วนการสร้างเซลล์เพื่อการผลิตยาในประเทศด้วย จากผลการวิจัย สรุปได้ว่า ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนาเวคเตอร์สำหรับใช้ผลิต อะดาลิมูแมป ทั้งในระบบการผลิตแบบชั่วคราวจากเซลล์ไตของตัวอ่อนมนุษย์ HEK293 และถาวร จากเซลล์รังไข่หนูแฮมสเตอร์จีน CHO โดยในการผลิตแบบ ถาวร นั้นทำในเซลล์ CHO-S ซึ่งต้องทำการพัฒนาวิธีการคัดเลือกโคลนเดี่ยวที่สามารถผลิตยาแอนติบอดี ให้ได้ในปริมาณที่สูงและมีความเสถียรพอ รวมทั้งสามารถทำให้แอนติบอดีที่ผลิตได้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการใช้วิธีการ Protein A affinity chromatography นอกจากนี้ โครงการวิจัยนี้ ยังได้ทดลองผลิตยา อะดาลิมูแมป ในถังเลี้ยงเซลล์ขนาด ๕ ลิตร ซึ่งได้จัดซื้อมาจากการสนับสนุนของโครงการวิจัยนี้ เพื่อทดสอบระบบการผลิตในปริมาณสูงขึ้น รวมถึงขั้นกระบวนการทำให้แอนติบอดีที่ผลิตได้จากถังหมักให้บริสุทธิ์มากขึ้น จึงนับว่าผู้วิจัยได้พัฒนา เทคโนโลยีฐาน (platform technology) ซึ่งหมายรวมถึงครุภัณฑ์ วิธีการ (protocol) และบุคลากร สำหรับการผลิตยาแอนติบอดี (therapeutic antibody) ได้สำเร็จในเบื้องต้นแล้ว จึงสามารถขยายขอบเขตไปผลิตยาอื่น หรือพัฒนาต่อยอด ไปจนถึงการสร้างคลังเซลล์หลัก (master cell bank) เพื่อการผลิตยาในระบบมาตรฐาน GLP และ GMP สำหรับทำการทดลองในสัตว์ และในระดับคลีนิคได้ต่อไป ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการถ่ายทอด เทคโนโลยีและองค์ความรู้ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ผ่านการจัด Biologics Workshop ไปแล้ว ๓ ครั้ง โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้ ยังอาจใช้เป็น control ในงานวิจัย cancer research ต่าง ๆ ได้ ส่วน cell line ที่สร้างขึ้นมาและวิธีการสร้างเซลล์ที่พัฒนาขึ้นมาได้นั้น อาจนำไปใช้เพื่อผลิตยา biosimilars รวมทั้งแอนติบอดีสำหรับการรักษาอื่น ๆ ได้ต่อไป หากมี venture capital และแผนการตลาดที่เหมาะสมมา รองรับ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research project entitled "Development of a system for the production of biologics for bio-industry in Thailand" was originally planed for a period of 3-year. Unfortunately, the project was terminated and only supported for the first year. Nevertheless, significant progress has been made in the first part of the project focusing mainly on stable cell line generation. In this project, Humira® (adalimumab), one of the top best-selling therapeutic antibodies globally, was used as a model of study. Essential equipment for the development of cell line generation platform for use in biologics manufacturing has been purchased to conduct this research for bio-industry in Thailand. Firstly, the expression vectors to produce adalimumab using both transient expressing system in HEK293 and stable expression system in CHO cells have been successfully generated. For the generation of stably transfected CHO cells for long-term expression, CHO-S was used and the method for selecting stable high-producing clone has been established. In addition, purification of therapeutic antibody using protein A affinity chromatography was demonstrated. Moreover, production of adalimumab from 3-L CHO culture in a 5-L bioreactor, purchased from this grant, has been demonstrated. Purification of adalimumab from a fraction of 3L culture media has also been conducted. Therefore, it can be concluded that the first part of the biologic technology platform for the production of therapeutic antibody, which include equipment, protocol and trained personals, has been successfully established. This platform can be used as a foundation for the generation of other biologics drug or further develop until the production of master cell bank for GLP and GMP manufacturing of antibody for animal testing and various steps of clinical trials, respectively. Notably, the technology and knowledge obtained from this research projects have been transferred to other scientists in the country via 3 intensive Biologic Workshops. The antibody generated from this work can also be used as a valuable control for various cancer research; while the stable cell line and the cell line generation technology that have been created from this work can be used as the basis for the manufacturing of various biosimilars or therapeutic antibodies, provided that appropriated venture capital and market plan are available.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ..... **ก**

บทคัดย่อภาษาไทย ..... **ข**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... **ค**

สารบัญ ..... **ง**

สารบัญภาพ ..... **ช**

บทที่ 1 ..... **1**

บทนำ **1**

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

ขอบเขตการวิจัย 2

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 2

บทที่ 2 ..... **3**

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **3**

แอนติบอดี 3

เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจ (PHAGE DISPLAY ANTIBODY TECHONOLOGY) 5

ชีวผลิตภัณฑ์ (BIOLOGICS) 8

การพัฒนาการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบของโครงการวิจัย: ADALIMUMAB 10

บทที่ 3 ..... **12**

วิธีดำเนินการวิจัย **12**

ศึกษาหาเซลล์เจ้าบ้าน (EXPRESSION HOST) ที่เหมาะสม 12

การพัฒนา EXPRESSION VECTOR 12

ขั้นที่๑ ..... *12*

ขั้นที่๒ ..... *12*

การผลิตแอนติบอดีแบบ TRANSIENT EXPRESSION และการทำให้บริสุทธิ์ 13

การผลิตแอนติบอดีใน Expi293 cells *13*

การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง FPLC *13*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การตรวจสอบการจับของ antibody ต่อโปรตีนเป้าเหมาย ด้วยวิธี ELISA *14*
การเลี้ยงเซลล์ CHO-S 15
การเลี้ยงเพื่อประเมินค่า PRODUCTIVITY 15
การประเมินค่า productivity จากการเลี้ยงเซลล์แบบ 5 วัน *15*
การประเมินค่า productivity จากการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch *15*
การประเมินค่า productivity จากการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch สำหรับขั้นตอน clone stability assessment *16*
การวิเคราะห์หาปริมาณ ADALIMUMAB ที่ผลิตได้จาก CHO CELLS ด้วยวิธี ELISA 16
การคัดเลือกหา HIGH PRODUCING SINGLE CLONE 17
การผลิตแอนติบอดีใน BIOREACTOR 21

บทที่ 4 23

ศึกษาหาเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม 23
การพัฒนา EXPRESSION VECTOR สำหรับผลิตยาชีววัตถุ 23
การผลิตแอนติบอดีแบบ TRANSIENT EXPRESSION 26
การหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่าง H-chain และ L-chain *26*
การผลิตแอนติบอดีและการทำให้บริสุทธิ์ 27
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA เพื่อหาปริมาณ ANTIBODY 28
การคัดเลือกโคลนเดี่ยวที่ผลิตแอนติบอดีในปริมาณที่สูงและมีความเสถียร 30
การผลิตแอนติบอดีใน BIOREACTOR 35

บทที่ 5 38

สรุปผลการวิจัย 38
อภิปรายผล 38
ข้อเสนอแนะ 41

บรรณานุกรม 42

ภาคผนวก 50

ภาคผนวก ก ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดเทคโนโลยี และการสร้างเครือข่ายนักวิจัย 50
การจัด Biologics Workshop เมื่อวันที่ ๙ พฤษภาคม ๒๕๖๑ และโปรแกรม *50*
การจัด Biologics Workshop ระหว่างวันที่ ๑๗ - ๑๙ ธันวาคม ๒๕๖๑ ..... *51*
การจัด Biologics Workshop ระหว่างวันที่ ๑๗ - ๑๙ ธันวาคม ๒๕๖๑ ..... *58*
ประมวลภาพกิจกรรมการฝึกอบรม ครั้งที่ ๒ 61

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประมวลภาพกิจกรรมครั้งที่ ๓..... 65

ประวัติผู้วิจัย..... 67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปที่ 1. แสดงโครงสร้างชิ้นส่วนแอนติบอดีแบบต่างๆ 7
รูปที่ 2. ส่วนประกอบต่างๆ ของ ANTIBODY-DRUG CONJUGATE (ADC) สำหรับรักษาโรคมะเร็ง 8
รูปที่ 3. แผนภาพสรุปขั้นตอนการคัดเลือกโคลนเดี่ยวที่มีกำลังผลิตสูงและเสถียร 19
รูปที่ 4. สรุปการเตรียม CHO-S CELLS และ TRANSFECTION 19
รูปที่ 5. สรุปขั้นตอนการคัดเลือก HIGH PRODUCING SINGLE CLONE 20
รูปที่ 6. แผนผัง 96-WELL PLATE สำหรับการคัดเลือกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี LIMITING DILUTION 20
รูปที่ 7. สรุปขั้นตอนการทำ CLONE STABILITY ASSESSMENT 21
รูปที่ 8. สรุปขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และการทำให้บริสุทธิ์ 22
รูปที่ 9. ระบบ BI-VECTOR สำหรับผลิต ADALIMUMAB 24
รูปที่ 10. ระบบ BI-VECTOR สำหรับผลิต TRASTUZUMAB 24
รูปที่ 11. MONO-VECTOR ที่ใช้ในการผลิต ADALIMUMAB 25
รูปที่ 12. VECTOR ควบคุม ที่ใช้ผลิตโปรตีนเรืองแสง EMGFP 25
รูปที่ 13. SDS-PAGE แสดงผลอัตราส่วนยีน HEAVY และ LIGHT CHAIN ต่อการผลิตแอนติบอดี 26
รูปที่ 14. ELISA แสดงผลอัตราส่วนยีน HEAVY และ LIGHT CHAIN ต่อการผลิตแอนติบอดี 27
รูปที่ 15. ผล ELISA แสดงปริมาณของ ADALIMUMAB และ TRASTUZUMAB ที่ผลิตได้จาก EXPI293 CELLS แบบ TRANSIENT EXPRESSION SYSTEM 27
รูปที่ 16. ผลการทำ ADALIMUMAB และ TRASTUZUMAB ให้บริสุทธิ์ โดย SDS-PAGE 28
รูปที่ 17. ผล ELISA แสดงการจับของ ADALIMUMAB และ TRASTUZUMAB ต่อ โปรตีนเป้าหมาย 28
รูปที่ 18. ผล CHECKERBOARD TITRATION 29
รูปที่ 19. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PROTEIN A ที่ใช้สำหรับวิธี ELISA 29
รูปที่ 20. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DETECTION ANTIBODY ที่ใช้สำหรับวิธี ELISA 30
รูปที่ 21. ผลการวิเคราะห์ TRANSFECTION EFFICIENCY จากค่า GFP SIGNAL ด้วยวิธี FLOW CYTOMETRY 31
รูปที่ 22. ผลการวิเคราะห์หา TITER และ PRODUCTIVITY หลัง TRANSFECTION 48 ชั่วโมง 31
รูปที่ 23. ผลการวิเคราะห์หา TITER และ PRODUCTIVITY สำหรับ SELECTION PHASE 1 และ 2 32
รูปที่ 24. ผลการคัดเลือกโคลนเดี่ยวรอบที่ 1 (PRIMARY SCREENING) ใน 96-WELL PLATE 33
รูปที่ 25. ผลการคัดเลือกโคลนเดี่ยวรอบที่ 2 (SECONDARY SCREENING) ใน 6-WELL PLATE 33
รูปที่ 26. ผลการคัดเลือกโคลนเดี่ยวรอบที่ 3 (TERTIARY SCREENING) ใน 125ML-SHAKE FLASK 34
รูปที่ 27. ผลการทดสอบความสม่ำเสมอในการผลิต ADALIMUMAB ของโคลน 4-G8 และ 2-G9 34
รูปที่ 28. เปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ของโคลนเดี่ยวที่คัดเลือกได้ กับโคลนจากห้องปฏิบัติการอื่น 35
รูปที่ 29. ปริมาณกลูโคส แอมโมเนีย และแลกเตทในแต่ละวัน 36
รูปที่ 30. ปริมาณ ADALIMUMAB ที่ผลิตได้ และ % CELL VIABILITY ในแต่ละวัน 36
รูปที่ 31. การ PURIFY ANTIBODY ที่ผลิตได้จาก BIOREACTOR 37

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ชีวผลิตภัณฑ์ (Biologics) เป็นนวตกรรมทางการแพทย์และสุขภาพที่มีมูลค่าต่อหน่วยสูงมาก จึงมีความสำคัญต่อความสามารถในการแข่งขันของประเทศ โดยการผลิตชีวผลิตภัณฑ์นี้ ต้องใช้อุตสาหกรรมชีวภาพ (Bio-industry) ซึ่งเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมสำคัญในการนำพาประเทศ สู่ Thailand 4.0 อย่างไรก็ตาม เนื่องจากอุตสาหกรรมนี้เป็นนวตกรรมชั้นสูง ซึ่งได้รับการคิดค้นในต่างประเทศขึ้นไม่นาน ปัจจัยพื้นฐานในการผลิตในแทบทุกขั้นตอน จึงถูกควบคุมด้วยสิทธิบัตรข้ามชาติ หรือเป็นความลับทางการค้า จึงไม่สามารถนำมาดัดแปลงใช้ได้โดยง่าย โดยไม่ต้องเสียค่าลิขสิทธิ์เป็นจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถพึ่งตนเองได้อย่างแท้จริง

หนทางที่จะสามารถผลิตชีวผลิตภัณฑ์ได้เองในประเทศ อย่างคุ้มค่าในขั้นแรก จึงทำได้โดยการ พัฒนาระบบการผลิตขึ้นใช้เองในประเทศทั้งหมด โดยอาศัยองค์ความรู้ทางชีววิทยาระดับเซลล์ และ โมเลกุลที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่และไม่ได้ถูกจำกัดโดยสิทธิบัตร หรือสิทธิบัตรหมดอายุแล้ว ตั้งแต่การพัฒนาเซลล์จุลชีพหรือเซลล์สัตว์ที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการผลิต (Expression host) การพัฒนาดีเอ็นเอพาหะ สำหรับการแสดงออกของยีนที่ใช้ในการสร้าง ชีวผลิตภัณฑ์ (Expression vector) และ การสร้างยีนสำหรับการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม รวมทั้งวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการ สกัดแยก ผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งหากทำสำเร็จ จะสามารถนำไปเป็นพื้นฐานในการพัฒนา bio-industry ในประเทศได้ ซึ่งในปัจจุบัน ประเทศไทยมีโรงงานต้นแบบพร้อมใช้อยู่แล้ว

โดยในโครงการวิจัยนี้จะใช้ Adalimumab ซึ่งมีฤทธิ์ anti-TNF-alpha เป็น biologics ต้นแบบในการพัฒนาระบบ ใช้วิธีการ gene synthesis และ genetic engineering ในการสร้างยีนและ expression vector ใช้เทคนิคอณูชีววิทยาและอณูพันธุวิศวกรรมต่างๆ ในการพัฒนาเซลล์สำหรับผลิต หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนเดี่ยวที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณที่สูงและมีความเสถียร (stable high producer single clone) และวิเคราะห์แอนติบอดีที่ผลิตได้ในเบื้องต้น โดยหากพัฒนาระบบจนสามารถผลิตแอนติบอดีมนุษย์ชนิดนี้ได้แล้ว จะสามารถนำระบบที่พัฒนาขึ้นมา

นี้ไปผลิตแอนติบอดีอื่นๆ ได้อีก ทั้งเพื่อการรักษา และตรวจวิเคราะห์ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาระบบการผลิตชีววัตถุอื่นๆ ที่ไม่ใช่แอนติบอดีได้ต่อไปอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาระบบการผลิต (เทคโนโลยีฐาน) ชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ ขั้นแรก เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม ภายในประเทศ โดยมีวัฤประสงค์ย่อยดังนี้

1) พัฒนา expression vector ที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ คือ Adalimumab (หรือ Humira®) ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคภูมิแพ้ตัวเอง (autoimmune disease)
2) พัฒนาวิธีการสร้าง stable cell line เพื่อผลิต adalimumab ในระดับอุตสาหกรรม
3) พัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิต สกัดแยก และทำให้บริสุทธิ์ชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ ในระดับห้องปฏิบัติการ (Lab scale)

ขอบเขตการวิจัย

ใช้ยารักษาโรคภูมิแพ้ตัวเองที่มียอดขายสูงที่สุดคือ Adalimumab เป็นต้นแบบ (model) ในการพัฒนาระบบการผลิตที่เหมาะสม โดยทำการผลิตในระดับห้องปฏิบัตการ (lab scale) เท่านั้น คือห้องปฏิบัติการอณูเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส) MY Lab – SUT

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1) Expression vector และ ยีนของแอนติบอดี (whole IgG antibody) ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบ คือ Adalimumab รวมทั้ง เซลล์เจ้าบ้าน (expression host) ที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพดีในการผลิต
2) วิธีการที่เหมาะสมในการ คัดหาเซลล์สำหรับที่ใช้ในการผลิต วิธีการผลิต สกัดแยก และทำให้บริสุทธิ์ Therapeutic Antibody ในระดับห้องปฏิบัติการ (Lab scale)
3) สิทธิบัตรทางการค้าอย่างน้อย 1 รายการ และ/หรือ ข้อมูลสำหรับตีพิมพ์ในระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง
4) Excellence Center and Platform technology for Biologic Production ของคนไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แอนติบอดี

แอนติบอดีเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายที่เรียกว่าระบบ adaptive immune response คือเป็นระบบการตอบสนองของร่างกายโดยการสร้างภูมิคุ้มกัน อย่างเฉพาะเจาะจงต่อ เชื้อโรคต่างๆ ที่เข้ามาสู่ร่างกาย ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วการตอบสนองประเภทนี้ จะช่วยให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคในกรณีที่ร่างกายได้รับเชื้อซ้ำอีก (protective immunity) อันที่จริงนอกจากเชื้อโรคต่างๆ แล้ว สิ่งแปลกปลอมอีกมากมายที่เข้าสู่ร่างกายก็มีความสามารถกระตุ้นการสร้าง antibody ได้ รวมเรียกสารที่สามารถกระตุ้นให้สิ่งมีชีวิตผลิต antibody ได้ว่า antigen ซึ่งเป็นคำย่อมาจาก antibody generation

แอนติบอดี 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 (ยมาภัย, ๒๕๕๑)

แอนติบอดี (antibody) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีคุณประโยชน์ต่อการค้นคว้าและวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงต่างๆ อย่างยิ่ง (Harlow and Lane, 1998; Howard and Kaser, 2006) นอกจากนั้นแล้ว antibody ยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูง (Borrebaeck, 2000; Laurino et al., 1999; Waldmann, 1991) รวมทั้งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรค (Borrebaeck, 2000; Maggon, 2007; Reichert and Valge-Archer, 2007; Stipsanelli and Valsamaki, 2005; Waldmann, 1991) ทั้งนี้เพราะ antibody สามารถจับกับเป้าหมาย หรือ แอนติเจน (antigen) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นผลงานของธรรมชาติที่ผ่านการวิวัฒนาการมาหลายร้อยล้านปี หน้าที่หลักของ antibody ในสิ่งมีชีวิตคือการเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Janeway, 2008) ซึ่งจากความเข้าใจในกลไกการทำงานของธรรมชาติในด้านนี้เอง จึงทำให้มนุษย์สามารถประยุกต์ใช้ความรู้นี้ ในการสร้างเป็นเทคโนโลยีการผลิต antibody ชนิดต่างๆ ซึ่งมีประโยชน์ทั้งในการศึกษาวิจัย และการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งการรักษาโรค ในชั้นต้น antibody สามารถผลิตได้จากการฉีดสาร antigen เข้าไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ เช่น กระต่าย ม้า โค แพะ แล้วสกัด เอา antibody ซึ่งมีลักษณะเป็นโพลีโคลนอล (polyclonal antibody) ออกมาจากซีรั่ม (Howard and Kaser, 2006) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการผลิต antibody อีกชนิด

