บทสรุปผู้บริหาร

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของ recombinant HA protein ของไวรัส Influenza (H5N1) ผลิตจากเซลล์แมลงและการขยายขนาดการผลิตในถังหมัก 2.5 ลิตร (โครงการต่อเนื่อง ระยะที่ 2)

Characterization of Recombinant HA protein of Influenza virus (H5N1) from insect cells and production in 2.5 L bioreactor (Phase II)

ผู้จัดทำ

ผศ.ดร.เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง
ผศ.ดร.กนกวรรณ พุ่มพุทรา
ดร.แสงชัย เอกประทุมชัย
นายไวรุจน์ เดชมหิทกุล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150 โทร02-4707498-01

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2553

มีนาคม 2555

บทสรุปผู้บริหาร

คณะผู้วิจัย

1. นางเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง(หัวหน้าโครงการ)สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียนกรุงเทพฯ 10150 โทรศัพท์
02 470-7498 โทรสาร 02 452-3455 phenjun@pdti.kmutt.ac.th

2. นางสาวกนกวรรณ พุ่มพุทรา คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150 โทรศัพท์ 02-470-7500 โทรสาร 02-452-3455 kanokwam.poo@kmutt.ac.th

3.นายแสงชัย เอกประทุมชัย คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150 โทรศัพท์ 02-470-7501 โทรสาร02-452-3455 saengchai.ake@kmutt.ac.th

4.นายไวรุจน์ เดชมหิทธิ์กุล หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150 โทรศัพท์ 02-470-7499
โทรสาร 02-452-3455

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2553 จำนวนเงิน 768,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2553 ถึงกันยายน 2554

ภาษาไทย

การระบาดของไวรัส Influenza (H5N1) ในสัตว์ปีก และรายงานการติดเชื้อสายพันธุ์นี้จากสัตว์ปีกไปสู่คนในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 ก่อให้เกิดความกังวลไปทั่วโลกว่าไวรัสสายพันธุ์นี้อาจเกิดกลายพันธุ์และสามารถแพร่เชื้อระหว่างมนุษย์ อาจทำให้เกิดเกิดการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อกรณีมีการระบาดเกิดขึ้น เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะช่วยลดความสูญเสียต่อชีวิตและทรัพย์สินของประชากรโลกได้ การผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสในปัจจุบันเป็นการผลิตไวรัส ซึ่งต้องมีการป้องกันการแพร่ของเชื้อไปยังสิ่งแวดล้อมขณะดำเนินการผลิต ซึ่งระบบป้องกันนั้นมีต้นทุนสูง โดยเฉพาะในการขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

การผลิตวัคซีนในรูปแบบการใช้เฉพาะโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสส่วนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี เช่น Hemagglutinin เป็นการผลิตวัคซีนที่ไม่ต้องมีระบบควบคุมความปลอดภัยของไวรัสขณะดำเนินการผลิต โครงการนี้ได้ทำการผลิต Recombinant hemagglutinin protein จาก Baculovirus Expression Insect Cell System ซึ่งทำโดยการทำพันธุวิศ กรรมแบคคิวโลไวรัส ซึ่งเป็นไวรัสที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ให้มียีน hemagglutinin เป็นส่วนหนึ่งของพันธุกรรมและเมื่อนำแบคคิวโลไวรัสนี้ไปติดเชื้อเข้าสู่เซลล์แมลง เซลลแมลงมีการสร้าง recombinant hemagglutinin protein ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีน hemagglutinin ของไวรัส Influenza (H5N1) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในถังหมัก 2.5 ลิตรพบว่า ควรใช้ไวรัสที่ MOI 0.1 ในการ infect เซลล์แมลงจำนวน $0.6x10^6$ เซลล์/มล. และทำการเก็บเกี่ยวรีคอมบีแนนต์โปรตีนในวันที่ 5 หลังการ infection ทำการสกัดรีคอมบีแนนต์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ซึ่งสามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนได้ดี โครงการนี้สามารถผลิต Recombinant hemagglutinin protein จาก Baculovirus Expression Insect Cell System ได้เท่ากับ 228.5 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อนำรีคอมบีแนนต์ ฮีแมกลูตินินโปรตีนของ H5N1 ที่สกัดได้มาทดสอบการการสร้างภูมิคุ้มกันในหนูทดลองพบว่าเมื่อฉีดโปรตีนกระตุ้นหนู 3 ครั้งและนำซีรัมของหนูมาตรวจพบว่ามีการสร้างสารภูมิคุ้มกันต่อรีคอมบีแนนต์ ฮีแมกลูตินินโปรตีนของ H5N1

ภาษาอังกฤษ

Spreading of avian influenza virus (H5N1) and reports on human infection during 2004-2005 caused worldwide concern on influenza pandemic. Vaccine is an alternative method to prevent loses from this disease. To produce this vaccine, viruses must be produced in large amount to be used as antigen to trigger immune system. The viruses are however infectious, therefore virus containment at high biosafety level is required. This certainly affects cost for construction of vaccine factory.

