ฐิติมา สัมพันธ์อภัย : การคัดหา และวิศวกรรมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (IDENTIFICATION AND ENGINEERING OF HUMAN ANTIBODY AGAINST ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML)) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ภญ.มณฑารพ ยมาภัย, 101 หน้า.

มะเร็งเม็ดเลือดขาวไมอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน (AML) เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดแบบเฉียบพลันที่พบได้มากที่สุด และยังเป็นหนึ่งในปัญหาหลักของประเทศไทยและทั่วโลก การรักษาแบบมุ่งเป้าเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งด้วยวิธีจำแบบจำเพาะ โดยใช้แอนติบอดีเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน องค์ความรู้ด้านชีวโมเลกุลสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาเทคโนโลยีการแสดงแอนติบอดีบนผิวเฟจเพื่อใช้ในการผลิตแอนติบอดีสำหรับการรักษา และตรวจวิเคราะห์เพราะเทคโนโลยีนี้สามารถนำไปใช้ในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีมนุษย์ที่จับแบบจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวของเซลล์มะเร็ง อีกทั้งยังสามารถปรับแต่งพันธุกรรมของแอนติบอดีให้มีคุณสมบัติเหมาะสมตามวัตถุประสงค์การใช้งานในวิทยานิพนธ์นี้แอนติบอดีได้ถูกคัดเลือกจากคลังที่สร้างจากเม็ดเลือดขาวของคนปกติ คือคลังย่าโม 1 โดยใช้ cell line AML ชนิด HL-60 เป็นเซลล์เป้าหมาย ผลการทำการคัดเลือกหาแอนติบอดีที่จำเพาะ แสดงว่าสามารถคัดเลือกแอนติบอดีทีสามารถจับกับเซลล์เป้าหมาย HL-60 ได้ โดยได้วิเคราะห์ความสามารถในการจับแบบจำเพาะของแอนติบอดีต่อเซลล์เป้าหมายด้วยวิธีโฟลไซโตเมตรี (Flow cytometry) และพบว่า แอนติบอดีโคลน y1HL63152 แสดงความสามารถในการจับได้ดีที่สุด และเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงมาก คือจับจำเพาะกับเซลล์ AML ชนิด HL-60 ในระยะที่ยังไม่ได้พัฒนา (non-differentiate) เท่านั้น จึงได้เลือกใช้แอนติบอดีโคลนนี้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อเซลล์เป้าหมายต่อไป ผลของการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีและส่องใต้กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลพบว่า แอนติบอดี y1HL63152 จับอยู่บนผิวของเซลล์ HL-60 และเมื่อทดสอบความสามารถในการเข้าไปในเซลล์ HL-60 พบว่า แอนติบอดี y1HL63152 สามารถเข้าไปในเซลล์ได้ นอกจากนั้นแล้วแอนติบอดีโคลน y1HL63152 และ anti-CD33 ยังได้ถูกดัดแปลงทางพันธุวิศวกรรมเป็นสองแบบ คือหนึ่งเชื่อมเข้ากับโปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียวได้เป็นโมเลกุลแอนติบอดี scFv-GFP เพื่อความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์การจับกันของแอนติบอดีและผิวเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry นอกจากนั้น 152-GFP ได้ถูกนำไปตรวจสอบความสามารถในการจับกับเซลล์มะเร็งที่สกัดได้จากผู้ป่วย ซึ่งได้พบว่า แอนติบอดี 152-GFP สามารถจับกับเซลล์มะเร็งที่สกัดมาจากไขกระดูกของผู้ป่วยบางรายได้ แอนติบอดีโคลน y1HL63152 ได้ถูกดัดแปลงทางพันธุวิศวกรรมอีกแบบคือเชื่อมต่อกับสารพิษ และพบว่า แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับสารพิษสามารถกำจัดเซลล์มะเร็ง HL-60 ได้ที่ความเข้มข้นในช่วงไมโครโมลาร และเมื่อได้ทดสอบความสามารถในการกำจัดเซลล์ HL-60 โดยผสมกันระหว่าง 152-Sarcin กับ anti-CD33-Sarcin พบว่า สามารถเพิ่ม

ความสามารถในการกำจัดเซลล์ HL-60 เมื่อเทียบกับการใช้ 152-Sarcin อย่างเดียว โดยสรุปเทคโนโลยีเฟจสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์ AML ได้สำเร็จ และแอนติบอดีนี้ยังอาจนำเอาไปใช้ในการศึกษาโครงสร้าง และหน้าที่รวมถึงกลไกการเจริญเติบโตและพัฒนาเซลล์ AML อีกทั้งยังสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้รักษาหลังจากที่มีการทดสอบทางคลินิกในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

THITIMA SUMPHANAPAI : IDENTIFICATION AND ENGINEERING OF HUMAN ANTIBODY AGAINST ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML). THESIS ADVISOR : PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 101 PP.

RECOMBINANT ANTIBODY/ACUTE MYELOID LEUKEMIA/PHAGE DISPLAY ANTIBODY/ANTIBODY ENGINEERING

Acute myeloid leukemia (AML) is a cancer of blood and bone marrow that is rapidly fatal within months if untreated. It is one of the major health problems in Thailand and around the world. Targeted therapy using recombinant antibody is currently an attractive approach to treat cancer. Recent advances in molecular biology have led to the development of phage display antibody technology for the development of therapeutic and diagnostic antibodies. This method allows the generation of human monoclonal antibodies against specific molecules on the surface of cancer cells. It also allows the engineering of antibodies to suit specific purposes. In this thesis, the human scFv antibody fragments were isolated from a non-immunized phage display antibody library, using whole AML cell line (HL-60) as a target. The binding specificity and cross-reactivity of the isolated soluble scFv antibody fragments were evaluated by flow cytometry assay. The scFv antibody clone y1HL63152, which showed specific binding to HL-60 cells, was selected for further analysis. Immunofluorescent staining indicated that it could bind to the surface of the cell, and internalized. Moreover, the y1HL63152 and anti-CD33 scFv were further engineered into two different formats. Firstly, fusions to a fluorescent reporter, scFv-GFP, were created and used as convenient probes for the analysis of cell surface binding by flow cytometer. The results indicated that the target of y1HL63152 only expressed in the non-differentiated HL60 cell line and CD33 did not serve as a target for y1HL63152 scFv antibody. Most importantly, the y1HL63152 scFv could bind to certain samples of bone

marrow mononuclear cells derived leukemic patients. Secondly, fusions of scFv to ribotoxin, Sarcin, was generated and it showed that this immunotoxin could lead to a cytotoxic effect against AML-derived HL-60 cells at a micromolar concentration. In addition, the combining effect of y1HL63152scFv-Sarcin with anti-CD33-Sarcin was demonstrated. In conclusion, phage display technology was successfully used to isolated antibodies against AML cells. This antibody has the potential to be used as a reagent for the study of AML as well as further developed to be used in combination therapy for the treatment of certain types of leukemia after further clinical investigations.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2018

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____