หนึ่งคือ monoclonal antibody (Albitar, 2007) วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการผลิต monoclonal antibody นั้น ทำได้โดยการฉีดแอนติเจน (antigen) เข้าไปในหนูเพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ antigen ชนิดนั้นๆ จากนั้นจึงใช้เทคนิคการสร้างเซลล์ผสม (hybridoma technology) เพื่อผลิตเป็น monoclonal antibody ชนิดต่างๆกัน เซลล์ผสมที่ถูกสร้างขึ้นให้มีความสามารถในการผลิต monoclonal antibody นั้น สามารถเก็บรักษาไว้ให้เป็นแหล่งผลิต monoclonal antibody ที่มีเอกลักษณ์ในความจำเพาะเจาะจง (unique specificity) ได้ตลอดไป การผลิต monoclonal antibody ชนิดหนึ่งๆ แต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลานาน ประมาณ ๔-๕ เดือนขึ้นไป และการลงทุนสูง ทั้งยังต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูง รวมทั้งยังต้องเกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองคือหนูอีกด้วย นอกจากการผลิต monoclonal antibody โดยวิธีการดั้งเดิมจะมีความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายที่สูงแล้ว ยังมีข้อจำกัดที่เกิดจากเทคโนโลยีนี้หลายอย่างเช่น ข้อจำกัดเกี่ยวกับชนิดของ antigen ที่จะใช้ เพราะต้องเป็น antigen ที่ไม่เป็นพิษต่อหนูทดลอง และต้องไม่เป็น antigen ที่คล้ายกับ antigen ของหนู เช่น antigen ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในขั้นต้นของลำดับการวิวัฒนาการ (conserved antigens) หรือใช้ได้เฉพาะกับ antigen ที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunogenecity) ได้เท่านั้น รวมทั้งผลที่ได้จากการกระตุ้นหนูทดลองยังมีความแปรปรวนสูงขึ้นกับสุขภาพของหนูแต่ละตัว ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือจำนวนชนิดของ antigen ที่จะใช้ในการสร้าง monoclonal antibody เพราะ โดยปกติการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen แต่ละชนิดมักต้องใช้หนูทดลอง ๓-๕ ตัวขึ้นไป ในยุคปัจจุบันซึ่งเป็นยุคหลังการค้นพบลำดับจีโนมมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด (post-genomic era) ความสำคัญในการศึกษาวิจัยจึงมุ่งไปสู่การศึกษาการทำงานของจีโนมหรือโปรตีน (functional genomics หรือ proteomics) (Eisenberg et al., 2000; Liu et al., 2002; Liu and Marks, 2000; Rudert et al., 2000; Sapan et al., 2007; Sidhu, 2001; Siegel et al., 2000) ซึ่งการวิจัยเหล่านี้จำเป็นต้องเกี่ยวกับโปรตีนจำนวนมาก การสร้าง monoclonal antibody จำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีนหลายชนิดพร้อมๆกัน โดยวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงเป็นไปไม่ได้ หรือต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ด้วยข้อจำกัดข้างต้น จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค วิศวกรรมแอนติบอดี ขึ้นมาเพื่อผลิตแอนติบอดีให้ง่ายขึ้น มีคุณสมบัติพิเศษที่ต้องการ โดยไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง อาทิเช่น ได้แก่การนำ monoclonal antibody ที่ผลิตได้จากหนูไปปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมือนของมนุษย์ (humanization) (Almagro and Fransson, 2008; Clark, 2000) เพื่อให้สามารถใช้ในการบำบัดโรคต่างๆ (human therapy) ปัจจุบันมี monoclonal antibody ที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายประเภทออกจำหน่ายแล้ว (Khandare and Minko, 2006; Schrama et al., 2006) การประยุกต์ใช้ monoclonal antibody เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้นับวันจะมีความสำคัญและได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะใช้เทคโนโลยีอื่นในการผลิต monoclonal antibody ที่ไม่ยุ่งยากและรวดเร็วกว่าวิธีการ hybridoma ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

เทคโนโลยีแอนติบอดีบนผิวเฟจ (Phage Display Antibody Techonology)

เทคโนโลยีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำวิศวกรรมแอนติบอดีเพื่อผลิต antibody เพื่อการตรวจวิเคราะห์และรักษาแนวใหม่ คือเทคโนโลยีเฟจ ซึ่งได้เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี ๒๕๓๓ (McCafferty et al., 1990) โดยในขั้นแรกเป็นการสร้างคลังของ antibody จากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย antigen แล้ว โดยทำการแสดงเฉพาะส่วนของ antibody ที่มีหน้าที่ในการจับคือ ส่วน Fab (Chang et al., 1991; Hoogenboom et al., 1991) หรือสร้างเป็น antibody เส้นเดี่ยวที่มีเฉพาะส่วนที่มีหน้าที่ในการจับ เรียกว่าส่วน single chain variable fragments (form), scFv (McCafferty et al., 1990) ซึ่ง antibody เหล่านี้จะถูกแสดงบนโปรตีนที่ปกคลุมผิวชนิดรอง (pIII) พบว่ามีความสำเร็จจากการใช้คลังเหล่านี้ในการผลิต monoclonal antibody ต่อ antigen หลายชนิด (Bugli et al., 2008; Burton et al., 1991; Cai and Garen, 1995; Clackson, 1991; Graus et al., 1997; Kramer et al., 2005; Lee et al., 2008; Shaw et al., 2008) แต่ข้อจำกัดประการสำคัญของการใช้วิธีการนี้คือต้องทำการกระตุ้นสัตว์ทดลองก่อนจึงเป็นการเสียเวลา และยังเป็นคลังที่มีเฉพาะ antibody ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย antigen ที่ใช้ อย่างไรก็ตามความสำเร็จนี้นับเป็นเครื่องชี้ว่าสามารถนำเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจมาใช้ในการคัดเลือกและผลิต monoclonal antibody ที่มีความสามารถในการจับอย่างมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้จริง

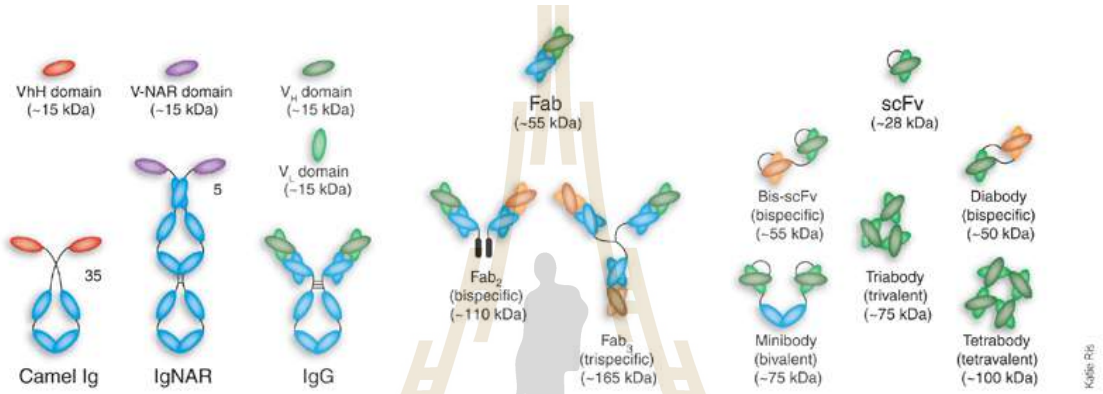
การพัฒนาก้าวสำคัญที่ทำให้การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการผลิต monoclonal antibody เป็นที่แพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างสูง ทั้งในงานวิจัยขั้นพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ เริ่มต้นในเวลา ๒ ปีต่อมา เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถสร้างคลังของ monoclonal antibody จากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนได้สำเร็จ (nonimmune library หรือ naïve library) (Marks et al., 1991) คลังชนิดนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยได้กว้างขวางกว่าคลังที่สร้างจากสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก่อนหลายเท่า เพราะสามารถใช้ในการสร้าง monoclonal antibody ต่อ antigen เกือบทุกชนิดที่ต้องการ เนื่องจากคลังของ antibody ที่สร้างขึ้นนี้เป็นตัวแทนความเป็นไปได้ทั้งหมดจากระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ตามธรรมชาติ โดยพบว่า monoclonal antibody ที่คัดเลือกมาได้นั้นมีคุณภาพดี คือมีความสามารถในการจับ (affinity, ในช่วง 1-200 nM) และมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) สูงเท่ากับ monoclonal antibody ที่สร้างจาก hybridoma (Marks et al., 1991; Nissim et al., 1994; Sheets et al., 1998; Winter et al., 1994)

แอนติบอดีสามารถทำให้มีคุณภาพสูงคือมีความจำเพาะเจาะจง และความสามารถในการจับสูง (high specificity และ affinity) มากขึ้นด้วยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยใช้หลักการกำกับ

วิวัฒนาการ (directed evolution) (Hoogenboom, 1997; O'Brien and Aitken, 2002) ด้วยเทคนิคต่างๆ นอกจากนี้แล้ว ยังสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ในการปรับปรุงคุณสมบัติอื่นๆตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่นความสามารถในการทำงาน (function) ต่างๆ เช่นการกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) (Burtrum et al., 2003; Dauvillier et al., 2002; Gejima et al., 2002; Kovaleva et al., 2006; Li et al., 2004; Paz et al., 2005; Piloto et al., 2005; Willemsen et al., 2005) หรือการใช้เป็นตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้ง (agonist หรือ antagonist) โปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆในเซลล์ (Rowley et al., 2004; Xie et al., 1997) นอกจากนั้นแล้วยังใช้ในการคัดเลือก antibody ที่ทนต่อสภาวะบางอย่างเช่น สภาวะกรด ด่าง หรือทนต่อเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteinase) (Kristensen and Winter, 1998; Pedersen et al., 2002) หรือที่สภาวะ reducing (Proba et al., 1998) รวมทั้งการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค (therapeutic use) (Almagro and Fransson, 2008; Benhar, 2007; Booy et al., 2006; Hale, 2006; Jolliffe, 1993; McCarron et al., 2005; Mitra et al., 2006; Reilly, 2006; Santos and Padlan, 1998; Stowell, 2006) หรือติดฉลาก (tag) (Buscombe, 2006; Carter and Merchant, 1997; Filpula, 2007; Howard and Kaser, 2006; Teillaud, 2005; Van de Wiele et al., 2004) เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ

การประยุกต์ใช้แอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่สำคัญ และมีมูลค่าทางการตลาดสูงที่สุดในปัจจุบัน คือหลายหมื่นล้านบาท คือการใช้สำหรับการ วินิจฉัยและรักษาโรค (therapeutic antibody) จนถึงปัจจุบันมีแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาแล้วหลายชนิด และมีอีกหลายร้อยกว่าชนิดที่กำลังอยู่การทดลองทางคลินิค (clinical trial) ขั้นต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง (Dillman, 2011) โดยรูปแบบของแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เป็นทั้งที่เป็น แอนติบอดีเต็มรูปแบบ (whole immunoglobulin) และชิ้นส่วนแอนติบอดีแบบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยชิ้นแอนติบอดีที่เป็นเฉพาะชิ้นส่วนแอนติบอดีขนาดเล็ก จะประกอบด้วยส่วนของแอนติบอดีที่ยังมีความสามารถในการจับกับเป้าหมายอยู่ อาทิเช่น แบบ scFv, แบบ Fab, และแบบเส้นเดี่ยวที่เตรียมได้จากสัตว์ในตระกูลอูฐและลามะ หรือปลาฉลาม (Holliger and Hudson, 2005) ข้อดีของแอนติบอดีชิ้นเล็กนี้คือ ผลิตได้ง่ายด้วยระบบการผลิตโปรตีนในแบคทีเรีย หรือ ยีสต์ สามารถถูกดูดซึม และเข้าไปยังเซลล์เป้าหมายได้ดีกว่า อีกทั้งยังสามารถปรับแปลงพันธุกรรมให้มีคุณสมบัติเพิ่มขึ้นที่น่าสนใจได้อีกหลากหลาย อาทิเช่น ให้เชื่อมกับ สารเรืองแสง หรือ เอนไซม์ ทำให้เป็น bi- หรือ tri-specific (multimeric) antibody หรือให้เชื่อมกับยาหรือสารเคมีต่างๆ เพื่อการรักษาโรค เป็นต้น (Sassoon and Blanc, 2013) เรียกแอนติบอดีรูปแบบเหล่านี้ว่า conjugated antibody ซึ่งอาจ เชื่อมต่อม toxin หรือสารเคมีที่มีฤทธิ์ยัง

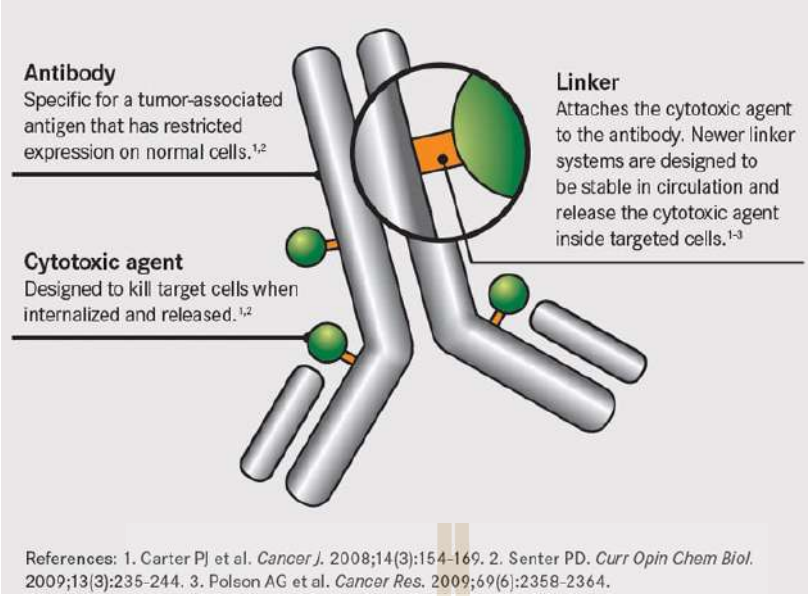
ยั้งการทำงานของเซลล์ (cytotoxic agents) เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง ดังแสดงในในรูปที่ 2 งานวิจัยล่าสุดที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้คือรายงานการใช้แอนติบอดีจาก ลามะ ซึ่งเป็นแอนติบอดีสายเดี่ยวที่สามารถจับและทำลายเชื้อ rotavirus ไปแสดงออกในข้าว ทำให้ได้ผลผลิตเป็นเมล็ดข้าวที่มีแอนติบอดี ซึ่งจากการค้นคว้าวิจัยพบว่า หนูที่บริโภคข้าวที่มีแอนติบอดีอยู่นี้ สามารถต้านทานการติดเชื้อ rotavirus ซึ่งทำให้เกิดโรคท้องร่วงรุนแรงและเฉียบพลันในเด็กได้ (Tokuhara et al., 2013) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าอาจนำข้าวชนิดนี้ ไปใช้ป้องกันการเจ็บป่วย และตายด้วยโรคท้องร่วง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในประเทศยากจนได้ดี



รูปที่ 1. แสดงโครงสร้างชิ้นส่วนแอนติบอดีแบบต่างๆ

ภาพแสดงแอนติบอดีแบบเต็มรูป ชนิด IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (IgG), ของสัตว์ตระกูลอูฐและลามะ (Camel Ig) และ ของปลาฉลาม (IgNAR) และลักษณะชิ้นส่วนของแอนติบอดีรูปแบบต่างๆ ได้แก่ แบบ Fab, scFv, ชิ้นส่วนโดเมนเดี่ยว (single-domain VH) รูปแบบต่างๆ คือ VH, VhH, และ V-NAR รวมทั้ง ชิ้นแอนติบอดีที่ประกอบจากหลายโมเลกุล (multimeric antibody) ได้แก่ bi-scFv, diabodies, triabodies, tetrabodies (Holliger and Hudson, 2005)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



(http://www.onclive.com/_media/_upload_image/ADC-elements-large.jpg)

รูปที่ 2. ส่วนประกอบต่างๆ ของ Antibody-Drug Conjugate (ADC) สำหรับรักษาโรคมะเร็ง

กลไกการทำลายเซลล์มะเร็ง ได้แก่ ๑) แอนติบอดีต้องจำเพาะกับ antigen ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง ซึ่งไม่มี หรือมีจำกัดในเซลล์ปกติ ๒) มีสารสำหรับทำลายเซลล์ (cytotoxic agent) เพื่อฆ่าเซลล์มะเร็งหลังจากถูกนำเข้าไปภายในและถูกปดปล่อยออกมา ๓) ตัวเชื่อม (linker) ระหว่าง cytotoxin agent และ antibody โดยตัวเชื่อมใหม่ๆ จะถูกออกแบบให้คงทนเมื่ออยู่ในระบบไหลเวียนในร่างกาย แต่จะปดปล่อยสารพิษต่อเซลล์เฉพาะเมื่อเข้าไปในเซลล์แล้ว

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 ซึ่งทำให้บริษัทหรือกลุ่มวิจัยสามารถผลิตยาตามต้องการเพื่อใช้ในการรักษาโรคได้อย่างจำเพาะ ยาชีวผลิตภัณฑ์ต่างก็เป็นยานวัตกรรม ซึ่งมีสิทธิบัตรคุ้มครอง และหลังจากหมดสิทธิบัตร ตัวยาสามารถมี Generic version ซึ่งเรียกว่า Biosimilar ออกมาได้ ทำให้ราคายาในตลาดถูกลงเพราะมีคู่เทียบ ทำให้ยาสามารถเข้าถึงผู้ป่วยจำนวนมากได้ เพราะต้นทุนในการผลิตลดต่ำลง ทำให้หลายๆ บริษัทหันมาลงทุนในกลุ่มอุตสาหกรรมยาประเภทนี้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมี Biobetters ซึ่งเป็น recombinant drugs ที่ปรับแต่งขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา หรือมีความปลอดภัยมากขึ้น ยาชนิดนี้สามารถจดสิทธิบัตรคุ้มครองและมีค่าราคาสูงขึ้น (Dolinar and

Reilly, 2013; Ventola, 2013)

มีการประมาณการว่าตลาด Biologics ในปี 2025 จะมีมูลค่าถึง 400 พันล้านเหรียญสหรัฐฯ นอกจากนี้ยังมีการประมาณการเติบโตของตลาดระบบ expression vectors มีมูลค่าประมาณ 317.1 ล้านเหรียญสหรัฐฯในปี 2020 (http://www.grandviewresearch.com) และมีการประมาณการว่าในขณะนี้ กำลังมีการพัฒนายาจากเทคโนโลยีชีวภาพมากกว่า 650 ชนิด และมากกว่า 1,500 ชนิด อยู่ในระหว่างการทดสอบทางคลินิก ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นโมโนโคลนอแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ซึ่งการเจริญเติบโตของยาประเภทนี้มีผลทำให้ความต้องการของระบบการผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดีมากขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นกัน

แหล่งที่ใช้ในการผลิตสารชีวภัณฑ์หลักๆ คือ mammalian cells และแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีแหล่งอื่นๆที่ใช้ในการผลิตเช่นกัน อาทิ transgenic models, avian, insect, และ transgenic animals (Frenzel et al., 2013) ระบบโปรคาริโอต ถูกใช้ในการผลิตโปรตีนอย่างง่ายที่ไม่ต้องการขบวนการเติม glycosaccharides แต่สารชีวภัณฑ์ส่วนมากต้องมีขบวนการ posttranslational modifications เพื่อให้ทำงานได้ในร่างกาย ดังนั้นจึงต้องใช้ animal hosts ในการผลิต ยกตัวอย่างเช่น CHO cells ซึ่งเซลล์นี้ถูกใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรมและระดับห้องปฏิบัติการ (Chusainow et al., 2009; Frenzel et al., 2013) เนื่องจากเซลล์นี้สามารถปรับตัวได้ง่าย เมื่อนำไปเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหารที่ไม่มีองค์ประกอบของสัตว์ ซึ่งจะไม่การปนเปื้อนไวรัสมนุษย์ อีกทั้งยังสามารถผลิตและหลั่งโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ในปริมาณที่สูง และมีรูปแบบของ glycosylation คล้ายกับมนุษย์ จึงสามารถช่วยป้องกันการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ไม่มีผลข้างเคียง และไม่ทำให้การกำจัดยา (clearance of a drug) เป็นไปอย่างรวดเร็ว (Jenkins et al., 2009; van Beers and Bardor, 2012; Zhu, 2012) โดยในการผลิตโปรตีนให้ได้ในปริมาณมากใน animal host จำเป็นต้องแทรกยีนของโปรตีนที่สนใจเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์เพื่อให้ยีนของโปรตีนที่สนใจสามารถเพิ่มปริมาณได้ในเซลล์เหล่านี้ได้ในระยะยาว และในปริมาณมากที่สูงพอ นอกจากนี้การหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการให้อาหาร และเลี้ยงเซลล์ก็สามารถเพิ่มผลผลิตโปรตีนได้เช่นกัน (Hacker et al., 2008) ทั้งนี้ขั้นตอนการสร้างเซลล์ที่ผลิตโปรตีนให้ได้ในปริมาณสูง เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก ปัจจุบันมีระบบการคัดเลือกเซลล์ที่หลากหลาย เช่น ระบบ DHFR, GS และ ระบบการคัดเลือกเมตาบอลิซึม (metabolic selection systems) เป็นต้น (Fan et al., 2012)

เมื่อนำ โมโนโคนอลแอนติบอดีไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ จะมีผลิตผลได้ตั้งแต่ 1–15 g/L ซึ่งการได้ผลผลิตที่สูง ส่วนหนึ่งเกิดจากการพัฒนาเซลล์ไลน์ด้วยวิธีที่มีประสิทธิภาพ เริ่มตั้งการออกแบบ

ระบบ vector การหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะที่สุดและการควบคุมกระบวนการผลิต (Huang et al., 2010) ให้เหมาะสม อย่างไรก็ตามความก้าวหน้าของเทคโนโลยีของ animal hosts ยังมีข้อจำกัดคือสามารถคัดเลือกโคลนที่มีความสารถผลิตโปรตีนได้สูงตามธรรมชาติเท่านั้น ถึงแม้จะผลิตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมก็ยังได้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาปรับปรุงระบบการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านให้สูงมากขึ้นกว่าเดิม มีหลายเทคโนโลยีที่สามารถใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพของ animal cells เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนที่สนใจยกตัวอย่างเช่น การเหนี่ยวนำ homologous recombination ด้วยวิธี adeno associated virus (rAAV)) แต่วิธีนี้สามารถแลกเปลี่ยนยีนได้แค่หนึ่ง allele ต่อครั้ง ซึ่งทำให้ขบวนการนี้ ใช้เวลานาน (Luo et al., 2012; Schultz and Chamberlain, 2008) และมีรายงานการใช้วิธีทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Directed evolution หรือ random mutagenesis แต่วิธีนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบที่ไม่ต้องการได้ (L. Meuris et al., 2014) อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการแก้ไขจีโนมคือ วิธี Zinc finger nucleases (ZFNs) ซึ่งมีหลักการคล้ายกับระบบของ CRISPR/Cas9 แต่ประสิทธิภาพและความจำเพาะต่ำกว่า (Gaj et al., 2013; Pattanayak et al., 2011).

