

ชื่อโครงการ ScFv และนาโนบอดีมนุษย์ผ่านเข้าเซลล์ที่ยับยั้งไทโรซีนไคเนสของ Epidermal Growth Factor Receptor
ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รศ.ดร.เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกล

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 16 กรกฎาคม 2557 ถึง 15 กรกฎาคม 2560

ABSTRACT

Aberration of epidermal growth factor receptor (EGFR) mostly found in various solid cancers such as breast, cervical, head and neck, and including lung cancer. 85% of lung cancer often have been found into non-small cell lung cancer (NSCLC) which mostly cause patient death. Therefore, the first strategy is chemotherapy for attenuating EGFR activity. Monoclonal antibodies (mAb) and small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) have been used as anti-cancer agents. Unfortunately, they remain many disadvantage such non-specific effective, side effect, lack of penetrable property. However, decades of biology research on cancer therapy have been revealed many strategies for improving efficiency of anticancer drug. We used the computational studies to understand the protein-protein interaction that activate kinase activity and MIG6 peptide that inhibit activity of EGFR. The computational studies revealed the key residue in the interaction and inhibiting mechanism. Furthermore we aim to find nanobodies as inhibitors which were selected from humanized VH/V_HH phage display library. The nanobody clone containing EGFR-high affinity and EGFR-inhibitory were introduced cell-penetrable peptide (Arg-9) for making cell-penetrable nanobodies. Cell-based experiment revealed that VH18, VH36 modulate cell viability of NSCLC cell lines (A549) with nanomolar range (181nM and 9.61nM, respectively) compare to approved drug. Confocal microscope suggested that all cell-penetrable nanobodies able to penetrate cell. Moreover, combination of molecular docking and epitope searching reveal that VH36 can bind to C-lope of EGFR which essential for EGFR-dimerized activation. This antibody fragment can be developed as a therapeutic agent for cancer therapy.

บทคัดย่อ

ความผิดปกติของโปรตีนตัวรับอีพิเดอมอลโกรทแฟคเตอร์ (EGFR) มักพบส่วนมากในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งในระบบสืบเชื้อสายและลำคอ รวมไปถึงมะเร็งปอด มากไปกว่านั้น 85% ของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมักพบว่าเป็นเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่เล็ก (NSCLC) ดังนั้น EGFR จึงเป็นโปรตีนเป้าหมายในการพัฒนายาในการรักษาโรคมะเร็ง ในปัจจุบันตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีน EGFR นั้นแบ่งออก 2 ชนิดคือ สารโมเลกุลเล็กและแอนติบอดี อย่างไรก็ตามข้อจำกัดในการใช้สำหรับการรักษาโรคมะเร็งยังคงเป็นอุปสรรค ตัวอย่างเช่น การขาดความจำเพาะเจาะจงในการรักษาที่โปรตีนเป้าหมาย การเกิดผลข้างเคียงในการรักษา การขาดความสามารถในการแทรกเข้าเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อที่จะเข้าใจการจับกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีนเพื่อกระตุ้นการทำงานของไคเนส และการจับกับ MIG6 เปปไทด์ ที่ยับยั้งกิจกรรมของไคเนส การศึกษาด้วยคอมพิวเตอร์แสดงให้เห็นถึงกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการจับกันและการยับยั้ง นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้คัดเลือก VH/V_HH ที่จำเพาะต่อไทโรซีนไคเนสโดเมนของ EGFR (TK-EGFR) จากเทคโนโลยีคลังฝาจ หลังจากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการจับและความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ TK-EGFR มาต่อเข้ากับเปปไทด์แทรกเข้าเซลล์ หรือ Arg-9 เพื่อสร้างให้นาโนบอดีสามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่เล็ก (A549) พบว่า นาโนบอดีโคลน VH18, V_HH35 และ VH36 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ในระดับนาโนโมลาร์ โดยมีค่า IC₅₀ 181 nM, 9.16nM และ 9.61nM ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยาที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบันผลจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์แบบตัดเฉือนบ่งชี้ว่านาโนบอดีดังกล่าวมีความสามารถในการแทรกผ่านเข้าเซลล์ได้มากกว่านั้นทำสมมุติฐานผลจากการหาบริเวณจับรวมกับกับการทำนายโครงสร้างโดยใช้คอมพิวเตอร์บ่งบอกว่า VH36 จับที่บริเวณ C-lope ของ EGFR ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญในการเกิดการกระตุ้นให้เกิดการทำงาน ดังนั้นนาโนบอดีจึงเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคมะเร็ง