วิษณุ ศรีลา : การพัฒนาระบบการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิตแอนติบอดีมนุษย์ปรับแต่งพันธุกรรม (DEVELOPMENT OF EXPRESSION SYSTEM FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN ANTIBODY) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย, 149 หน้า.

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีส่วนแบ่งทางการตลาดมากที่สุด เนื่องจากมีการใช้ในการวินิจฉัย การป้องกัน และการรักษาโรค และยังมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีกจำนวนมากที่กำลังจะออกสู่ตลาดในอีกไม่กี่ปีข้างหน้า การเติบโตอย่างเด่นชัดของชีวผลิตภัณฑ์ (Biologics) ส่งผลให้มีความต้องการระบบการแสดงออกที่มีคุณภาพและได้ผลผลิตสูง ผู้วิจัยได้พัฒนาระบบการแสดงออกของชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยว (single-chain variable fragment, scFv) ที่เชื่อมต่อกับโปรตีนสีเขียวมรกตเรืองแสง (Emerald Green Fluorescent Protein, EmGFP) ที่มีประสิทธิภาพ เหมาะสำหรับการผลิตฟลูโอบอดี้ (fluobodies) ประสิทธิภาพของระบบ scFv-EmGFP ที่พัฒนาขึ้นนี้ถูกแสดงผ่านการประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจหาไวรัสพิษสุนัขบ้าและสารพิษจากเชื้อรา จะเห็นได้ว่าระบบนี้มีศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของสารต่าง ๆ ได้ รวมทั้งสำหรับใช้ในการบันทึกภาพ ของตัวอย่างทางชีวภาพที่เกิดขึ้นจริงในช่วงเวลาต่าง ๆ (real-time bioimaging) ด้วย

วิทยานิพนธ์นี้ยังมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการประยุกต์ใช้เส้นทางปฏิบัติการ (pipeline) ที่รวดเร็วของการทดลองการแสดงออกแบบชั่วคราว (transient expression) ที่ทำซ้ำได้ เพื่อระบุการตั้งค่าที่ดีที่สุดอย่างรวดเร็วก่อนการพัฒนาเซลล์ไลน์แบบเสถียร (stable cell line) ตัวแปรที่อยู่ในเส้นทางปฏิบัติการนี้ ได้แก่ ลำดับยีนที่ปรับรหัสพันธุกรรมให้เหมาะสม (optimized codon) และการเลือกชนิดของเปปไทด์สัญญาณ (signal peptides) ที่เหมาะสม โดยในเส้นทางปฏิบัติการนั้น สิ่งสำคัญที่จะต้องคำนึงถึง คือการกำหนดลักษณะสมบัติของพฤติกรรมเซลล์อย่างระมัดระวัง เช่น อัตราการเติบโตและผลผลิตที่เฉพาะเจาะจง การเลือกแต่ละองค์ประกอบอย่างรวดเร็วในแต่ละกรณี จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการสร้างโคลนในการผลิตแอนติบอดีเพื่อการรักษาแบบยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilar) ที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วขึ้น

ในการทดลองสุดท้ายของวิทยานิพนธ์นี้ เทคโนโลยีการแก้ไขยีนแบบคริสเปอร์ (CRISPR) ได้ถูกนำมาใช้ในการสร้างระบบการแสดงออกของเซลล์ Chinese Hamster Ovary (CHO) โดยได้ทำการลบ ยีนกลูตามีนซินทีเทสออก (glutamine synthetase-knockout) อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการสร้างเซลล์ไลน์แบบเสถียรที่ใช้ผลิตยาชีวผลิตภัณฑ์ เพราะระบบนี้สามารถเร่ง

ความเร็วในการหาโคลนที่มีกำลังการผลิตสูง เนื่องจากกระบวนการคัดเลือกนี้มีความเข้มงวดสูง และลดการสะสมแอมโมเนียในเซลล์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

WITSANU SRILA : DEVELOPMENT OF EXPRESSION SYSTEM FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN ANTIBODY : PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 149 PP.

IMMUNOFLUORESCENCE/CODON OPTIMIZATION/SIGNAL PEPTIDE/ CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) CELLS/ /MONOCLONAL ANTIBODY/ KNOCKOUT

Monoclonal antibodies (mAbs) dominate the market with the largest revenue share due to their use in diagnosis, prevention, and treatment of diseases. More mAbs will be on the market in the coming years. The growing significance of biologics has resulted in the demand for high quality and productivity expression systems. In this thesis, an efficient single-chain variable fragment (scFv)-Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP) expression system, suitable for production of fluobodies has been developed. The efficacy of scFv-EmGFP was demonstrated via an application for the detection of rabies virus and mycotoxins. This system has potential to be used for both quantitative and qualitative analysis of various analytes as well as real-time bioimaging of biological samples.

In this research, the benefits of applying a rapid pipeline of reproducible transient expression experiments to quickly identify the best settings before the development of a stable cell line has been demonstrated. The parameters included in this pipeline were codon optimized gene sequences and combinations of different signal peptides. An important aspect of such a pipeline including careful characterization of cell behavior, such as growth rate and specific productivity have been evaluated. This rapid selection

of individual elements on a case by case basis would hugely benefit the efficient and timely generation of production clones for biosimilar therapeutic antibody manufacturing.

Finally, CRISPR-based gene editing technology was employed to create an efficient glutamine synthetase (GS)-knockout Chinese Hamster Ovary (CHO) cell expression system suitable for generation of stable cell line expressing biologics drug. This system could accelerate the identification of high producing clones because of high selection stringency and reduction of ammonia accumulation in the cells.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature Witsanu Sriba

Advisor's Signature