ด้วยการปรับปรุงพัฒนา ระบบการผลิตแอนติบอดีใน animal host เพื่อใช้ในการผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรมให้มีประสิทธิภาพและผลิตผลที่สูงขึ้น มีความน่าสนใจและจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศ ห้องปฏิบัติการอณูเทคโนโลยีชีวภาพ จึงได้ริเริ่มงานวิจัย และพัฒนา เพื่อสร้างระบบการผลิต therapeutic antibody ที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อใช้ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต และเพื่อให้ประชาชนทั่วไปสามารถเข้าถึงการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ราคาถูก อีกทั้งยังอาจช่วยพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศให้อย่างยั่งยืนต่อไปด้วย

การพัฒนาการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ต้นแบบของโครงการวิจัย: Adalimumab

Adalimumab จัดเป็นยาชีววัตถุ ที่เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) แบบ human IgG1 (Immunoglobulin G1) มีฤทธิ์ anti-TNF-alpha และใช้รักษาโรคภูมิแพ้ตัวเองหลายโรค เช่น rheumatoid arthritis และ psoriatic arthritis สาเหตุที่เลือก adalimumab เป็นยาต้นแบบในโครงการวิจัยนี้ เพราะยาตัวนี้ผลิตขึ้นมาจากเทคโนโลยีการผลิตแอนติบอดีบนผิวเฟจ ซึ่งทำให้ผู้คิดค้นคือ Greg Winter ได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมี ไปเมื่อปี 2018 อีกทั้ง ยานี้มียังยอดขายที่สูงสุดในปี ค.ศ. 2013 และที่สำคัญคือ สิทธิบัตรยาตัวนี้หมดอายุไปแล้วตั้งแต่ปี ค.ศ. 2016 จึงสามารถผลิตในลักษณะของยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars) ได้

เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ผลิต Adalimumab เป็นเซลล์ที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการผลิต แอนติบอดี

คือ Chinese hamster ovary cells (CHO cells) เนื่องด้วยหลายเหตุผล เช่น เป็นเซลล์แขวนลอย (suspension cells) ที่สามารถเลี้ยงในมีเดียสังเคราะห์ที่ทราบส่วนประกอบที่แน่นอนและไม่มีซีรัมเป็นส่วนประกอบ (chemically-defined serum-free medium) นอกจากนี้ในการผลิต Humira® ที่เป็น adalimumab ต้นแบบ ยังใช้ CHO cells ในการผลิตด้วยเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง glycosylation pattern ระหว่าง adalimumab ที่ผลิตเองกับ Humira® ที่เป็นต้นแบบ จึงควรใช้ CHO cells ในการเป็นต้นแบบสำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตในโครงการวิจัยนี้

นอกจากเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จในการผลิตแล้ว การพัฒนา expression vector ก็มีความสำคัญ เนื่องจากมีผลต่อการแสดงออกของยีนหลังจากนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Transfection) โดยในการพัฒนา expression vector มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ เพพไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) ของแอนติบอดีที่ต้องการผลิต รวมถึงยีนที่ใช้คัดเลือก positive clone เช่นการใช้แอนติไบโอติก (antibiotic drug) และ ยีนที่มีผลต่อการคัดเลือกโคลน และเพิ่มปริมาณของ copy number ของยีนที่ต้องการ (gene amplification system) สำหรับ CHO cells มี amplification system หลักๆ 2 ระบบ ได้แก่ ระบบ DHFR (dihydrofolate reductase) คู่กับการใช้ methotrexate (MTX) และ ระบบ GS (glutamine synthetase) คู่กับการใช้ methionine sulphoximine (MSX)

เมื่อทำการคัดเลือกหาเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม และการพัฒนา expression vector แล้ว ขั้นตอนถัดไปคือ transfection ซึ่งมีทั้งแบบ physical และ chemical ในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เพื่อผลิตแอนติบอดีหรือโปรตีนที่ต้องการ อย่างไรก็ตามไม่ใช่ทุกเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยการใช้หลักการของ antibiotic resistant gene และ/หรือ gene amplification system เพื่อหา cell pool ที่ผลิตแอนติบอดีได้สูงที่สุด ก่อนนำไปคัดเลือกหา high producing single clone หรือโคลนเดี่ยวที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้สูง (high titer) ปริมาณแอนติบอดีต่อ 1 เซลล์ใน 1 วัน (specific productivity หรือ qP; pg/cell/day) และมีความ เสถียร หรือความสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาการผลิตที่กำหนดไว้ (clone stability) ซึ่งมีหลายวิธีในการคัดเลือก โดยวิธีที่ง่ายที่สุด และไม่ต้องการเครื่องมือหรืออุปกรณ์พิเศษ คือ limiting dilution อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสีย คือ ใช้เวลาและแรงงานมาก ประสิทธิภาพการคัดเลือกโคลนเดี่ยวต่ำ อาจจำเป็นต้องทำซ้ำหลายรอบเพื่อให้มั่นใจว่าได้โคลนเดี่ยว (monoclonality)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษาหาเซลล์เจ้าบ้าน (expression host) ที่เหมาะสม

ทำการสืบค้นข้อมูลจากบทความทางวิชาการ งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เพื่อจัดหา cell line ที่เหมาะสมในการเป็นเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับผลิตแอนติบอดี หรือชีวผลิตภัณฑ์ ในระดับห้องปฏิบัติการ และสามารถนำไปต่อยอดการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้ในอนาคต

การพัฒนา expression vector

ขั้นที่๑

การค้นหา ออกแบบ สังเคราะห์ยีนของแอนติบอดีที่ต้องการผลิต ซึ่งประกอบด้วย ส่วน Heavy chain และ Light chain ของ adalimumab (Humira) และ Trastuzumab (Herceptin) (เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ) ผ่านบริษัท GeneART, Thermo Fisher Scientific และ GenScript, USA โดยให้มีการทำ codon optimized ให้เหมาะสมในการ expression ในเซลล์สัตว์

ขั้นที่๒

การจัดหา expression vector ที่เหมาะสม ได้แก่ pcDNA 3.4 และ pCHO 1 เพื่อทำการสร้าง expression vector สำหรับการผลิต adalimumab 2 ประเภท คือ ก) ใช้ระบบ bi-vector โดย การใช้เวคเตอร์ pcDNA 3.4 จำนวน 2 ชิ้นเพื่อผลิต heavy chain และ light chain สำหรับการผลิตแบบ transient expression ใน Expi293 cells และ ข) ระบบ mono-vector โดยใช้เวคเตอร์ pCHO1 ที่มีทั้งยีนของ heavy และ light chain อยู่ด้วยกันใน vector เดียว แต่ควบคุมด้วย 2 promoter เพื่อใช้ทำ stable expression ใน CHO-S cells ซึ่งในระบบ mono-vector นี้ ได้สร้าง vector 2 แบบ โดยมีการสลับตำแหน่งยีนส่วน heavy chain (HC) กับ light chain (LC) นอกจากนั้นแล้ว ยังได้สร้าง expression vector สำหรับเป็นตัวควบคุมการทดลองอีก 2 ชนิดคือ Vector ที่ผลิตโปรตีนเรืองแสง EmGFP และผลิตยา Herceptin® (Trastuzumab) เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นนำ vector ที่ได้สร้างขึ้นมาทั้งหมด ไปทำการตรวจสอบความถูกต้องด้วย automated DNA sequencing และ DNA analysis software

การผลิตแอนติบอดีแบบ Transient expression และการทำให้บริสุทธิ์

การผลิตแอนติบอดีใน Expi293 cells

ในขั้นแรกได้ทำการหา ratio ที่เหมาะสมของ H-chain และ L-chain โดยทำการ transfect vector H-chain และ L-chain ที่มียีน adalimumab เข้าสู่ Expi293 โดย Ratio ที่ใช้ระหว่าง HC: LC แตกต่างกันได้แก่ 1:2, 1:2.5, 1:3 และ 1:4 โดยใช้ ExpiFectamine 293 transfection reagent ที่เป็น cationic lipid-based เป็นสื่อนำพา DNA เข้าสู่ cell หลังจาก transfection 1 วัน ทำการเติม Enhancer ให้แก่เซลล์ และเลี้ยงต่ออีก 6-7 วัน โดยแอนติบอดีจะออกจากเซลล์มาอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 1300xg เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บส่วน supernatant ที่อยู่ด้านบน ปริมาณ DNA ที่ transfect จะเท่ากับปริมาตรเซลล์ที่ใช้ ยกตัวอย่างเช่น ต้องการผลิต IgG ด้วยเซลล์ที่มีปริมาตร 2 ml ทำได้โดยใช้ DNA 2 µg ซึ่งสามารถทำการตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ ELISA

หลังจากได้ ratio ที่เหมาะสมของ H-chain และ L-chain แล้ว ทำการผลิต adalimumab และ trastuzumab โดยการ transfect vector เข้าสู่ Expi293 cell ปริมาตร 25 ml จากนั้นนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง FPLC

IgG สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้คอลัมน์ Hi-Trap Protien A 1 mL (GE healthcare, UK) ซึ่งมีประสิทธิภาพดีในการจับกับ IgG ได้ มีขั้นตอนดังนี้

1) ทำการ Pump wash purified ทั้งระบบด้วย deionized water (DI water) ที่ผ่านการกรอง จากนั้นทำการ Pump wash purified ให้สาย A เป็น 1xPBS buffer และ B เป็น elution buffer (0.1M glycine-HCl; pH3.5)

2) ตั้งค่าโดยใช้โปรแกรมของเครื่อง AKTA (GE healthcare, UK) ซึ่งมีรายละเอียดคือ sample flow: 1 ml/min, Method base: sample pump, Flow path: injection vavle, Alam pressure: 0.5 mPa จากนั้นทำการติดตั้ง Hi-Trap Protien A column เข้ากับเครื่อง

3) ล้างคอลัมน์ด้วย DI water 5 ml ผ่านสาย sample จากนั้น กดปุ่ม pause เปลี่ยน DI เป็น 1XPBS buffer และล้างต่อไปอีกประมาณ 5 ml

4) นำสาย sample ใส่ลงใน tube ที่มี supernatant ที่ได้มาจากการผลิตแอนติบอดี (กรองด้วย 0.45 µm) ตั้งค่า auto zero เพื่อให้ค่า OD เป็น 0 แล้วโหลด sample ผ่าน column จนเกือบหมด เมื่อโหลด sample เครื่องจะวัดค่า OD ไปด้วย จากจอแสดงผลจึงเห็น

เส้นกราฟค่า OD เริ่มสูงขึ้น โดยระหว่างที่โหลด sample นี้ให้ตั้งค่าเครื่องให้ทำการเก็บ fraction ซึ่ง fraction ที่เก็บได้นี้คือ Flow through นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการจับของแอนติบอดีกับคอลัมน์

5) กดปุ่ม pause เพื่อหยุดการโหลด sample แล้วเปลี่ยนหลอด sample เป็น 1xPBS buffer ปริมาตร 20 ml จนค่า OD จะเข้าใกล้ 0 หรือจนถึง 0 จากนั้นกดปุ่ม pause อีกครั้ง

6) เริ่มทำการ elute แอนติบอดี โดยการตั้งค่า Gradient: 100% B, Fractionation: 20 ml (เก็บ fraction ละ 1 ml) และเก็บ tube ที่แสดงพีค (peak) ของโปรตีน ซึ่ง fraction ที่เก็บมานี้ คือแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการ elute โปรตีน มีความเป็นกรด สามารถทำให้กลาง (neutralized) ด้วยการเติม 1M Tris-HCl (pH 8.5) ก่อนนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ทั้งนี้ คอลัมน์ Hi-Trap Protien A นี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยต้องทำการ Regenerate column ด้วย 0.1M glycine-HCl (pH 2.5) ประมาณ 5 ml หลังจากนั้น pump ด้วย DI water หลังจากนั้นนำสายทุกสาย ใส่ลงใน 20%ethanol ป้อนคำสั่งให้เครื่องโหลด 20% ethanol เข้าไปในสายทุกสายและคอลัมน์ จากนั้นทำการถอดคอลัมน์ออก แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

7) ทำการวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง nanodrop เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบการจับของ antibody ต่อโปรตีนเป้าเหมาย ด้วยวิธี ELISA

วิธีการการตรวจสอบการจับของ adalimumab และ trastuzumab ต่อโปรตีนเป้าเหมายด้วยวิธี ELISA มีขั้นตอนดังนี้

1) ทำการ immobilized target ด้วย TNFα (GenScript, USA) และ ErbB2 ปริมาณ 0.2 และ 0.84 µg ตามลำดับ ที่ละลายใน PBS 100 µl ลงไปในหลุมของ 96-well plate ให้เท่ากับจำนวนตัวอย่างที่ต้องการทำการวิเคราะห์ โดยมี 2% MPBS (2%skimmed milk in PBS) ยา Humira® ยา Herceptin และ Expi293 cell เป็นตัวแปรควบคุม (background) โดยควรทำการทดสอบแบบสองซ้ำ (duplicate) เพื่อความถูกต้อง ปิดปากหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

2) ทิ้ง target และเติมนมปลอดไขมัน 2% MPBS (ปริมาตร 200 µl) ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกัน (block) การจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific binding)

3) คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBS 3 รอบ ก่อนทำการเติม adalimumab (2 µg) trastuzumab (1 µg) ยา Humira® (0.25 µg) ยา Herceptin® (1 µg) และ Expi293 cell ปริมาตร 100 µl ปิดปากหลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4) คว่ำทิ้งสารที่อยู่ในหลุม แล้วล้างด้วย PBST (PBS + 0.05% Tween20) 3 รอบ แล้วตามด้วยการล้างโดยใช้ PBS 2 รอบ

5) เติม ProteinA-HRP ที่เจือจาง 1:5,000 เท่าใน PBS ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6) ล้างด้วย PBST 3 รอบ แล้วล้างด้วย PBS 2 รอบ ก่อนเติมสาร ABTS ปริมาตร 100 µl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่มืด ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที

7) ทำการวัดค่าความเข้มของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการอ่านค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA micrpplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

การเลี้ยงเซลล์ CHO-S

การเลี้ยงเซลล์ CHO-S จะเลี้ยงใน 125ml-shake flask ใน incubator shaker ที่กำหนดให้มีอุณหภูมิ 37°C ปริมาณของ CO_2 ที่ 8% และถูกเขย่าด้วยความแรง 150 rpm และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 8mM L-glutamine (Thermo Scientific, cat no.25030081) ใน Gibco™ CDFortiCHO (Thermo Scientific, cat no.A1148301) หลังจากกระบวนการ transfection จะใส่ 1% anti-clumping solution (Thermo Scientific, cat no. 0010057DG) เพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ข้างต้น สำหรับการประเมิน clone stability จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 8mM L-glutamine และ 1% anti-clumping solution ใน Gibco™ Dynamis (Thermo Scientific, cat no. 1IVG5-A26615-01)

การเลี้ยงเพื่อประเมินค่า productivity

การประเมินค่า productivity จากการเลี้ยงเซลล์แบบ 5 วัน

ใช้เซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น $3x10^5$ cells/ml ปริมาตร 30 ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่กำหนด แล้วเก็บ supernatant เมื่อเลี้ยงครบ 5 วัน เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยวิธี ELISA

การประเมินค่า productivity จากการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch

ใช้เซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น $3x10^5$ cells/ml ปริมาตร 30 ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่กำหนด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

โดยในวันที่ 3 และ 5 ให้เติมกลูโคสลงไปในฟลาสก์ที่เลี้ยงเซลล์ ที่ 4g/l สำหรับในวันที่ 7 ให้เติมกลูโคส 6 g/l และเลี้ยงเซลล์จนครบ 14 วัน หรือมีเซลล์ตายมากกว่า 50% (% cell viability < 50%) โดยกำหนดให้มีการสุ่มเก็บตัวอย่าง supernatant ในวันที่ 3, 5, 7, 10, 12 และ 14 เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยวิธี ELISA ทั้งนี้ให้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างก่อนเติมกลูโคสในวันที่ 3, 5 และ 7

การประเมินค่า productivity จากการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch สำหรับขั้นตอน clone stability assessment

ใช้เซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น $3x10^5$ cells/ml ปริมาตร 30 ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่กำหนด และในวันที่ 3 เติมกลูโคส 5 g/l จากนั้นเก็บ supernatant ในวันที่ 7 เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยวิธี ELISA

การวิเคราะห์หาปริมาณ adalimumab ที่ผลิตได้จาก CHO cells ด้วยวิธี ELISA

วิธี ELISA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีขั้นตอนสรุปดังนี้ นำ Protein A (GenScript, cat no. GSZ02201) ปริมาตร 100 µl เคลือบติดพื้นผิวในแต่ละหลุมของ flat-bottom 96-well plates (Invitrogen, cat no. 44-2404-21) และทำการบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 12 ชั่วโมง และ Protein A ส่วนเกินจะถูกชะล้างออกด้วยการใช้ PBST (0.05% Tween 20 in PBS) ปริมาตร 200 µl ในแต่ละหลุม จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม blocking buffer (1% BSA in PBST) หลุมละ 200 µl และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีการล้างส่วนเกินของ blocking buffer แต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง ก่อนที่จะเติมตัวอย่าง (เจือจางด้วยสารละลาย PBS ที่อัตราส่วนที่เหมาะสม) หรือสารมาตรฐาน (Humira® ที่ความเข้มข้นต่างๆ) หลุมละ 100 µl และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม Peroxidase AffiniPure F(ab')2 fragment goat anti-human IgG (H+L) HRP (Jackson Immuno Research Laboratories, cat no. 109-036-088) หลุมละ 100 µl และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งส่วนเกินของแอนติบอดีนี้จะถูกชะล้างออกด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง ก่อนที่จะเติมสารละลาย TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) solution (Thermo Scientific, cat no. 34028) หลุมละ 100 µl และบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ก่อนที่จะเติม 2M H_2SO_4 หลุมละ 50 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Sunrise™, Tecan) โดยการคำนวณหาปริมาณของ adalimumab ที่ผลิตได้

หรือค่า titer อาศัยการคำนวณจากกราฟมาตรฐานแบบ four parameter logistic (4PL) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism version 8 สำหรับค่า specific productivity หรือ qP จะถูกคำนวณตามสมการโดยอาศัยค่า titer และ integral viable cell density (IVCD) เพื่อหาปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้ในหน่วยพิโคกรัมต่อ 1 เซลล์ ใน 1 วัน

ทั้งนี้วิธี ELISA ที่ใช้มีความจำเป็นต้องทำ checkerboard titration ก่อนนำไปใช้ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Protein A และ labelled detection antibody นอกเหนือจากการหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารมาตรฐาน (Humira®)

การคัดเลือกหา high producing single clone

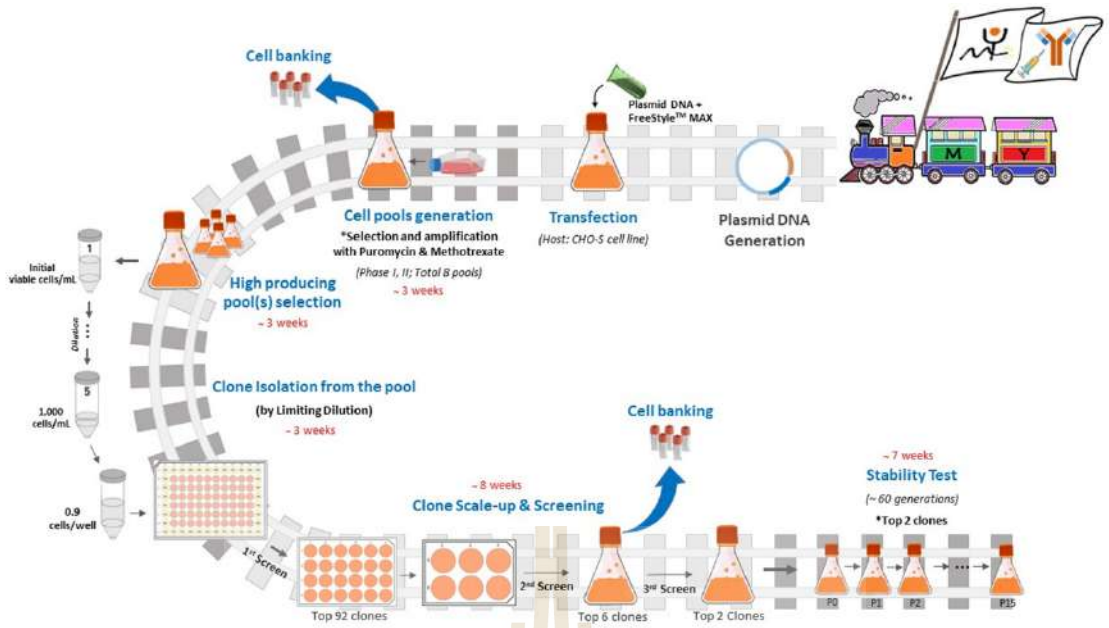
ขั้นตอนการคัดเลือก high producing single clone หรือโคลนเดี่ยวที่มีกำลังผลิตสูงและสม่ำเสมอ อ้างอิงและดัดแปลงจากโปรโตคอลของ Freedom™ CHO-S™ kit user guide (Thermo Scientific, cat no. A13696-01, Publication no. MAN0003505) ซึ่งสามารถสรุปได้ตามรูปที่ 3 โดยมีขั้นตอนเริ่มจากนำ expression vector ที่พัฒนาขึ้นมา 2 ชนิด ได้แก่ LCHC และ HCLC (รูปที่ 11) ที่มียีนของ LC และ HC ของ adalimumab รวมถึง control vector ที่มียีน EmGFP ทำการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI เพื่อเปลี่ยนจากพลาสมิดแบบวงกลม (circular plasmid DNA) เป็นพลาสมิดสายตรง (linearized plasmid DNA) ก่อนที่จะนำแต่ละพลาสมิดดีเอ็นเอนี้เข้าสู่เซลล์ (transfection) CHO-S ในแต่ละฟลาสก์ (รูปที่ 4) โดยอาศัย FreeStyle ™ MAX reagent (Thermo Fisher Scientific, cat no. 16447100) ซึ่งเป็น transfection แบบ lipid-based reagent หลังครบเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์หา transfection efficiency จากฟลาสก์ที่นำยีน EmGFP เข้า CHO-S cells โดยใช้เทคนิค Flow cytometry และวิเคราะห์หาปริมาณของ adalimumab ที่ผลิตได้ โดยใช้วิธี ELISA ตามข้อ 4

