

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480086

ชื่อโครงการ: การเตรียมแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่เป็นโมเลกุลโปรตีนของมนุษย์โดย
สมบูรณต่อสารพิษเอนเทอโรท็อกซินชนิดเอของเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส
โดยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ เพื่อการพัฒนาต่อไปสำหรับการรักษาโรค

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. (นางสาว) นิตยา อินทราวัฒนา
ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล : tmniw@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดีของมนุษย์ที่มีความสามารถในการจับกับพิษ Staphylococcal enterotoxin A (SEA) จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยใช้เทคนิคแอนติบอดีฟาจดิสเพลย์ การวิจัยเริ่มจากการเพิ่มจำนวนยีน SEA จากเชื้อ *Staphylococcus aureus* strain ATCC 13565 แล้วนำ PCR product เข้าสู่ cloning vector และ *E. coli* host protein expression system และผ่านขั้นตอน protein purification โดยใช้ affinity resin ซึ่งนำ purify recombinant SEA (rSEA) ที่เตรียมได้มาใช้เป็นแอนติเจนคัดเลือกฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีจำเพาะต่อพิษด้วยเทคนิคไบโอแพนนิ่ง (bio-panning) ซึ่งสามารถคัดเลือกฟาจที่ดิสเพลย์แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ rSEA ได้ 28 โคลน จากนั้นนำฟาจแต่ละโคลนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านชนิดเอชเชอริเชียโคไล (*E. coli*) แล้วตรวจสอบความหลากหลายของยีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (genes coding for human monoclonal single chain variable fragments; *huscfv*) ในฟาจที่คัดเลือกไว้ด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ผลการวิเคราะห์พบว่ายีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์หรือ *huscfv* จากแบคทีเรียทั้ง 2 โคลนมีรูปแบบของท่อนดีเอ็นเอ (DNA bands) ที่แตกต่างกัน แสดงว่าแอนติบอดีจากยีนเหล่านี้จะมีความจำเพาะต่อเอพิโทปต่างกันหรืออย่างน้อยก็มีแอฟฟินิตีต่อเอพิโทปไม่เท่ากัน จากนั้นนำแบคทีเรียไปเลี้ยงแล้วทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์แบคทีเรียสร้างแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่จับจำเพาะกับ rSEA ออกมา แล้วทำการแยกแอนติบอดีสายเดี่ยวออกมาจากโปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรีย โดยใช้ anti-E-tag resin จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีสายเดี่ยวในการจับกับ rSEA โดยตรวจดูว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวเหล่านั้นจะสามารถยับยั้งการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน lymphocyte cells ใน PBMCs ด้วย rSEA ได้หรือไม่ ซึ่งพบว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวจากแบคทีเรียจำนวน 1 โคลน สามารถยับยั้ง activity ได้ กล่าวได้ว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตต้นแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่สามารถจับกับสารพิษ rSEA ซึ่งแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลที่ผลิตได้นี้สามารถที่จะนำไปพัฒนาต่อตามขั้นตอนที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษได้ในที่สุด ทั้งนี้เพราะแอนติบอดีต้นแบบเหล่านี้เป็นโมเลกุลโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์ย่อมไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ (anaphylaxis หรือ serum sickness) ในผู้รับ ดังที่มักจะเกิดเมื่อใช้แอนติบอดีจากสัตว์ในการรักษาผู้ป่วย

คำหลัก: เทคนิคฟาจดิสเพลย์ แอนติบอดีสำหรับรักษาโรค แอนติบอดีสายเดี่ยว แอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาล ฟาจดิสเพลย์ไลบรารี ฟาจมิด สแตปไฟโลค็อกคัส ออเรียส เอนเทอโรท็อกซิน เอ

Abstract

Project Code: MRG5480086

Project Title: Preparation of fully human monoclonal antibody to enterotoxin A (SEA) of *Staphylococcus aureus* by using phage display technology for further development to therapeutic antibody

Investigator: Asistant Professor Dr. (Ms) Nitaya Indrawattana
Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine,
Mahidol University

E-mail Address: tmniw@mahidol.ac.th

Project Period: 2 Years

This study aims to produce immunotherapeutic human monoclonal antibodies in the form of single chain antibodies (ScFv) against staphylococcal enterotoxin A (SEA) by using phage display human antibody library. Recombinant SEA protein (rSEA) was produced by amplified the sea full length from *Staphylococcus aureus* strain ATCC 13565 and subjected to host protein expression system. The purified rSEA was used in a "single-round" phage bio-panning against an established phage display human antibody library and the rSEA specific phage population was obtained. Twenty-eight individual phage clones with high binding affinity ScFv to the rSEA were obtained after a phage ELISA using the rSEA as an antigen to coat a microtiter ELISA plate and the bovine serum albumin as a negative antigen control. Individual phages were used to transfect non-suppressor *E. coli* bacteria for production of the human soluble ScFv. Two transformants carrying scFv-phagemids were obtained. The scFv derived from various *E. coli* transformants revealed high DNA banding pattern diversity (different RFLP) implying either epitope or affinity diversity of the expressed ScFv. Expressed ScFv was purified from individual *E. coli* transformants by using an anti-E-tag column. The efficiency of the ScFv in neutralizing the rSEA was investigated by inhibition of lymphocyte cells proliferation assay. The results showed one selected ScFv from phage clone is successes to inhibit the lymphocyte proliferation by rSEA. This study successfully produced human antibodies ScFv that can inhibit rSEA acitivity. These antibodies may be use for treatment in patient who got staphylococcal enterotoxin.

Keywords: Staphylococcus enterotoxin A, SEA, phage display, human single chain antibody, HuScFv