จากนั้นนำฟลาสก์ที่ใช้ expression vector แบบ LCHC และแบบ HCLC ทำการคัดเลือก cell pools ที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ด้วย puromycin ร่วมกับ methotrexate (MTX) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (รูปที่ 5) ในการคัดเลือกรอบที่ 1 (selection phase 1) จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้ puromycin 10 µg/ml ร่วมกับ MTX 10 nM (คือ cell pool ชื่อ LCHC-1 10P/100M และ HCLC-1 10P/100M) และกลุ่มที่ได้ puromycin 20 µg/ml ร่วมกับ MTX 20 nM (คือ cell pool ชื่อ LCHC-2 20P/200M และ HCLC-2 20P/200M) ภายหลังจากที่เซลล์มี % cell viability มากกว่า 90% จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณ adalimumab ที่ผลิตได้ จากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน

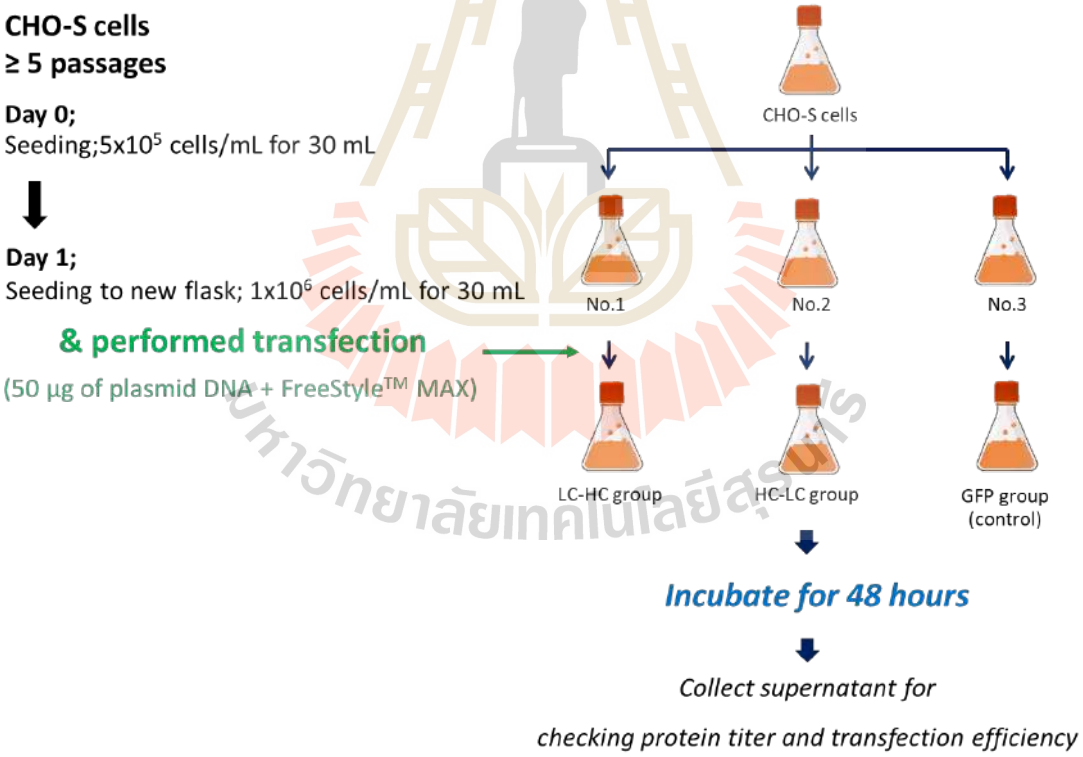
หลังจากนั้นจะเข้าสู่การคัดเลือกรอบที่ 2 (selection phase 2) ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ได้ puromycin 30 µg/ml ร่วมกับ MTX 500 nM (คือ cell pool ชื่อ LCHC-1 30P/500M, LCHC-2 30P/500M, HCLC-1 30P/500M และ HCLC-2 30P/500M) และกลุ่มที่ได้ puromycin 50 µg/ml ร่วมกับ MTX 1000 nM (คือ cell pool ชื่อ LCHC-1 50P/1000M, LCHC-2 50P/1000M, HCLC-1 50P/1000M และ HCLC-2 50P/1000M) เมื่อเซลล์มี % cell viability มากกว่า 90% จะทำการวิเคราะห์หา ปริมาณ adalimumab ที่ผลิตได้ จากการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch เป็นเวลา 14 วัน (หรือน้อยกว่า 14 วัน ถ้าเซลล์ตายมากกว่า 50 %) เพื่อประเมินว่า cell pool ใด มี productivity หรือระดับการผลิตต่อ 1 เซลล์สูงที่สุด เพื่อนำไปคัดเลือกหา high producing single clone ต่อไป

การคัดเลือกหา high producing single clone จะใช้วิธี limiting dilution ใน 96-well plate โดยทำการเจือจางเซลล์ให้มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 4.5 cells/ml จากนั้นปิเปต 200 µl ลงในแต่ละหลุมที่กำหนดไว้ (หลุมที่กำกับด้วยตัว C ในรูปที่ 4) ทั้งหมด 16 plates โดยมีการเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมแบบ static culture เป็นเวลา 18 วันก่อนทำการประเมินรอบที่ 1 (Primary screening) ด้วยวิธี ELISA เพื่อหาโคลนเดี่ยวที่สามารถผลิต adalimumab ได้สูงสุดจำนวน 100 clones แรก จากนั้นนำโคลนเดี่ยวเหล่านี้เพิ่มปริมาณและทำการประเมินรอบที่ 2 (secondary screening) จากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วันใน 6-well plate เพื่อคัดเลือกหาโคลนเดี่ยวที่มีค่า productivity สูงสุด 5 อันดับแรก ไปทำการประเมินรอบที่ 3 (tertiary screening) จากการเลี้ยงเซลล์ใน 125ml-shake flask แบบ fed-batch เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นโคลนเดี่ยว จำนวน 2 clones ที่มีค่า productivity สูงสุด 2 อันดับแรกจะถูกประเมินความสม่ำเสมอในการผลิตแอนติบอดี (clone stability assessment) โดนมีวิธีการสรุปตามรูปที่ 7

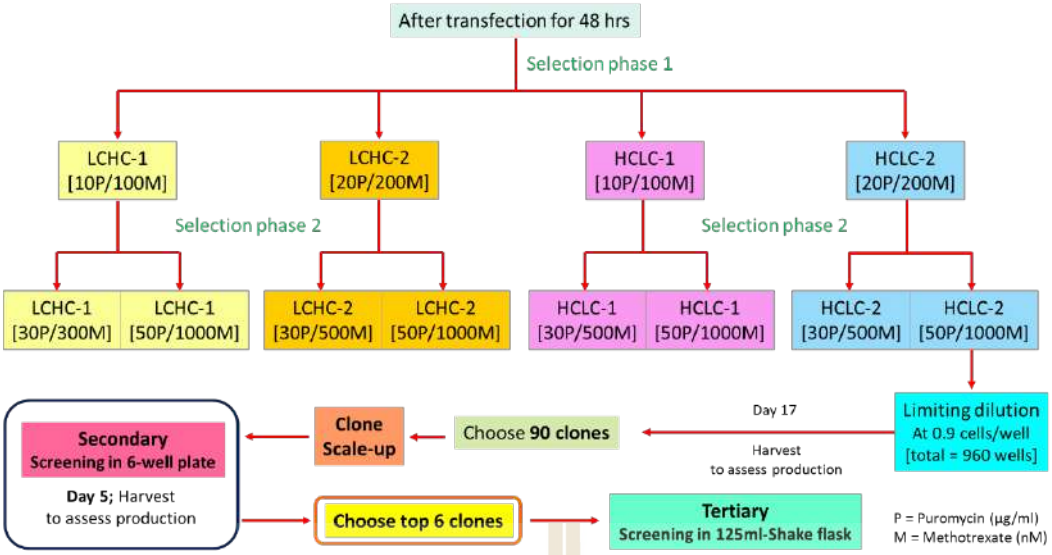
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



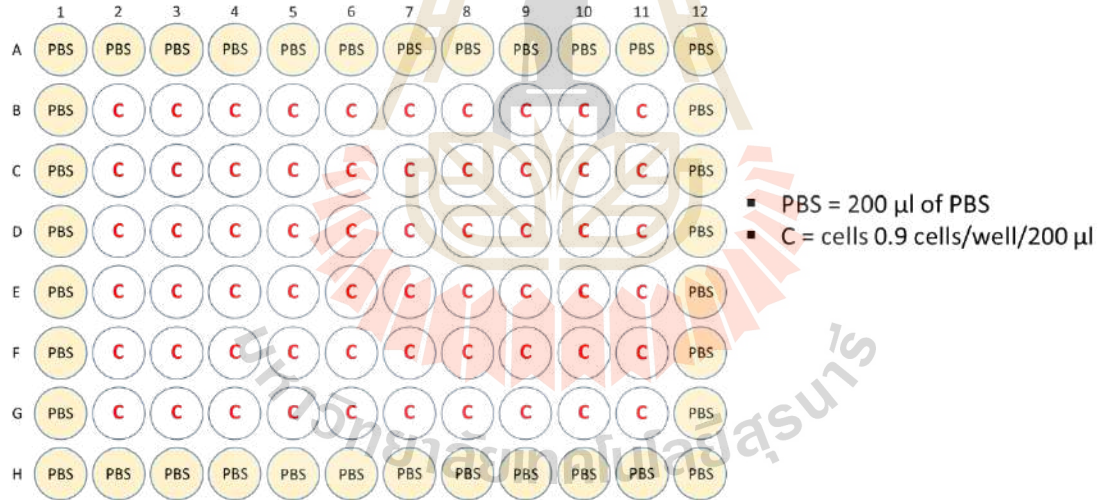
รูปที่ 3. แผนภาพสรุปขั้นตอนการคัดเลือกโคลนเดี่ยวที่มีกำลังผลิตสูงและเสถียร



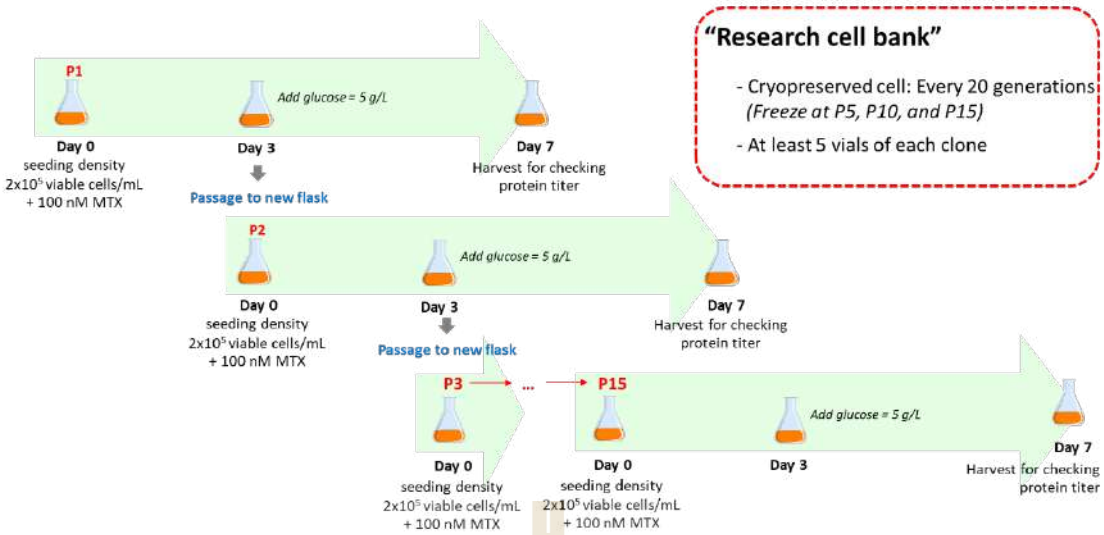
รูปที่ 4. สรุปการเตรียม CHO-S cells และ transfection



รูปที่ 5. สรุปขั้นตอนการคัดเลือก high producing single clone



รูปที่ 6. แผนผัง 96-well plate สำหรับการคัดเลือกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution



รูปที่ 7. สรุปขั้นตอนการทำ clone stability assessment

การผลิตแอนติบอดีใน Bioreactor

ขั้นตอนสรุปตามรูปที่ 8 กล่าวคือ ได้มีการทดลองนำเซลล์ที่ผลิต adalimumab ได้ในเบื้องต้น เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วย ActiPro medium (GE Life Science, cat no. SH31037.01) ปริมาตร 3 ลิตร โดยมีการเติม supplement 7a (GE Life Science; SH31026.01) และ supplement 7b (GE Life Science, cat no. SH31027.01) ทุกวันเริ่มตั้งแต่ในวันที่ 3 เป็นเวลา 13 วัน โดยมีการควบคุมอุณหภูมิ พีเอช และค่า pO_2 และได้มีการวิเคราะห์หาปริมาณของแอนติบอดีที่ผลิตได้ ความเข้มข้นของกลูโคส แอมโมเนีย และแลกเตท

หลังครบ 13 วัน นำ supernatant ที่ได้ไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น (concentrate) และเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer exchange) เป็น PBS ด้วย Vivaflow 200 crossflow device (Sartorius, cat no. VF20P0) รวมถึงทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย HiScreen MabSelect PrismA 1x4.7mL (GE Lifesciences, cat no. 17549815) ซึ่งจัดเป็นเทคนิค Protein A affinity chromatography

รูปที่ 8. สรุปขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และการทำให้บริสุทธิ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

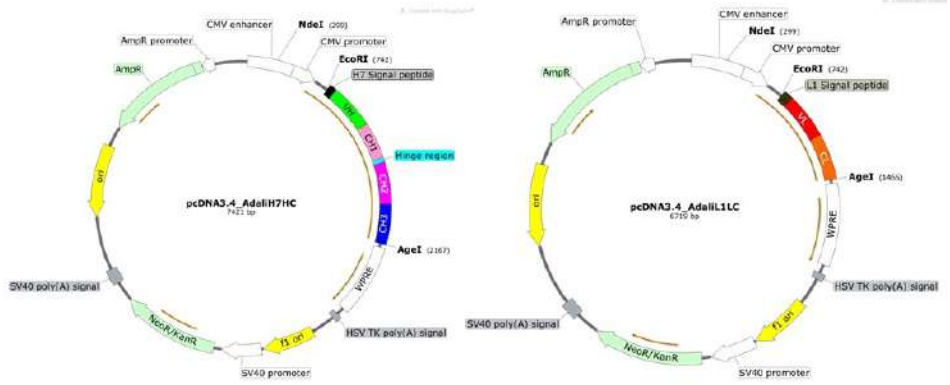
ศึกษาหาเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม

จากการสืบค้นข้อมูลเพื่อจัดหา cell line ที่เหมาะสม ซึ่งได้เลือกเซลล์เจ้าบ้าน 2 ชนิด ได้แก่ Expi293 (Thermo Scientific, USA) สำหรับtransient expression system และ CHO-S (Thermo Scientific, USA) สำหรับ stable expression system เพื่อใช้สำหรับผลิตยา แอนติบอดี ในโครงการวิจัยนี้ โดยทั้ง 2 cell line ได้รับการออกแบบ พัฒนาให้สามารถผลิตยาในระดับ GMP ได้

การพัฒนา expression vector สำหรับผลิตยาชีววัตถุ

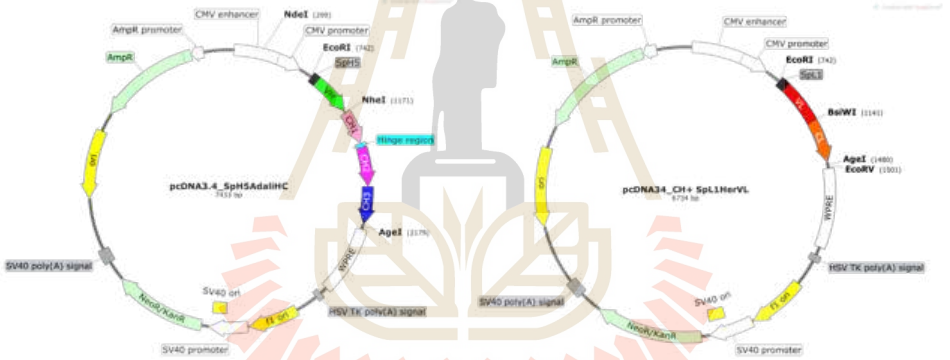
แผนที่ expression vectors ที่ได้สร้างขึ้นจากโครงการวิจัย หลังจากได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเส้น DNA เพื่อยืนยัน และวิเคราะห์ผลความถูกต้องแล้ว ดังแสดงในรูปที่ 9-11 ยีนทั้งหมดถูกควบคุมแบบ monocistronic โดย vector สำหรับใช้ในระบบ transient expression ถูกสร้างใน vector pcDNA 3.4 โดยสร้างเป็นแบบ bi-vector คือเป็น vector สำหรับ H-chain และ L-chain สำหรับผลิต adalimumab (รูปที่ 9) และ trastuzumab (รูปที่ 10) ในส่วนของ expression vector ที่ใช้ในระบบ stable expression ถูกสร้างใน vector pCHO1 แบบ mono-vector คือมีทั้งยีน H-chain และ L-chain ที่ควบคุมโดย promoter 2 ชนิด โดยมีการสลับยีน H-chain และ L-chain ให้ใช้ promotor ที่แตกต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิต adalimumab ด้วย CHO-S cells แบบ stable expression (รูปที่ 11) ส่วนโปรตีนเรืองแสง EmGFP ที่ใช้เป็นโปรตีนควบคุมในการ transfection ถูกสร้างใน vector pCHO1 และ pcDNA 3.4 ดังแสดงในรูปที่ 12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



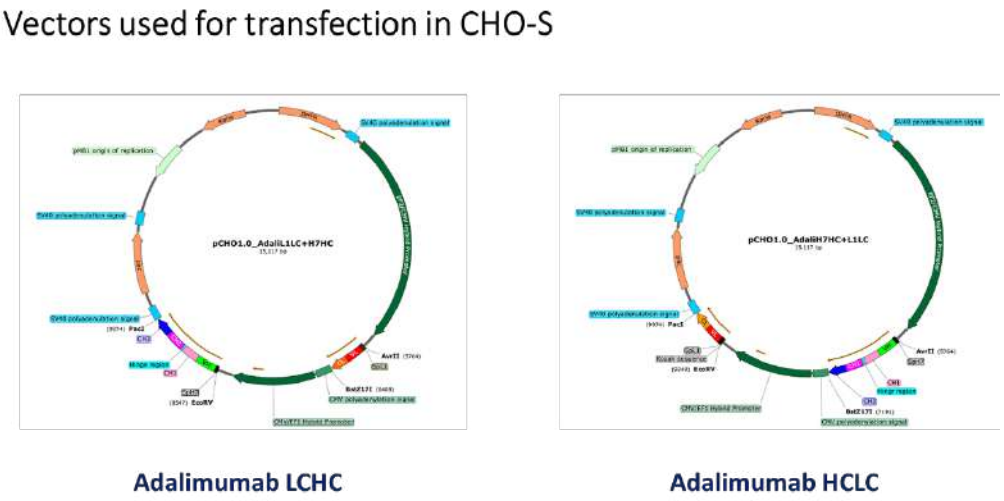
รูปที่ 9. ระบบ Bi-vector สำหรับผลิต Adalimumab

แสดง pcDNA 3.4 vector แบบ monocistronic สำหรับการผลิต adalimumab ในระบบ bi-vector ที่แบ่งเป็น vector H-chain และ L-chain เพื่อ express ใน Expi293 cells แบบ transient expression



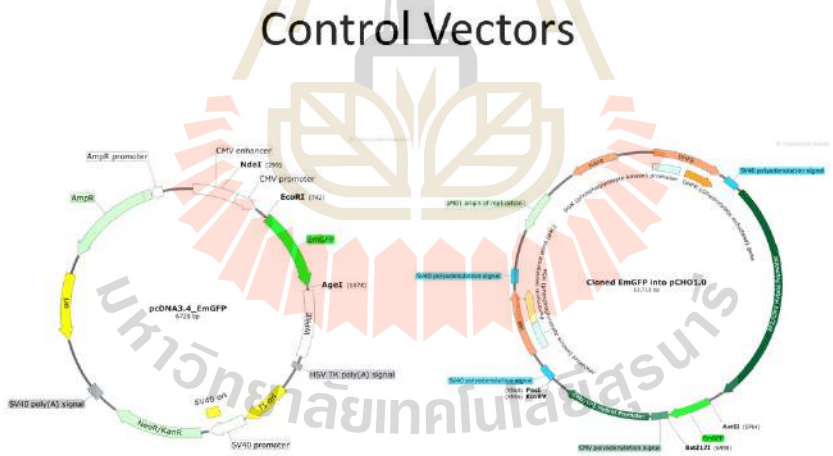
รูปที่ 10. ระบบ Bi-vector สำหรับผลิต Trastuzumab

แสดง pcDNA 3.4 vector แบบ monocistronic สำหรับการผลิต trastuzumab ในระบบ bi-vector ที่แบ่งเป็น vector H-chain และ L-chain เพื่อ express ใน Expi293 cells แบบ transient expression



รูปที่ 11. Mono-vector ที่ใช้ในการผลิต adalimumab

แสดง expression vector แบบ mono-vector ที่มีทั้ง H- และ L- chains ของ adalimumab ที่ถูกควบคุมโดย 2 promoter ที่แตกกต่างกัน สำหรับใช้ในการผลิตแอนติบอดีจากเซลล์ CHO-S ในระบบ stable expression system



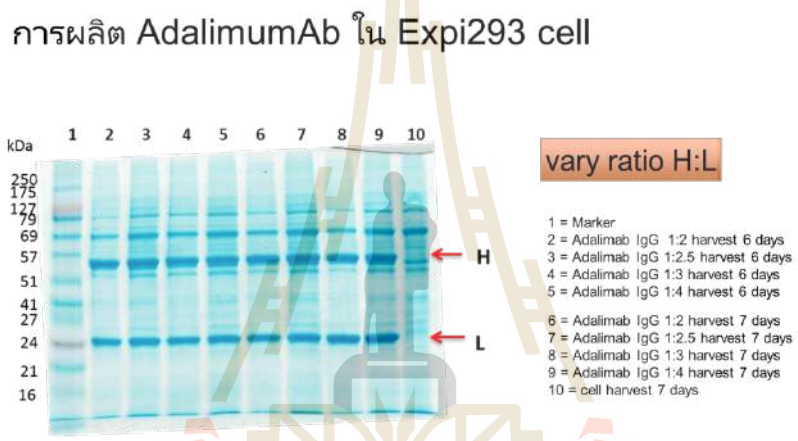
รูปที่ 12. Vector ควบคุม ที่ใช้ผลิตโปรตีนเรืองแสง EmGFP

แสดง Expression vector ใน pcDNA 3.4 และ pCHO1 Vector ที่ใช้ผลิตโปรตีนเรืองแสง EmGFP ที่ใช้เป็นตัวแปรควบคุม (control vector) ในงานวิจัยนี้

การผลิตแอนติบอดีแบบ transient expression

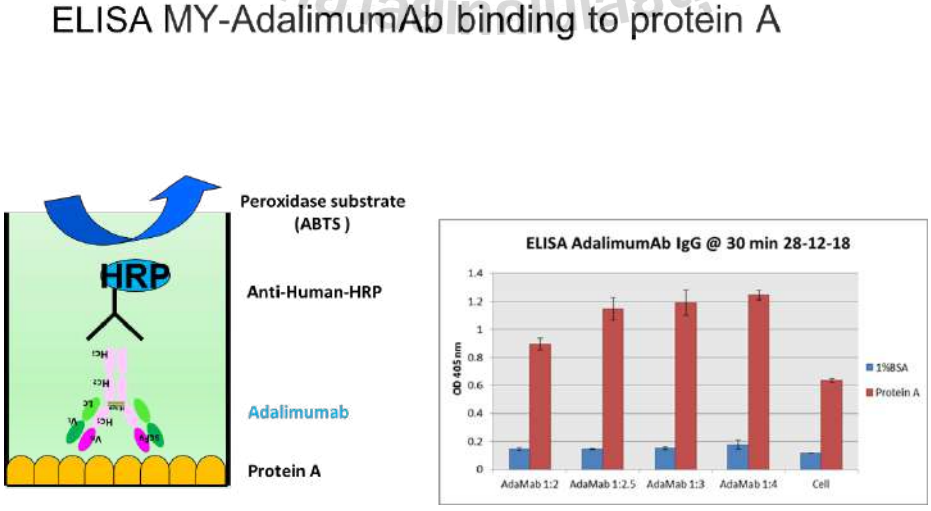
การหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่าง H-chain และ L-chain

ในการผลิต adalimumab แบบ transient expression จาก Expi293 cells นั้น ในขั้นแรกต้องทำการหาสัดส่วนของ vector ที่ใช้สร้าง heavy chain ต่อ light chain ที่เหมาะสม ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี ดังรูปที่ 13 และความสามารถในการจับกับเป้าหมาย ดังรูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของ heavy chain ต่อ light chain มีผลต่อปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้เพียงเล็กน้อย แต่มีผลต่อความสามารถในการจับกับเป้าหมายแตกต่างกัน ผลที่ได้จากการทดลองนี้สรุปว่า อัตราส่วน vector ของ H-chain และ L-chain ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต antibody คือที่ 1:3



รูปที่ 13. SDS-PAGE แสดงผลอัตราส่วนยีน Heavy และ Light Chain ต่อการผลิตแอนติบอดี

SDS-PAGE แสดง heavy chain และ light chain ของ adalimumab ที่ผลิตได้ จาก HEK293 cells ที่ถูก transfect ด้วย vector ของ heavy chain และ light chain ที่มีอัตราส่วน ต่าง ๆ กัน

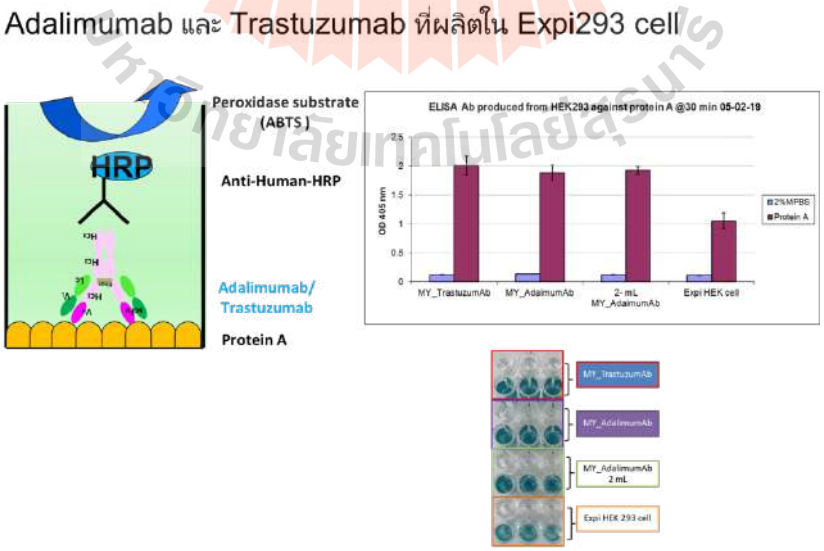


รูปที่ 14. ELISA แสดงผลอัตราส่วนยีน Heavy และ Light Chain ต่อการผลิตแอนติบอดี

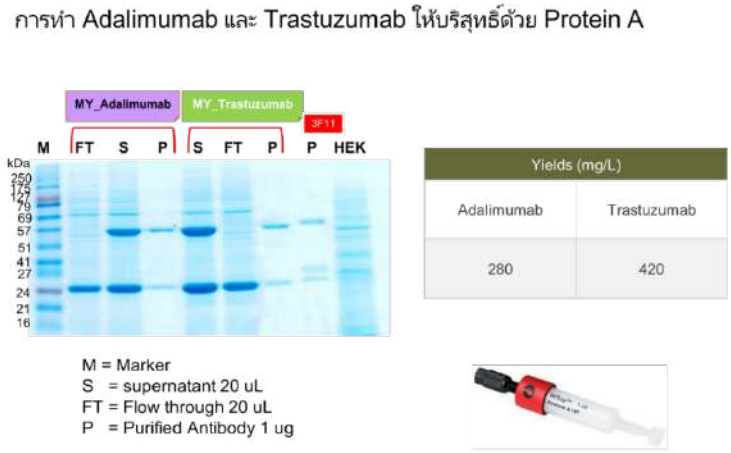
แสดงผล ELISA เพื่อเทียบความสามารถในการจับกับเป้าหมาย (TNF-α) ของ adalimumab ที่ผลิตได้จาก HEK293 cells ที่ถูก transfect ด้วย vector ของ heavy chain และ light chain ที่มีอัตราส่วนต่าง ๆ กัน

การผลิตแอนติบอดีและการทำให้บริสุทธิ์

หลังจาก transfect HEK293 cell ไป 6-7 วันแล้ว ได้ทำการ วิเคราะห์ปริมาณ adalimumab และ trastuzumab ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ Protein A ตรึงอยู่ที่ก้นหลุม ดังแสดงในรูปที่ 15 จากนั้นได้ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย Protein A column โดยใช้เครื่อง FPLC และทำการตรวจสอบการทำให้บริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE ในสภาวะ reducing ซึ่งแอนติบอดีจะมี 2 band เกิดขึ้น กล่าวคือ มี band H-chain ขนาดประมาณ 50 kDa และ band L-chain ขนาดประมาณ 25 kDa ดังแสดงในรูปที่ 16 ผลการวัดความเข้มข้นของ adalimumab และ trastuzumab สามารถนำไปใช้คำนวณ yield ในการผลิตได้ คือ 280 และ 420 mg/l ตามลำดับ จากนั้น adalimumab และ trastuzumab ที่ผลิตได้ถูกนำไปทดสอบการจับกับโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธี ELISA ดังแสดงในรูปที่ 17 ผลการทดสอบพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้จากระบบที่พัฒนาขึ้นมานี้ สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้เทียบเท่ากับยาต้นแบบ คือ Humira® และ ยา Herceptin® ตามลำดับ

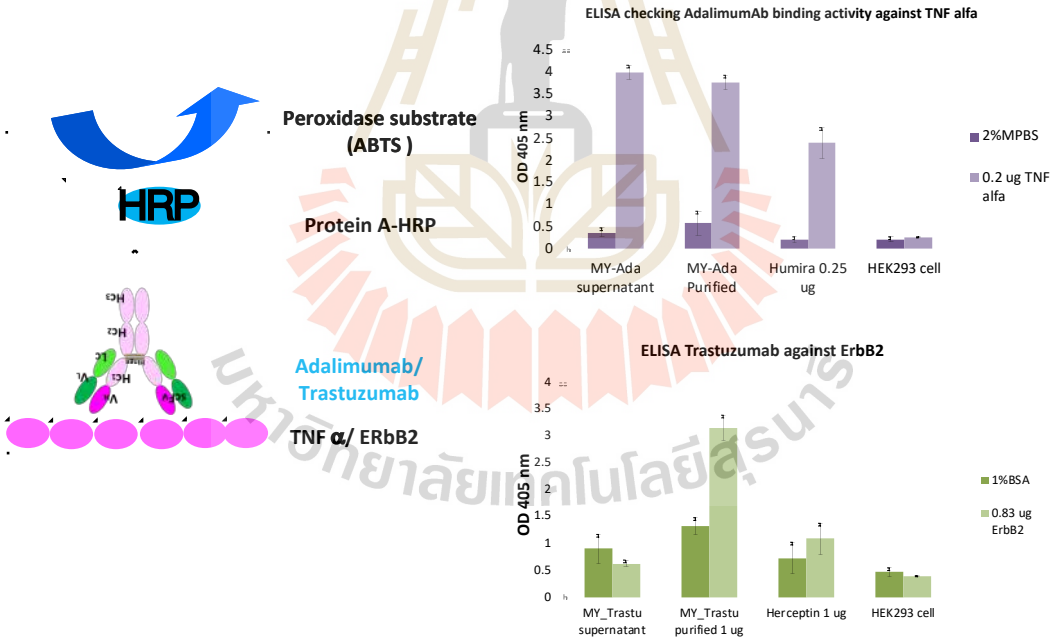


รูปที่ 15. ผล ELISA แสดงปริมาณของ adalimumab และ trastuzumab ที่ผลิตได้จาก Expi293 cells แบบ transient expression system



รูปที่ 16. ผลการทำ adalimumab และ trastuzumab ให้บริสุทธิ์ โดย SDS-PAGE

แสดง fraction ต่างๆในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ M; AccuProtein Chroma-I marker (Enzmart Biotech, Thailand), S; Supernatant, FT; Flow through, P; purified antibody ซึ่งเห็นแถบแอนติบอดี heavy และ light chain ที่ประมาณ 50 และ 25 kDa ตามลำดับ



รูปที่ 17. ผล ELISA แสดงการจับของ adalimumab และ trastuzumab ต่อ โปรตีนเป้าหมาย

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA เพื่อหาปริมาณ antibody

ในการประยุกต์ใช้วิธีการ ELISA เพื่อวัดปริมาณ antibody ให้แม่นยำนั้น มีความจำเป็นต้องทำ checkerboard titration (รูปที่ 18) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Protein A (62.5 – 500

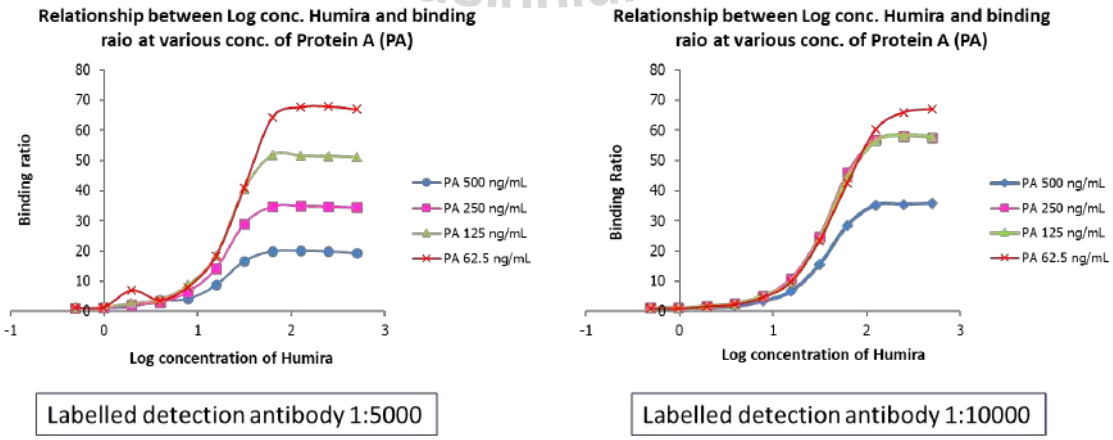
ng/ml) และ labelled detection antibody (เจือจาง 1:5000 หรือ 1:10000) นอกเหนือจากช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารมาตรฐาน ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ Humira® (0 – 500 ng/ml) จากรูปที่ 19 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ Protein A ที่ความเข้มข้น 62.5 ng/ml เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น จะให้ค่า binding ratio มากที่สุด ซึ่งค่า binding ratio สามารถคำนวณโดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากหลุมที่ไม่มี Humira® หารด้วยค่าการดูดกลืนแสงในหลุมอื่นๆที่มี Humira® ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนั้นความเข้มข้นของ Protein A ที่เหมาะสมคือ 62.5 ng/ml สำหรับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ labelled detection antibody คือการเจือจางแอนติบอดีด้วยอัตราส่วน 1:5000 (รูปที่ 20) เนื่องจากที่ความเข้มข้นของ Humira® เดียวกัน เมื่อมีการใช้แอนติบอดีที่เจือจาง 1:5000 จะมีค่า binding ratio มากกว่าเมื่อมีการใช้แอนติบอดีที่เจือจาง 1:10000

Checkerboard titration (TMB-ELISA)

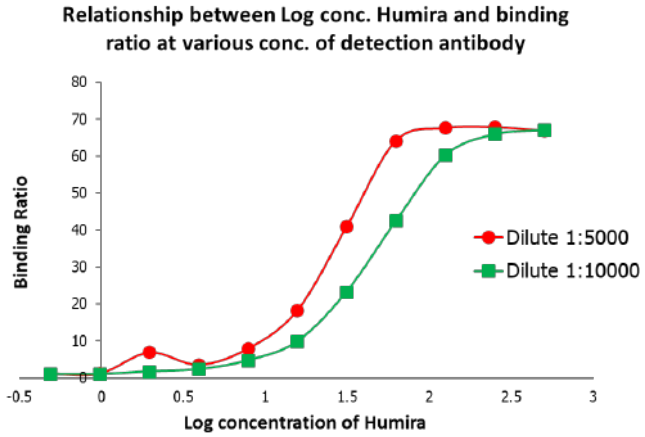
Plate layout			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2nd Ab = 1:5000	Protein A (ng/mL)	A	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	Humira conc. (ng/mL)		500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	1.953125	0.976563	0.488281	0
	Protein A (ng/mL)	B	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	Humira conc. (ng/mL)		500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	1.953125	0.976563	0.488281	0
	Protein A (ng/mL)	C	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	Humira conc. (ng/mL)		500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	1.953125	0.976563	0.488281	0
	Protein A (ng/mL)	D	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
	Humira conc. (ng/mL)		500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	1.953125	0.976563	0.488281	0
2nd Ab = 1:10000	Protein A (ng/mL)	E	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	Humira conc. (ng/mL)		500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	1.953125	0.976563	0.488281	0
	Protein A (ng/mL)	F	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	Humira conc. (ng/mL)		500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	1.953125	0.976563	0.488281	0
	Protein A (ng/mL)	G	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	Humira conc. (ng/mL)		500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	1.953125	0.976563	0.488281	0
	Protein A (ng/mL)	H	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
	Humira conc. (ng/mL)		500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625	1.953125	0.976563	0.488281	0

รูปที่ 18. ผล Checkerboard Titration

แผนภาพแสดงความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆที่ใช้ใน checkerboard titration เพื่อพัฒนาวิธี ELISA ให้มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ adalimumab ที่ผลิตได้



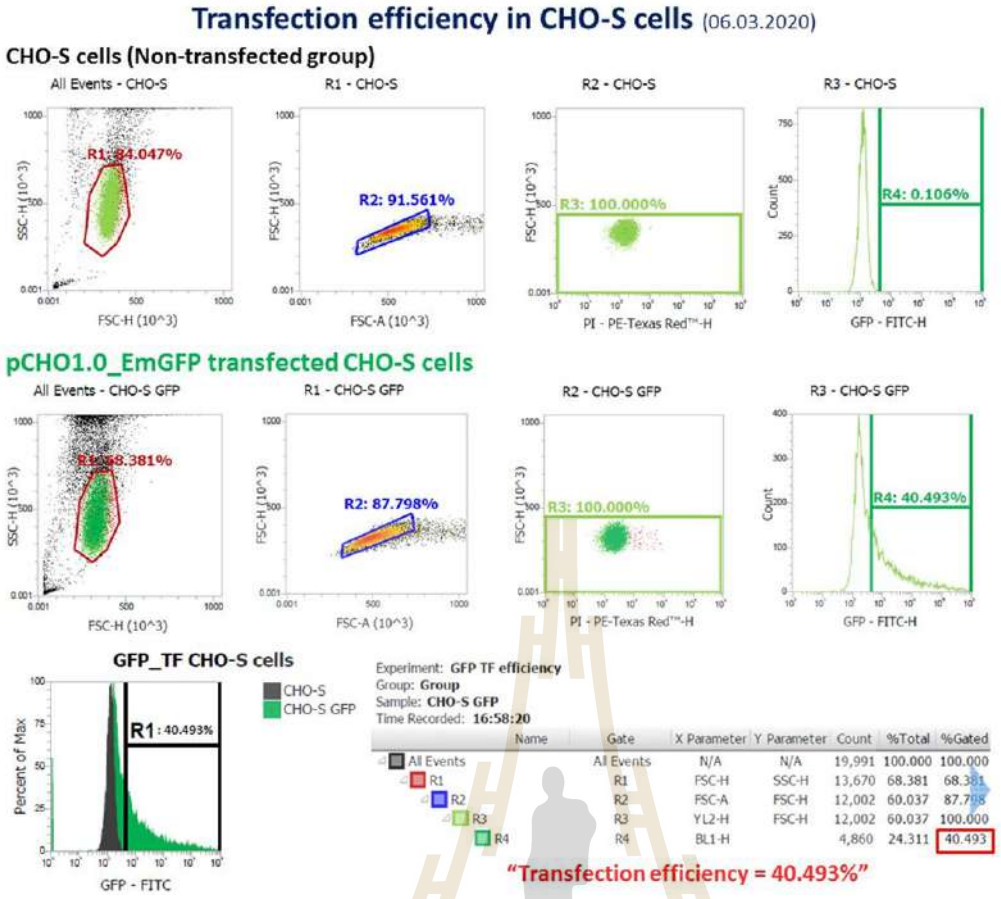
รูปที่ 19. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Protein A ที่ใช้สำหรับวิธี ELISA



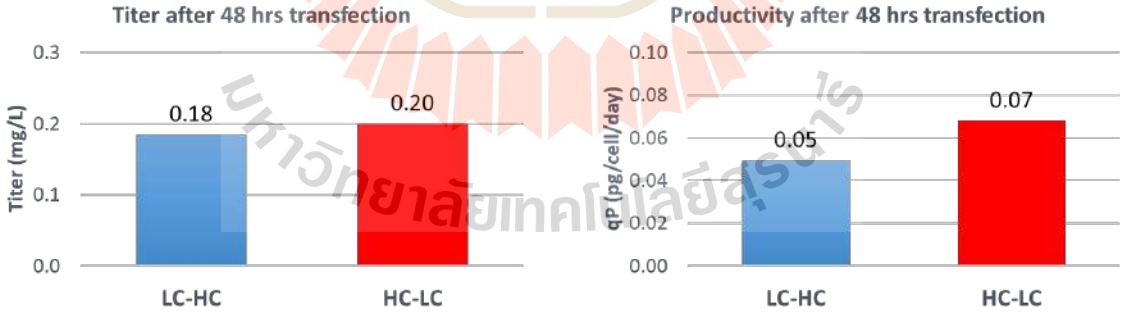
รูปที่ 20. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ detection antibody ที่ใช้สำหรับวิธี ELISA

การคัดเลือกโคลนเดี่ยวที่ผลิตแอนติบอดีในปริมาณที่สูงและมีความเสถียร

หลังการนำพลาสมิดยีนเข้าสู่เซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีการวิเคราะห์หา transfection efficiency จากการนำยีน EmGFP เข้าสู่ CHO-S cells ด้วยวิธี Flow cytometry เพื่อประเมินประสิทธิภาพการนำพลาสมิดยีนเข้าสู่เซลล์ในสภาวะที่กำหนด ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่ามีค่า transfection efficiency เท่ากับ 40.5% ตามผลการวิเคราะห์ในรูปที่ 21 เมื่อครบ 48 ชั่วโมงหลัง transfection จะเข้าสู่กระบวนการคัดเลือกรอบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ด้วยการใช้ความเข้มข้นของ puromycin และ MTX ที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีการวิเคราะห์หาปริมาณ adalimumab ที่ผลิตได้ในแต่ละ cell pool ก่อนที่จะมีการคัดเลือก cell pool ที่มีค่า titer และค่า productivity ได้สูงที่สุด โดยมีผลการวิเคราะห์ตามรูปที่ 22 และ 23 ซึ่งผลการทดสอบพบว่า cell pool ที่ดีที่สุด คือ HCLC2 50P/1000M โดยสามารถผลิต adalimumab ได้ 32.58 mg/l และมีค่า productivity 0.24 pg/cell/day จากการเลี้ยง fed-batch เป็นเวลา 12 วัน ดังนั้น cell pool นี้จะถูกนำไปคัดเลือกหาโคลนเดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution ต่อไป

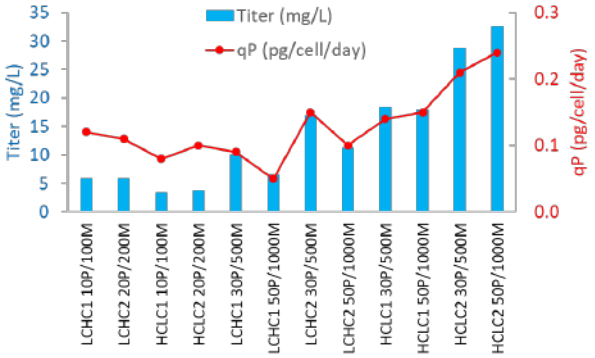


รูปที่ 21. ผลการวิเคราะห์ transfection efficiency จากค่า GFP signal ด้วยวิธี Flow cytometry



รูปที่ 22. ผลการวิเคราะห์หา titer และ productivity หลัง transfection 48 ชั่วโมง

Selection	Cell pool	Titer (mg/L)	qP (pg/cell/day)
phase 1	LCHC1 10P/100M	5.81	0.12
	LCHC2 20P/200M	5.79	0.11
	HCLC1 10P/100M	3.37	0.08
	HCLC2 20P/200M	3.76	0.10
phase 2	LCHC1 30P/500M	10.02	0.09
	LCHC1 50P/1000M	6.52	0.05
	LCHC2 30P/500M	16.93	0.15
	LCHC2 50P/1000M	11.32	0.10
	HCLC1 30P/500M	18.46	0.14
	HCLC1 50P/1000M	17.92	0.15
	HCLC2 30P/500M	28.81	0.21
	HCLC2 50P/1000M	32.58	0.24



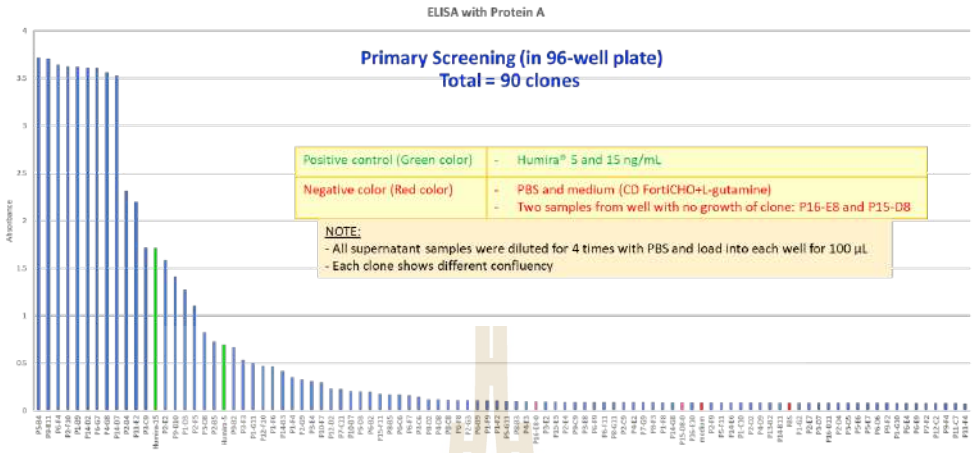
รูปที่ 23. ผลการวิเคราะห์หา titer และ productivity สำหรับ selection phase 1 และ 2

ในการคัดเลือกโคลนเดี่ยวจาก cell pool HCLC-2 50P/1000M จะอาศัยวิธี limiting dilution ใน 96-well plate ซึ่งจะมีการประเมินโคลนเดี่ยวรอบที่ 1 (primary screening) จากหลุมที่มีเซลล์ปรากฏอยู่ ผลการประเมินพบว่า เมื่อทำการทดสอบหาปริมาณ adalimumab เบื้องต้นด้วยวิธี ELISA กับ Protein A มี ทั้งหมด 90 clones ที่สามารถผลิต antibody ได้ ดังแสดงในรูปที่ 24 และเมื่อนำโคลนเหล่านี้ไปทำการขยายจำนวนเซลล์จาก 96-well plate เป็น 24-well plate และ 6-well plate ตามลำดับ เพื่อทำการคัดเลือกโคลนเดี่ยวรอบที่ 2 (Secondary screening) ผลการคัดเลือกพบว่าได้เซลล์เป็น จำนวน 69 clones ดังแสดงตามรูปที่ 25 จากนั้นเลือกเพียง 6 clones ที่ผลิตแอนติบอดีได้สูงมาทำการคัดเลือกในรอบที่ 3 (Tertiary screening) ในสภาวะที่เลี้ยงเซลล์ใน 125ml-shake flask ผลการวิเคราะห์ในรูปที่ 26 แสดงให้เห็นว่า โคลน 4-G8 เป็นโคลนเดี่ยวที่ดีที่สุดจากการคัดเลือกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution ในโครงการวิจัยนี้ คือมีค่า titer และ productivity สูงที่สุด ตามมาด้วยโคลน 2-G9

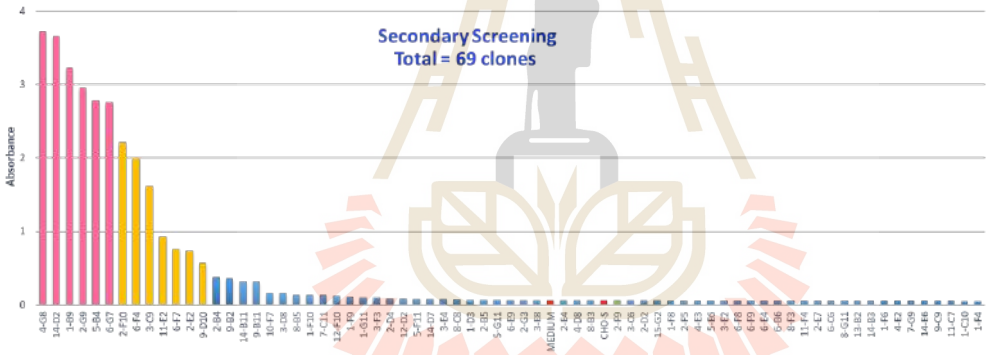
หลังจากที่คัดเลือกได้ clone ที่มีคุณสมบัติดีในการผลิต adalimumab แล้ว จึงนำทั้ง 2 โคลนนี้มาทำการทดสอบความเสถียรในการผลิต (clone stability assessment) เป็นจำนวน 15 passages หรือเทียบเท่ากับ 60 generations ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 27 แสดงให้เห็นว่าโคลน 4-G8 และ โคลน 2-G9 จัดเป็น stable single clone เนื่องจากปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้มีปริมาณค่อนข้างคงที่และไม่น้อยกว่า 70% นับจากวันเริ่มต้นการทดสอบ

ทั้งนี้เมื่อนำโคลนเดี่ยวที่คัดเลือกได้นี้ ไปเปรียบเทียบกับโคลนเดี่ยวที่ได้จากห้องปฏิบัติการของ collaborator ที่ SUNY ประเทศสหรัฐอเมริกา (รูปที่ 28) พบว่า โคลนเดี่ยวใน

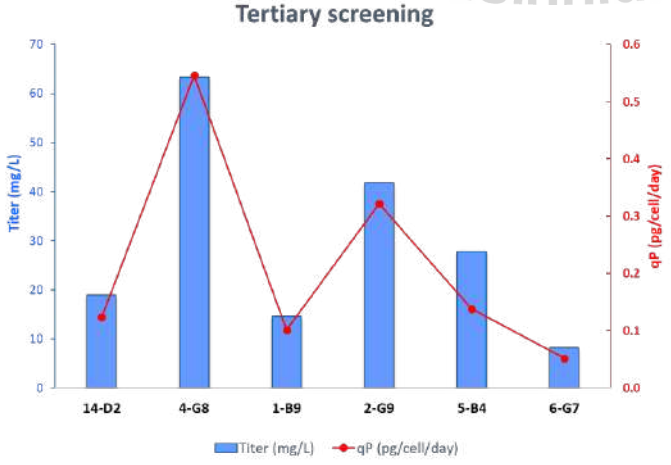
โครงการวิจัยนี้มีค่า maximum viable cell density (VCD), IVCD, titer และค่า productivity สูงกว่า แต่มีค่า doubling time น้อยกว่าโคลนเดี่ยวจากห้องปฏิบัติการที่ SUNY



รูปที่ 24. ผลการคัดเลือกโคลนเดี่ยวรอบที่ 1 (Primary screening) ใน 96-well plate

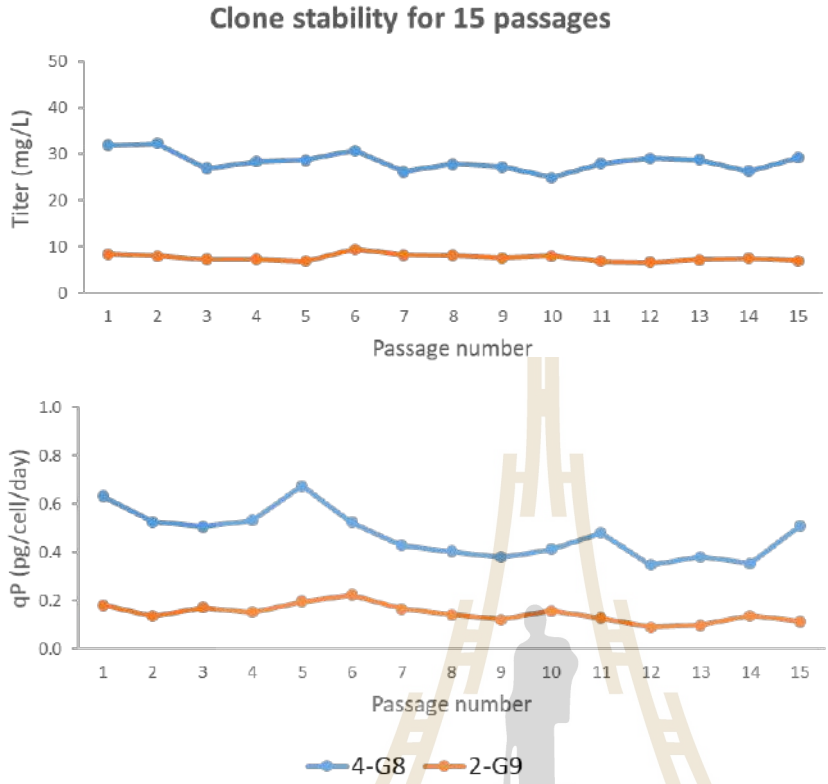


รูปที่ 25. ผลการคัดเลือกโคลนเดี่ยวรอบที่ 2 (Secondary screening) ใน 6-well plate



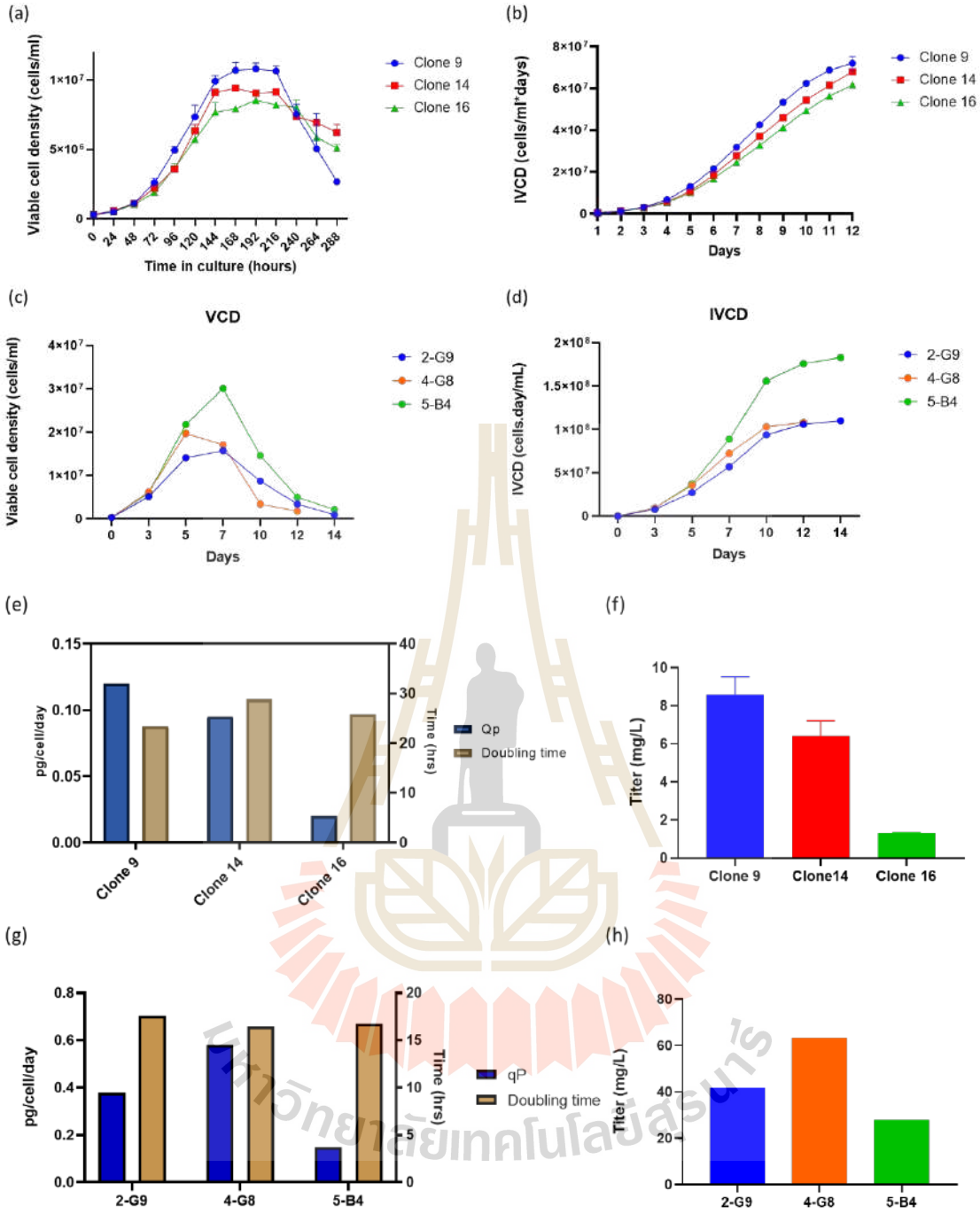
	Titer (mg/L)	qP (pg/cell/day)
14-D2	18.90	0.12
4-G8	63.25	0.55
1-B9	14.58	0.10
2-G9	41.75	0.32
5-B4	27.85	0.14
6-G7	8.16	0.05

รูปที่ 26. ผลการคัดเลือกโคลนเดี่ยวรอบที่ 3 (Tertiary screening) ใน 125ml-shake flask



รูปที่ 27. ผลการทดสอบความสม่ำเสมอในการผลิต adalimumab ของโคลน 4-G8 และ 2-G9

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

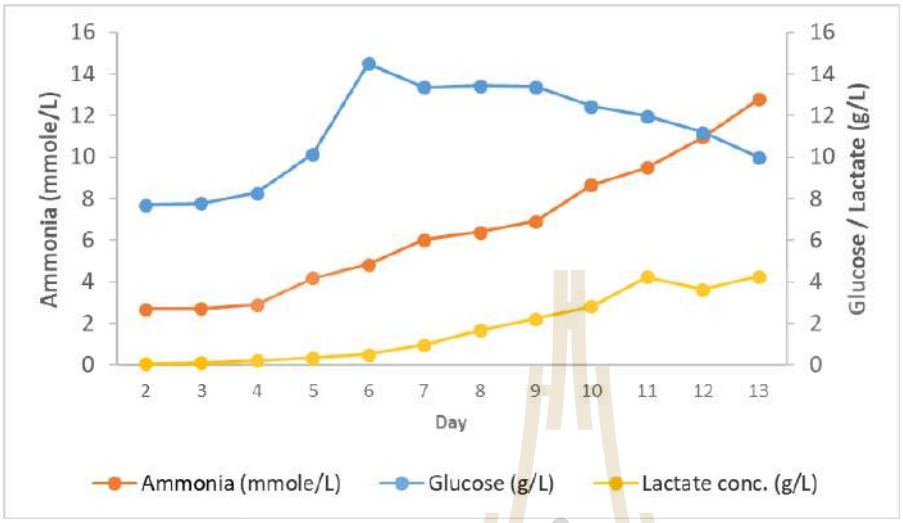


รูปที่ 28. เปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ของโคลนเดี่ยวที่คัดเลือกได้ กับโคลนจากห้องปฏิบัติการอื่น

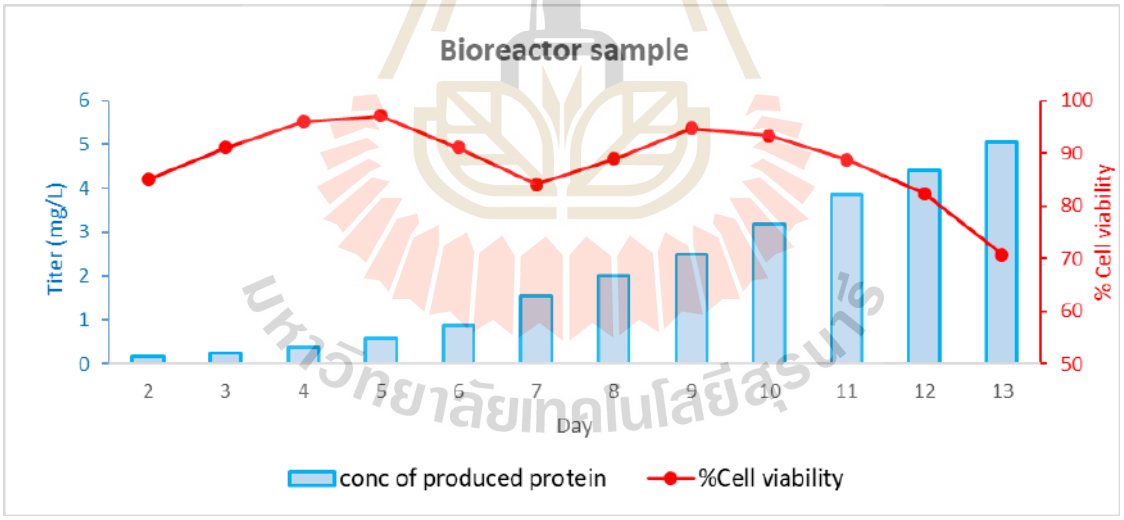
การผลิตแอนติบอดีใน Bioreactor

ในการผลิตแอนติบอดีปริมาณมากขึ้นในถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น ได้มีการวิเคราะห์หาปริมาณ

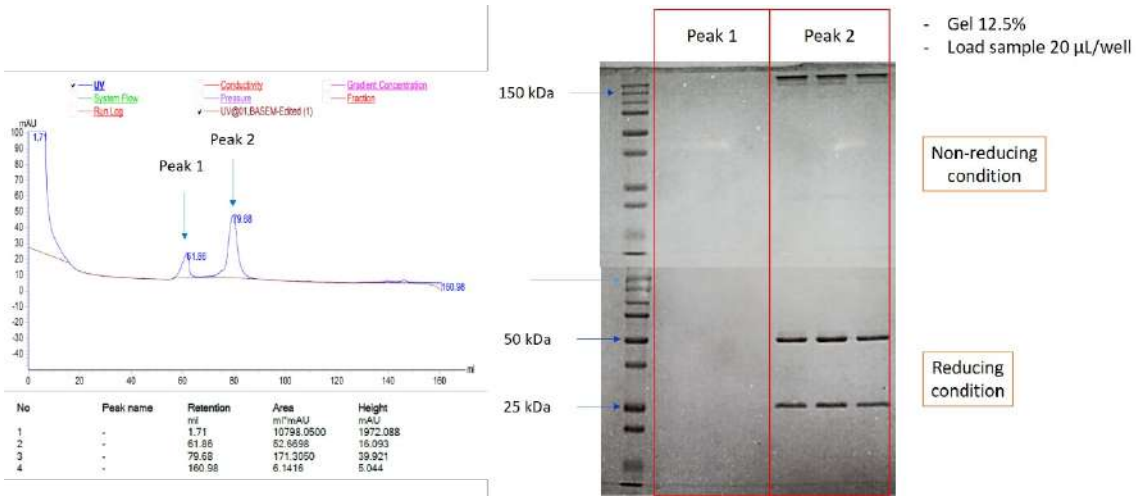
ของแอมโมเนียและแลกเตทที่เป็นเมตาบอไลท์ (metabolites) ที่เกิดขึ้นระหว่างเลี้ยงเซลล์ และปริมาณกลูโคส (รูปที่ 29) นอกเหนือจากการปริมาณ adalimumab ที่ผลิตได้ (รูปที่ 30) จากนั้นนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Protein A chromatography และตรวจสอบแอนติบอดีที่ได้ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 31)



รูปที่ 29. ปริมาณกลูโคส แอมโมเนีย และแลกเตทในแต่ละวัน



รูปที่ 30. ปริมาณ adalimumab ที่ผลิตได้ และ % cell viability ในแต่ละวัน



รูปที่ 31. การ purify antibody ที่ผลิตได้จาก bioreactor

แสดงผลการใช้ Protein A affinity chromatography ในการทำให้ adalimumab ที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัย สรุปได้ว่า โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนา expression vector ที่สามารถใช้ผลิต adalimumab ได้ทั้งแบบ transient expression system และแบบ stable expression system โดยในการผลิตแบบ stable expression system ใน CHO-S cells ได้มีการพัฒนาวิธีการคัดเลือกโคลนเดี่ยวที่สามารถผลิต adalimumab ได้ในปริมาณที่สูงและมีความเสียรในการผลิตยาแอนติบอดี รวมทั้งสามารถทำให้แอนติบอดีที่ผลิตได้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการใช้ Protein A affinity chromatography นอกจากนี้ โครงการวิจัยนี้ ยังได้ทดลองผลิต adalimumab ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อทดสอบระบบการผลิตในปริมาณสูง รวมถึงขั้นกระบวนการทำให้แอนติบอดีที่ผลิตได้จำนวน 3 ลิตร บริสุทธิ์มากขึ้น

จึงนับว่าผู้วิจัยได้พัฒนา เทคโนโลยีฐาน (platform technology) ซึ่งหมายรวมถึง ครุภัณฑ์ วิธีการ (protocol) และบุคลากร สำหรับการผลิตยาแอนติบอดี (therapeutic antibody) ได้สำเร็จในเบื้องต้นแล้ว สามารถขยายขอบเขตไปผลิตยาอื่น หรือพัฒนาต่อยอด ไปจนถึงการสร้าง master cell bank เพื่อการผลิตยาในระบบ GLP และ GMP เพื่อทำการทดลองในสัตว์ และในระดับคลีนิคได้ต่อไป ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้ถ่ายทอด เทคโนโลยี และองค์ความรู้ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ผ่านการจัด Biologics Workshop ไปแล้ว ๓ ครั้ง

อภิปรายผล

การผลิต adalimumab ที่เป็นยาชีววัตถุนั้นมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ซับซ้อน เริ่มตั้งแต่การหาเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ใช้ Expi293 ในการผลิตแบบ transient expression เนื่องจากสามารถผลิตแอนติบอดีในปริมาณที่สูงมากพอที่จะใช้ประเมินการแสดงออกของ expression vector ที่ได้ออกแบบขึ้นมาได้อย่างรวดเร็ว และสามารถใช้วิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมาได้ด้วย เพื่อตัดสินใจคัดเลือก expression vector ที่ดีที่สุด จากการออกแบบมาในรูปแบบต่าง ๆ โดยเฉพาะชนิดของ signal peptide หรือ algorithm ที่ใช้ออกแบบลำดับ DNA อนึ่งแม้การผลิตแอนติบอดีแบบ transient expression จะสามารถผลิตแอนติบอดีได้มากในระดับหนึ่ง และเพียงพอต่อการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น แต่ระบบนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอนติบอดีเพื่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การผลิตในระยะยาวเป็นจำนวนมาก ซึ่ง รวมถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากในการผลิตแต่ละครั้งจะได้ปริมาณของแอนติบอดีไม่เท่ากัน รวมถึงคุณสมบัติของแอนติบดีที่ผลิตได้ อาจแตกต่างกันในแต่ละครั้งของการผลิต ดังนั้นในการผลิตระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องใช้การผลิตแบบ stable expression โดยในโครงการวิจัยนี้ได้เลือกใช้ CHO cell ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้ผลิต therapeutic antibody รวมทั้ง Humira® ซึ่งเป็น ต้นแบบของ adalimumab ที่ใช้ในโครงการนี้

ในการผลิตแบบ stable expression นั้นจำเป็นต้องมีการคัดเลือกโคลนเดี่ยวที่สามารถผลิตแอนติบอดีในปริมาณสูงและมีความสม่ำเสมอ ในโครงการวิจัยนี้ใช้ CHO-S cells ที่อาศัยการคัดเลือก cell pools เบื้องต้นด้วย puromycin และ MTX จากผลการทดลองพบว่า cell pool HCLC2 50P/1000M ที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้มากที่สุด มาจากการใช้ expression vector แบบ HCLC และผ่านการคัดเลือก cell pool ในรอบแรกด้วย puromycin 20 µg/ml และ MTX 200 nM ตามด้วยการคัดเลือก cell pool รอบสองด้วย puromycin 50 µg/ml และ MTX 1000 nM หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนเดี่ยวจาก cell pool นี้ แบบ limiting dilution ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือได้จำนวนโคลนเดี่ยวน้อย ทำให้อาจไม่สามารถได้โคลนเดี่ยวที่ผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณมาก แม้กระนั้นในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยก็ประสบความสำเร็จในการคัดเลือก จนได้โคลนเดี่ยวจากวิธี limiting dilution จำนวน 90 clones และเมื่อทำการคัดเลือกโคลนเดี่ยวอีก 2 รอบ ในการเลี้ยงแบบ 6-well plate และ 125ml-shake flask ตามลำดับ ทำให้ได้โคลนเดี่ยว 2 โคลนคือ 4-G8 และ 2-G9 ที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ประมาณ 30 mg/l และ 10 mg/l ตามลำดับ (จากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน) และมีความสม่ำเสมอในการผลิตเป็นระยะเวลา 15 passages ซึ่งการผลิตโคลนเดี่ยวที่สามารถผลิตยาได้นี้ หากไปจ้างบริษัท จะมีค่าดำเนินการประมาณ 10 ล้านบาทขึ้นไปต่อ โคลน ทั้งนี้ 2 โคลนเดี่ยวนี้สร้างขึ้นมาได้จากโครงการวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้เป็นฐานในการพัฒนาต่อไปได้ หลายแนวทาง อาทิ การปรับปรุงพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ การเติม supplements วิธีการเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมใน เพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้ ก่อนนำไปใช้ในการผลิตในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้น หรือในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งอาจเพิ่มการผลิตให้ได้แอนติบอดีในปริมาณมากขึ้นจนถึงช่วง g/L นอกจากนั้นแล้ว หากเปลี่ยนวิธีการคัดเลือก cell เดี่ยวจากแบบวิธี limited dilution เป็นวิธีอื่น เช่น semi-solid selection หรือ FACS อาจทำให้ได้ clone ที่มีคุณสมบัติที่ดีกว่าที่มีอยู่แล้วก็เป็นได้

ทั้งนี้เมื่อนำโคลนเดี่ยวที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ ไปเปรียบเทียบคุณสมบัติด้านต่างๆกับโคลนเดี่ยวจากห้องปฏิบัติการของ collaborator ที่ SUNY ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีความแตกต่างกันในด้านของ VCD, IVCD, doubling time, productivity and titer โดยที่สำคัญคือมี productivity

และ titer มากกว่า สาเหตุหนึ่งเนื่องจากมีความแตกต่างของปริมาณกลูโคสที่เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งทางห้องปฏิบัติการ SUNY ใช้วิธีเติมกลูโคส เมื่อมีระดับน้อยกว่า 4 g/l แต่ในโครงการวิจัยนี้ใช้วิธีเติมกลูโคสในวันที่ 3, 5 และ 7 อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบจำนวนวันสูงสุดที่สามารถเลี้ยงเซลล์ได้ พบว่าไม่มีความแตกต่างมากนัก ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเซลล์น่าจะมีระดับกลูโคสเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ของทั้งสองวิธีการเติมกลูโคส ปัจจัยอื่นที่น่าจะส่งผลต่อความแตกต่างนี้ น่าจะมาจากในโครงการวิจัยนี้ใช้ CHO-S cells ในการผลิต ในขณะที่ทางห้องปฏิบัติการ SUNY ใช้ CHO-K1 รวมถึงมีความแตกต่างของ expression vector ที่ใช้ ดังนั้น การคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านและการพัฒนา expression vector จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับอุตสาหกรรม

ในโครงการวิจัยนี้ ยังได้ลองทำการผลิต adalimumab ในถึงหมัก (bioreactor) โดยใช้ CHO cells ที่คัดหามาได้จากการฝึกฝนของผู้วิจัยในครั้งแรก ซึ่งยังไม่ใช่ cell ที่ดีที่สุด โดยได้ทำการเลี้ยงในปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า สามารถนำเซลล์ที่สามารถผลิต adalimumab จากการคัดหาเบื้องต้น ไปผลิตในถังหมักขนาดใหญ่ขึ้นได้สำเร็จ โดยต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ pH และค่า pO2 นอกจากนี้ยังต้องมีการเติม supplement ต่าง ๆ เพื่อให้มีสารอาหารและ/หรือกลูโคสอย่างเพียงพอสำหรับเซลล์ในการผลิตแอนติบอดี โดยในโครงการวิจัยนี้ยังได้มีการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียและแลกเตท ที่เป็นเมตาบอไลท์ที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิต เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาการผลิตในอนาคต โดยเฉพาะ cells ใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้นและมีประสิทธิภาพดีกว่า ทั้งนี้การผลิตเซลล์ใน bioreactor นั้น มีความยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายที่สูงมาก จึงต้องพิจารณาทำ เมื่อจะเกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่าจริง ๆ

ในส่วนการทำแอนติบอดีที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์มากขึ้นนั้น ในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการใช้ Protein A chromatography ในการทำให้ adalimumab และ trastuzumab ที่ผลิตได้ มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่เครื่องที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการยังเป็น scale ขนาดเล็ก จึงยังไม่สามารถใช้ทำบริสุทธิ์ตัวอย่างทั้งหมด ๓ ลิตรได้ ทั้งนี้การทำแอนติในปริมาณมากให้บริสุทธิ์นี้ อยู่ในแผนการดำเนินการในปีถัดไป ของการวิจัย ซึ่งอาจทำได้ที่ห้องปฏิบัติการที่ มทส หรือของพันธมิตร อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองจาก column ที่มีอยู่ สามารถใช้เป็นข้อมูลตั้งต้นในการ up-scale ได้ต่อไป เพราะ column มีความยาวเท่ากับในเครื่องใหญ่ โดยขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์นี้เป็นขั้นเบื้องต้น เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม อาทิ การเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมก่อนนำไปผ่าน column โปรแกรมการ load และการ elute สารเป็นต้น ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป อีกทั้ง แอนติบอดีที่ผลิตได้ อาจใช้เป็น control ในงานวิจัย cancer research ต่าง ๆ ได้ ส่วน cell line ที่สร้างขึ้นมาได้นั้น อาจนำไปใช้เพื่อผลิตยา biosimilars ได้ต่อไป หากมี venture capital

และแผนการตลาดที่เหมาะสม รองรับ

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยด้านยาชีววัตถุ โดยเฉพาะยาที่เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น มีความยุ่งยากซับซ้อน และต้องใช้เงินวิจัยสูงมาก ดังนั้น ควรมีการสร้างเครือข่ายผู้เชี่ยวชาญจากทุกภาคส่วน เช่น ห้องปฏิบัติการต่างๆในแต่ละมหาวิทยาลัย องค์การเภสัชกรรม โรงงานผลิตทั้งในภาครัฐ และภาคเอกชน องค์การอาหารและยา รวมทั้งความร่วมมือกับหน่วยงานชั้นนำในต่างประเทศ เพื่อลดภาระในด้านงบประมาณของประเทศ และความซ้ำซ้อนในการพัฒนาเทคโนโลยี เพื่อให้ นำไปสู่การผลิตยาในระดับอุตสาหกรรม ในประเทศ จนนำไปใช้ในการรักษาโรค ได้อย่างแท้จริง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Adams D, Korke R, Hu W-S. Application of Stoichiometric and Kinetic Analyses to Characterize Cell Growth and Product Formation. In: Pörtner R, editor. Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. p. 269-84.

Albitar, M (Ed.). (2007). Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (1 ed.): Humana Press.

Almagro, JC, & Fransson, J. (2008). Humanization of antibodies. Front Biosci, 13, 1619-33.

Benhar, I. (2007). Design of synthetic antibody libraries. Expert Opin Biol Ther, 7(5), 763-79. doi: 10.1517/14712598.7.5.763 [doi]

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

Booy, EP, Johar, D, Maddika, S, Pirzada, H, Sahib, MM, Gehrke, I, Loewen, S, Louis, SF, Kadkhoda, K, Mowat, M, & Los, M. (2006). Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 54(2), 85-101. doi: 10.1007/s00005-006-0011-5 [doi]

Borrebaeck, CAK. (2000). Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. Immunology Today, 21(8), 379-82.

Bugli, F, Graffeo, R, Sterbini, FP, Torelli, R, Masucci, L, Sali, M, Grasso, A, Rufini, S, Ricci, E, Fadda, G, & Pescatori, M. (2008). Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice. Toxicon, 51(4), 547-54. doi: S0041-0101(07)00412-6 [pii] 10.1016/j.toxicon.2007.11.014 [doi]

Burton, DR, Barbas, CF, 3rd, Persson, MA, Koenig, S, Chanock, RM, & Lerner, RA. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(22), 10134-7.

Burtrum, D, Zhu, Z, Lu, D, Anderson, DM, Prewett, M, Pereira, DS, Bassi, R, Abdullah, R, Hooper, AT, Koo, H, Jimenez, X, Johnson, D, Apblett, R, Kussie, P, Bohlen, P, Witte, L, Hicklin, DJ, & Ludwig, DL. (2003). A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. Cancer Res, 63(24), 8912-21.

Buscombe, JR. (2006). The future of infection imaging. Q J Nucl Med Mol Imaging, 50(2), 99-103.

Cacciatore JJ, Chasin LA, Leonard EF. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. Biotechnology Advances 2010; 28: 673-81.

Cai, X, & Garen, A. (1995). Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain

Fv fusion phage libraries. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(14), 6537-41.

Carter, P, & Merchant, AM. (1997). Engineering antibodies for imaging and therapy. Curr Opin Biotechnol, 8(4), 449-54. doi: S0958-1669(97)80067-5 [pii]

Chalberg TW, Phillips JE, Calos MP. Transfection of DNA into Mammalian Cells in Culture. In: eLS

Chang, CN, Landolfi, NF, & Queen, C. (1991). Expression of antibody Fab domains on bacteriophage surfaces. Potential use for antibody selection. J Immunol, 147(10), 3610-4.

Chusainow, J, Yang, YS, Yeo, JH, Toh, PC, Asvadi, P, Wong, NS, & Yap, MG. (2009). A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? Biotechnol Bioeng, 102(4), 1182-96.

Clackson, T, Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Winter, G. . (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. Nature, 352(6336), 624-8.

Clark, M. (2000). Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? Immunol Today, 21(8), 397-402. doi: S0167569900016807 [pii]

Dauvillier, S, Merida, P, Visintin, M, Cattaneo, A, Bonnerot, C, & Dariavach, P. (2002). Intracellular single-chain variable fragments directed to the Src homology 2 domains of Syk partially inhibit Fc epsilon RI signaling in the RBL-2H3 cell line. J Immunol, 169(5), 2274-83.

Dillman, RO. (2011). Cancer immunotherapy. Cancer Biother Radiopharm, 26(1), 1-64. doi: 10.1089/cbr.2010.0902

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

Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. mAbs 2015; 7: 9-14.

Eisenberg, D, Marcotte, EM, Xenarios, I, & Yeates, TO. (2000). Protein function in the post-genomic era. Nature, 405(6788), 823-6.

European Medicine Agency (EMA). Humira. 2009; Available from: https://www.ema.europa. -eu/en/medicines/human/EPAR/humira

Fan, L, Kadura, I, Krebs, LE, Hatfield, CC, Shaw, MM, & Frye, CC. (2012). Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. Biotechnol Bioeng, 109(4), 1007-15.

Filpula, D. (2007). Antibody engineering and modification technologies. Biomol Eng, 24(2), 201-15. doi: S1389-0344(07)00032-9 [pii] 10.1016/j.bioeng.2007.03.004 [doi]

Frenzel, A, Hust, M, & Schirrmann, T. (2013). Expression of Recombinant Antibodies. Front Immunol, 4, 217. doi: 10.3389/fimmu.2013.00217

Gaj, T, Gersbach, CA, & Barbas, CF. (2013). ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome

engineering. Trends in biotechnology, 31(7), 397-405.

Gejima, R, Tanaka, K, Nakashima, T, Hashiguchi, S, Ito, Y, Yoshizaki, K, & Sugimura, K. (2002). Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling. Hum Antibodies, 11(4), 121-9.

Graus, YF, de Baets, MH, Parren, PW, Berrih-Aknin, S, Wokke, J, van Breda Vriesman, PJ, & Burton, DR. (1997). Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived phage display libraries from myasthenia gravis patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies. J Immunol, 158(4), 1919-29.

Hacker, DL, Nallet, S, & Wurm, FM. (2008). Recombinant protein production yields from mammalian cells: past, present, and future. Biopharm international(JUN).

Hale, G. (2006). Therapeutic antibodies--delivering the promise? Adv Drug Deliv Rev, 58(5-6), 633-9. doi: S0169-409X(06)00086-X [pii] 10.1016/j.addr.2006.03.010 [doi]

Harlow, E, & Lane, D. (1998). Using Antibodies : A Laboratory Manual : Portable Protocol (1 ed.): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Holliger, P, & Hudson, PJ. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology, 23(9), 1126-36.

Hoogenboom, HR. (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. Trends Biotechnol, 15(2), 62-70. doi: S0167-7799(97)84205-9 [pii]

10.1016/S0167-7799(97)84205-9 [doi]

Hoogenboom, HR, Griffiths, AD, Johnson, KS, Chiswell, DJ, Hudson, P, & Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Res, 19(15), 4133-7.

Howard, GC, & Kaser, MR (Eds.). (2006). Making and Using Antibodies: A Practical handbook (1 ed.): CRC.

Huang, YM, Hu, W, Rustandi, E, Chang, K, Yusuf-Makagiansar, H, & Ryll, T. (2010). Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. Biotechnol Prog, 26(5), 1400-10.

Jager, V, Bussow, K, Wagner, A, Weber, S, Hust, M, Frenzel, A, & Schirrmann, T. (2013). High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. BMC Biotechnol, 13(1), 52. doi: 10.1186/1472-6750-13-52

Jalah, R, Rosati, M, Kulkarni, V, Patel, V, Bergamaschi, C, Valentin, A, Zhang, GM, Sidhu, MK, Eldridge, JH, Weiner, DB, Pavlakis, GN, & Felber, BK. (2007). Efficient systemic expression of bioactive IL-

15 in mice upon delivery of optimized DNA expression plasmids. DNA Cell Biol, 26(12), 827-40. doi: 10.1089/dna.2007.0645

Janeway, AC, Travers, P., Walport, M., Shlomshik, J. M. . (2008). Immunobiology New York: Garland Publisher.

Jenkins, N, Meleady, P, Tyther, R, & Murphy, L. (2009). Strategies for analysing and improving the expression and quality of recombinant proteins made in mammalian cells. Biotechnol Appl Biochem, 53(Pt 2), 73-83. doi: 10.1042/ba20080258

Jolliffe, LK. (1993). Humanized antibodies: enhancing therapeutic utility through antibody engineering. Int Rev Immunol, 10(2-3), 241-50.

Kantardjieff A, Zhou W. Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing. In: Zhou W, Kantardjieff A, editors. Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 1-9.

Khandare, JJ, & Minko, T. (2006). Antibodies and peptides in cancer therapy. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 23(5), 401-35. doi: 1703c8c9211e44b3,0e3b3b4439cb816d [pii]

Kovaleva, M, Bussmeyer, I, Rabe, B, Grotzinger, J, Sudarman, E, Eichler, J, Conrad, U, Rose-John, S, & Scheller, J. (2006). Abrogation of viral interleukin-6 (vIL-6)-induced signaling by intracellular retention and neutralization of vIL-6 with an anti-vIL-6 single-chain antibody selected by phage display. J Virol, 80(17), 8510-20. doi: 80/17/8510 [pii] 10.1128/JVI.00420-06 [doi]

Kramer, RA, Marissen, WE, Goudsmit, J, Visser, TJ, Clijsters-Van der Horst, M, Bakker, AQ, de Jong, M, Jongeneelen, M, Thijsse, S, Backus, HH, Rice, AB, Weldon, WC, Rupprecht, CE, Dietzschold, B, Bakker, AB, & de Kruif, J. (2005). The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries. Eur J Immunol, 35(7), 2131-45. doi: 10.1002/eji.200526134

Kristensen, P, & Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. Fold Des, 3(5), 321-8.

Lai T, Yang Y, Ng SK. Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. Pharmaceuticals (Basel) 2013; 6: 579-603.

Laurino, JP, Shi, Q, & Ge, J. (1999). Monoclonal antibodies, antigens and molecular diagnostics: a practical overview. Ann Clin Lab Sci, 29(3), 158-66.

Lee, MS, Lee, JC, Choi, CY, & Chung, J. (2008). Production and characterization of monoclonal antibody to botulinum neurotoxin type B light chain by phage display. Hybridoma (Larchmt), 27(1), 18-24. doi: 10.1089/hyb.2007.0532 [doi]

Li, Y, Li, H, Wang, MN, Lu, D, Bassi, R, Wu, Y, Zhang, H, Balderes, P, Ludwig, DL, Pytowski, B, Kussie, P,

Piloto, O, Small, D, Bohlen, P, Witte, L, Zhu, Z, & Hicklin, DJ. (2004). Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody. Blood, 104(4), 1137-44. doi: 10.1182/blood-2003-07-2585 [doi] 2003-07-2585 [pii]

Liu, B, Huang, L, Sihlbom, C, Burlingame, A, & Marks, JD. (2002). Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display. Journal of Molecular Biology, 315(5), 1063-73.

Liu, B, & Marks, JD. (2000). Applying Phage Antibodies to Proteomics: Selecting Single Chain Fv Antibodies to Antigens Blotted on Nitrocellulose. Analytical Biochemistry, 286(1), 119-28.

Luo, Y, Kofod-Olsen, E, Christensen, R, Sorensen, CB, & Bolund, L. (2012). Targeted genome editing by recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors for generating genetically modified pigs. J Genet Genomics, 39(6), 269-74.

Maggon, K. (2007). Monoclonal antibody "gold rush". Curr Med Chem, 14(18), 1978-87.

Marks, JD, Hoogenboom, HR, Bonnert, TP, McCafferty, J, Griffiths, AD, & Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol, 222(3), 581-97.

McCafferty, J, Griffiths, AD, Winter, G, & Chiswell, DJ. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature, 348(6301), 552-4. doi: 10.1038/348552a0 [doi]

McCarron, PA, Olwill, SA, Marouf, WM, Buick, RJ, Walker, B, & Scott, CJ. (2005). Antibody conjugates and therapeutic strategies. Mol Interv, 5(6), 368-80. doi: 5/6/368 [pii] 10.1124/mi.5.6.9 [doi]

Mitra, A, Nan, A, Line, BR, & Ghandehari, H. (2006). Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. Curr Pharm Des, 12(36), 4729-49.

Nair, AR, Jinger, X, & Hermiston, TW. (2011). Effect of different UCOE-promoter combinations in creation of engineered cell lines for the production of Factor VIII. BMC Research Notes, 4(1), 178. doi: 10.1186/1756-0500-4-178

Nissim, A, Hoogenboom, HR, Tomlinson, IM, Flynn, G, Midgley, C, Lane, D, & Winter, G. (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. EMBO J, 13(3), 692-8.

O'Brien, PM, & Aitken, R (Eds.). (2002). Antibody Phage Display (Vol. 178). Totowa, New Jersey: Humana Press.

Pattanayak, V, Ramirez, CL, Joung, JK, & Liu, DR. (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. Nat Meth, 8(9), 765-70.

Paz, K, Brennan, LA, Iacolina, M, Doody, J, Hadari, YR, & Zhu, Z. (2005). Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation. Mol Cancer Ther, 4(11), 1801-9. doi: 4/11/1801 [pii] 10.1158/1535-7163.MCT-05-

0174 [doi]

Pedersen, JS, Otzen, DE, & Kristensen, P. (2002). Directed evolution of barnase stability using proteolytic selection. J Mol Biol, 323(1), 115-23. doi: S0022283602008914 [pii]

Piloto, O, Levis, M, Huso, D, Li, Y, Li, H, Wang, MN, Bassi, R, Balderes, P, Ludwig, DL, Witte, L, Zhu, Z, Hicklin, DJ, & Small, D. (2005). Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. Cancer Res, 65(4), 1514-22. doi: 65/4/1514 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-04-3081 [doi]

Proba, K, Worn, A, Honegger, A, & Pluckthun, A. (1998). Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. J Mol Biol, 275(2), 245-53. doi: S0022-2836(97)91457-1 [pii] 10.1006/jmbi.1997.1457 [doi]

Reichert, JM, & Valge-Archer, VE. (2007). Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov, 6(5), 349-56. doi: nrd2241 [pii] 10.1038/nrd2241 [doi]

Reilly, RM. (2006). Radioimmunotherapy of solid tumors: the promise of pretargeting strategies using bispecific antibodies and radiolabeled haptens. J Nucl Med, 47(2), 196-9. doi: 47/2/196 [pii]

Rowley, MJ, O'Connor, K, & Wijeyewickrema, L. (2004). Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. Biotechnol Annu Rev, 10, 151-88. doi: S1387265604100069 [pii] 10.1016/S1387-2656(04)10006-9 [doi]

Rudert, F, Ge, L, & Ilag, LL. (2000). Functional genomics with protein-protein interactions Biotechnology Annual Review (Volume 5 ed., pp. 45-86): Elsevier.

Santos, AD, & Padlan, EA. (1998). Development of more efficacious antibodies for medical therapy and diagnosis. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 60, 169-94.

Sapan, CV, Reisner, HM, & Lundblad, RL. (2007). Antibody therapy (IVIG): evaluation of the use of genomics and proteomics for the study of immunomodulation therapeutics. Vox Sang, 92(3), 197-205. doi: VOX877 [pii] 10.1111/j.1423-0410.2006.00877.x [doi]

Sassoon, I, & Blanc, V. (2013). Antibody-Drug Conjugate (ADC) Clinical Pipeline: A Review. Methods Mol Biol, 1045, 1-27. doi: 10.1007/978-1-62703-541-5_1

Schrama, D, Reisfeld, R, & Becker, J. (2006). Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov, 5, 147-59.

Schultz, BR, & Chamberlain, JS. (2008). Recombinant Adeno-associated Virus Transduction and Integration. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 16(7), 1189-99.

Shaw, I, O'Reilly, A, Charleton, M, & Kane, M. (2008). Development of a High-Affinity Anti-Domoic Acid

Sheep scFv and its Use in Detection of the Toxin in Shellfish. Anal Chem. doi: 10.1021/ac7024199 [doi]

Sheets, MD, Amersdorfer, P, Finnern, R, Sargent, P, Lindquist, E, Schier, R, Hemingsen, G, Wong, C, Gerhart, JC, & Marks, JD. (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(11), 6157-62.

Sidhu, SS. (2001). Phage display: increasing the rewards from genomic information. Drug Discovery Today, 6(18), 936.

Siegel, RW, Allen, B, Pavlik, P, Marks, JD, & Bradbury, A. (2000). Mass spectral analysis of a protein complex using single-chain antibodies selected on a peptide target: applications to functional genomics. Journal of Molecular Biology, 302(2), 285-93.

Stipsanelli, E, & Valsamaki, P. (2005). Monoclonal antibodies: old and new trends in breast cancer imaging and therapeutic approach. Hell J Nucl Med, 8(2), 103-8.

Stowell, CP. (2006). Therapy with immunoglobulin: applications for monoclonal antibodies. J Infus Nurs, 29(3 Suppl), S29-44.

Teillaud, JL. (2005). Engineering of monoclonal antibodies and antibody-based fusion proteins: successes and challenges. Expert Opin Biol Ther, 5 Suppl 1, S15-27. doi: 10.1517/14712598.5.1.S15 [doi]

Tokuhara, D, Rholvarez, B, Mejima, M, Hiroiwa, T, Takahashi, Y, Kurokawa, S, Kuroda, M, Oyama, M, Kozuka-Hata, H, Nochi, T, Sagara, H, Aladin, F, Marcotte, H, Frenken, LG, Iturriza-Gomara, M, Kiyono, H, Hammarstrom, L, & Yuki, Y. (2013). Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. J Clin Invest. doi: 10.1172/jci70266

van Beers, MM, & Bardor, M. (2012). Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. Biotechnol J, 7(12), 1473-84.

Van de Wiele, C, Revets, H, & Mertens, N. (2004). Radioimmunoimaging. Advances and prospects. Q J Nucl Med Mol Imaging, 48(4), 317-25.

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

Waldmann, TA. (1991). Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. Science, 252(5013), 1657-62.

Willemsen, RA, Ronteltap, C, Chames, P, Debets, R, & Bolhuis, RL. (2005). T cell retargeting with MHC class I-restricted antibodies: the CD28 costimulatory domain enhances antigen-specific cytotoxicity and cytokine production. J Immunol, 174(12), 7853-8. doi: 174/12/7853 [pii]

Winter, G, Griffiths, AD, Hawkins, RE, & Hoogenboom, HR. (1994). Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol, 12, 433-55. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002245 [doi]

Wurm, FM. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol, 22(11), 1393-8. doi: 10.1038/nbt1026

Xie, MH, Yuan, J, Adams, C, & Gurney, A. (1997). Direct demonstration of MuSK involvement in acetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv. Nat Biotechnol, 15(8), 768-71. doi: 10.1038/nbt0897-768 [doi]

Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. Biotechnol Adv, 30(5), 1158-70.

ยมาภัย, ม. (๒๕๕๑). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยีเฟจ. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดเทคโนโลยี และการสร้างเครือข่ายนักวิจัย

การจัด Biologics Workshop เมื่อวันที่ ๙ พฤษภาคม ๒๕๖๑ และโปรแกรม

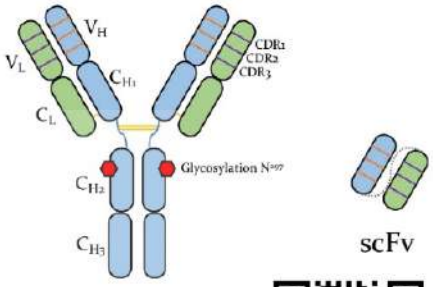
การจัด Biologics Workshop ระหว่างวันที่ ๑๗ - ๑๙ ธันวาคม ๒๕๖๑

บรรยากาศการเยี่ยมชมโรงงานที่มีศักยภาพในการผลิต biologics ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Free Course at SUT

Recombinant Antibody Production Technology



Aims

1. To teach participants about the discovery and production of recombinant antibody for therapeutic and diagnostic purposes
2. To enable participants to continue their own research work on antibody engineering and production
3. To establish a network of scientists on biologic research

When: 17-21 December 2018

Where: Grand Sukhumvit Hotel and Suranaree U of Technology

Fee: Ten full scholarship including registration fee, travel, room and food will be provided for 10 selected participants. Announcement of successful participants will be on Wed, 5 December 2018.

Support: This course is funded by SUT to promote the potential of Thai researchers on advanced techniques in agricultural and industrial biotechnology.

Study plan: Teachers will be experts from Australia and Thailand. The course will be conducted mostly in English. Since most of our staffs are Thai, so the experimental parts will be conducted in Thai / English Participants will get certificate after if they pass the exit exam and fulfil the requirements of the course.

Apply: scan QR code to apply

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

โปรแกรม Biologics Workshop ครั้งที่ ๒

Thai-Australia Workshop

From Bench to Bedside - Biologic Medicines

Day I : Monday 17th December 2018 - An Overview of Biologic Medicines		
8:30am	Opening Ceremony, Group Picture	Nares Damrongchai
8:50 - 9:00am	Welcome and Introductions	Montarop Yamabhai
9:00 - 9:30am	Introduction to Biotechnology and Biopharmaceuticals - Part I [1]	Martina Jones
9:30 - 10:00am	Introduction to Biotechnology and Biopharmaceuticals - Part II [2]	Stephen Mahler
10:00 - 10:30am	Therapeutic Modalities for Biologic Medicines [3]	Stephen Mahler
	Morning Coffee/Tea Break: 10:30 - 11:00am	
11:00 - 11:30pm	Safety Issues and Immunogenicity of Biologics [4]	Stephen Mahler
11:30 - 12:00pm	Discovery of Biologics [5]	Martina Jones
12:00 - 12:45pm	Analytical Techniques - Characterizing Biologics and Process Analytical Technology [6]	Stephen Mahler
	Lunch Break 12:45 - 1:45pm (Lunch talk by Bang Trading 1992 Co.,Ltd : End to end solutions to transform biomanufacturing" by Tanya Lewanowitsch, Senior Business Development Manager-Enterprise Solutions, GE Healthcare Life Sciences)	
1:45 - 2:30pm	Biologics Production Processes [7]	Esteban Marcellin
2:30 - 3:00pm	Biologics Manufacturing - Best Practice [8]	Stephen Mahler

	Afternoon Coffee/Tea Break 3:00 - 3:30 pm	
3:30- 4:15pm	Biosimilars [9]	Martina Jones
4:15 - 5:00pm	Regulatory Issues	Panel Discussion with Thai FDA Wittawat Viriyabancha
5:00 - 5:30 pm	General Discussion followed by Certificate Giving Ceremony	All Participants

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Day II : Tuesday 18th December 2018 - Biologic Manufacturing		
8:30 – 9:00 am	Registration	
9:00 – 9:30am	Upstream processing - Bioreactor operation [10]	Esteban Marcellin
9:35 – 10:30am	Downstream Processing [11]	Stephen Mahler
	Morning Coffee/Tea Break 10:30 – 11:00am	
11:00am– 12:00 pm	Advanced Manufacturing of Biologic Medicines - Introduction [12]	Esteban Marcellin
12:00pm – 12:30	Process Economics [13]	Stephen Mahler
	Lunch Break 12:45 – 1:45pm	
2:00pm – 2:30pm	National Biologics Facility and ARC Training Centre for Biopharmaceutical Innovation, University of Queensland, Brisbane [14]	Martina Jones
2:30pm – 3:00pm	Industry-sponsored Demonstration slot I	
	Afternoon Coffee/Tea Break 3:00 – 3:30 pm	
3:00–3:45pm	CHO and other Biologic Expression Systems [15]	Montarop Yamabhai
3:45–4:00pm	Thailand Biologics Network	Montarop Yamabhai
4:00–4:30pm	General Discussion	All participants
4:30–5:00pm	Certificate Giving Ceremony	All participants

Day III : Wednesday 19th December 2018 - Site Visit		
7:45am	Bus departure for site visit (TBA)	Participants who register for site visit
9:00-11:00am	**1st site : Visit Biologics Facility @ Salaya Campus, Mahidol University**	Participants who register for site visit
	Lunch Break 11:00 – 12.00am	
12:00-2:00pm	Go to KMUTT Bangkhuntien	Participants who register for site visit
2:00-4:00pm	**2nd site : Visit NBF, Bangkhuntien, KMUTT**	Participants who register for site visit
4:00pm	Certificate Giving Ceremony **End of The workshop**	

Short course participants continue to SUT (transportation has been arranged)

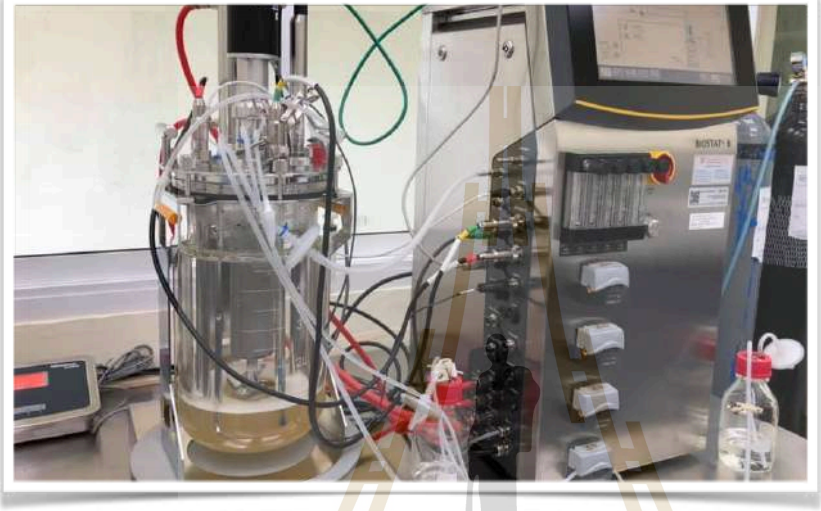
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การจัด Biologics Workshop ระหว่างวันที่ ๑๗ - ๑๙ ธันวาคม ๒๕๖๑

THAI-AUSTRALIA-USA COLLABORATION 25-26 NOVEMBER 2019 - SURANAREE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY , THAILAND

Biologics Workshop

Manufacturing of Therapeutic Proteins



The second workshop on biologics research after the first Thailand-Australia Biologics Workshop (from bench to bedside), is a 2-day workshop, which will be held during Monday, 25- Tuesday, 26 of November, 2019. The aim of this year workshop is to focus on issues essential for GMP manufacturing of therapeutic proteins, especially therapeutic antibody. The workshop is divided into 2 parts, the first day is a series of lectures and the second day is the demonstration of the production platform developed in the molecular biotechnology laboratory (MY Lab) at SUT, NBF, Australia, and other companies, as well as in-dept discussion with experts in the fields from USA, and Australia regarding manufacturing of therapeutic antibody. Registration for a certificate is possible.

Prof. Trent Munro
National Biologics Facility, Queensland, Brisbane, Australia

Dr. Olivier Laurent
Vice President, Development @ Dauntless Pharmaceuticals,

Prof. Montarop Yamabhai
School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Thailand

1 LECTURES
From antibody discovery to clinical trial
Biosimilars Manufacturing

2 DEMONSTRATION & DISCUSSION
Running a 5-10 L Bioreactors

3 PLATFORM
Antibody discovery and Expression system using MY Lab Platform

Registration

The University Of Queensland AUSTRALIA | AIBN Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnol

TCELS

โปรแกรม Biologics Workshop ครั้งที่ ๓

Program

The 2nd Thailand Biologics Workshop:

Manufacturing of Therapeutic proteins

25 – 26 November 2019*

@ Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

Session I: Monday 25th November 2019* Introduction: From genes to clinical trials		
Time	**Program**	**Speaker**
9.00 – 9.15	Opening ceremony presided by TCELS director and group pictures	
9.15 – 9.30	Introduction	Montarop Yamabhai
9.30 – 10.30	- Overview of therapeutic proteins/antibodies - What to consider to make biosimilars or new biologics	Trent Munro
	Morning coffee/tea break 10.30 – 10.45	
10.45 – 12.00	- Cell line development with GMP compliant - Process development: Upstream processing	Trent Munro
	Lunch time 12.00 – 13.00	
13.15 – 14.15	Process development: Downstream processing	Olivier Laurent
	Afternoon coffee/tea break 14.15 – 14.30	
14.30 – 15.30	Product development - Release and stability testing - Formulation - Primary container and device	Olivier Laurent
15.30 – 16.15	Quality control and regulatory considerations	Olivier Laurent
16.15 – 16.45	Q&A	

* This is a tentative program, the precise subject title, course content and speaker may be changed, but the core contents will be as indicated.

Session II: Tuesday 26th November 2019* Laboratory Workshop	
Time	**Program**
9.00 – 9.15	Introduction to the hands-on workshop
9.15 – 9.45	Demonstration of lab-scale production in MY Lab SUT
9.45 – 10.45	- Demonstration of various types of bioreactors
	- Sample collection and testing (experiments)
	Morning coffee/tea break 10.45 – 11.00
11.00 – 12.00	Demonstration of lab-scale purification
	Lunch time 12.00 – 13.00
13.00 – 14.00	- Sample collection and analysis (results and discussion)
	- Discussion about possible factors affecting the quality of biologics
	Afternoon coffee/tea break 14.00 – 14.15
14.15 – 15.00	Presentation of MY Lab Antibody Production Platform
15.00 – 15.30	- General discussion
	- Certificate giving ceremony

* The laboratory session will be conducted by Prof. Montarop Yamabhai and her Staffs. In addition, the two experts, Prof. Trent Munro and Dr. Olivier Laurent will be available to discuss and answer all relevance questions all day during the second day workshop.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประมวลภาพกิจกรรมการฝึกอบรม ครั้งที่ ๒

หลักสูตร: เทคโนโลยีการผลิตแอนติบอดีปรับแต่งพันธุกรรม ระหว่างวันที่ 20-21 ธันวาคม 2561

ผู้เข้าร่วมอบรมฟังการบรรยายจากวิทยากร

ผู้เข้าร่วมอบรมรับฟังการบรรยายจากผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้เข้าอบรมทำการปฏิบัติการ

เข้าอบรมทำแบบทดสอบความรู้หลังเข้ารับการอบรมออนไลน์

Session I: Monday 25th November 2019* Introduction: From genes to clinical trials		
Time	**Program**	**Speaker**
8.15 – 9.00	Registration	
9.00 – 9.15	Opening ceremony presided by TCELS director and Vice Rector for Research, Innovation, and Technology Development and group pictures	
9.15 – 10.30	Overview of Biologics Development: timeline and activities	Olivier Laurent & Trent Munro
	Morning coffee/tea break 10.30 – 10.45	
10.45 – 11.30	Analytical Development for biologics, release specifications and stability	Olivier Laurent
11:30-12:00	Drug Substance Manufacturing – Cell line development	Trent Munro
	Lunch time 12.00 – 13.00	
13.00 – 14.15	Drug substance manufacturing - Upstream Processing - Downstream Processing	Trent Munro
	Afternoon coffee/tea break 14.15 – 14.45	
14.45 – 15.30	Drug Product Development and Manufacturing	Olivier Laurent
15.30 – 16.30	Biosimilars - What to consider to make biosimilars - Regulatory considerations	Trent Munro & Olivier Laurent
16.30 – 17.00	Q&A - Day 2 Lab Brief	
18.30	Workshop dinner Party @ Krua 9x9	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Session II: Tuesday 26th November 2019* Laboratory Workshop	
Time	**Program**
8.45 – 9.00	Registration
9.00 – 10.30	Morning section - Station I: Antibody acquisition - Station II: Expression vector construction - Station III: Transient and stable expression
Morning coffee/tea break 10.30 – 11.00	
11.00 – 12.00	Private discussion with experts (need to be booked available time before)
Lunch time 12.00 – 13.15	
13.15 – 14.45	Afternoon section - Station IV: Up-scaling production to 5L-bioreactor and sample analysis - Station V: Small scale purification
Afternoon coffee/tea break 14.45 – 15.15	
15.15 – 16.00	Purification process
16.00 – 16.30	Certificate giving ceremony

* The laboratory session will be conducted by Prof. Montarop Yamabhai and her Staffs. In addition, the two experts, Prof. Trent Munro and Dr. Olivier Laurent will be available to discuss and answer all relevance questions all day during the second day workshop. Please book your time for private discussion with our staffs.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประมวลภาพกิจกรรมครั้งที่ ๓

การจัดประชุมเชิงปฏิบัติการ “Biologics Workshop II: Manufacturing of Therapeutic Proteins”
ระหว่างวันที่ 25-26 พฤศจิกายน 2563 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมืองนครราชสีมา จ.นครราชสีมา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

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 ประเทศสหพันธรัฐเยอรมัน 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 หลังปริญญาเอก 9 คน ปริญญาเอก 13 คน ระดับปริญโท 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