The method is to use recombinant influenza virus protein as antigen. Viral proteins that stimulate immune response such as hemagglutinin could be used. In this study, hemagglutinin protein was produced by Baculovirus Expression Insect Cell System. Baculovirus, which is safe to human and environment, was genetically engineered to have hemagglutin gene inserted into its genome. The genetically engineered baculoviruses were then infected into their natural insect cell hosts. The recombinant hemagglutinin protein was produced from infected insect cells. The optimal conditions in 2.5 l fermentor to produce the highest level of recombinant protein were obtained. It was found that the baculoviruses at multiplicity of infection (MOI) 0.1 was optimum for infection into $0.6x10^{6}$cells /ml and the protein could be harvested at 5 day post infection. The recombinant hemagglutinin protein from infected insect cells was purified by using chromatography. The purify heamaglutinin protein production was 228.5 ug /l. The immunogenicity was tested in Balb C mice and found the antibody againt H5N1 HA antigen in the serum of these mice.

บทสรุปย่อโครงการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของ recombinant HA protein ของไวรัส Influenza (H5N1) ผลิตจากเซลล์แมลงและการขยายขนาดการผลิตในถังหมัก 2.5 ลิตร (โครงการต่อเนื่อง ระยะที่ 2)

Characterization of Recombinant HA protein of Influenza virus (H5N1) from insect cells and production in 2.5 L bioreactor (Phase II)

ผู้จัดทำ

ผศ.ดร.เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง
ผศ.ดร.กนกวรรณ พุ่มพุทรา
ดร.แสงชัย เอกประทุมชัย
นายไวรุจน์ เดชมหิทกุล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150 โทร02-4707498-01

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2553

มีนาคม 2555

บทสรุปย่อโครงการวิจัย

โครงการ **การศึกษาคุณสมบัติของ recombinant HA protein ของไวรัส Influenza (H5N1) ผลิตจากเซลล์แมลงและการขยายขนาดการผลิตในถังหมัก 2.5 ลิตร (โครงการต่อเนื่อง ระยะที่ 2)**

โครงการนี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการแรกที่ได้มีการผลิต recombinant hemagglutinin protein ของไวรัสอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N1 จากเซลล์แมลงโดยระบบ Baculovirus Expression Insect Cell System ในโครงการที่ 1 แล้วคณะผู้ประเมินเห็นว่าควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนสำหรับใช้เป็นวัคซีน (immunogenicity) หรือใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในชุดตรวจวินิจฉัย และด้านการขยายขนาดการผลิตในระบบถังหมักขนาด 2.5 ลิตร เพื่อเป็นข้อมูลในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ recombinant hemagglutinin (HA) protein ของไวรัสอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N1ทั้งทางด้านชีวเคมีและคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunogenicity)

2. เพื่อขยายขนาดการผลิต recombinant hemagglutinin (HA) protein ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร

3. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต recombinant HA protein จากเซลล์แมลงในถังหมักระดับ 2.5 ลิตร

ขอบเขตของการวิจัย

1. การสกัด recombinant HA protein ให้บริสุทธิ์ (ต่อเนื่องจากโครงการระยะที่ 1) เพื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป

2. ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunogenicity) ของโปรตีนเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นวัคซีน หรือใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในชุดตรวจวินิจฉัย

3. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต recombinant HA protein จากเซลล์แมลงในถังหมักระดับ 2.5 ลิตร

สรุปผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการทำบริสุทธิ์รีคอมบีแนนต์ฮีแมกลูตินินโปรตีนต่อจากโครงการแรกจนบริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่างๆดังนี้

1.จากการแยกและทำบริสุทธิ์ rHA โปรตีนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์เป็นลำดับ คือ QXL/QFF, SP-Sepharose และ CHT นั้น เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่าสามารถกำจัดสารพันธุกรรมและโปรตีนปนเปื้อนให้แยกออกจาก rHA โปรตีน ได้ตามลำดับ โดยในขั้นตอนสุดท้ายจากการใช้ CHT คอลัมน์พบว่าตัวอย่างโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ D มี rHA โปรตีนและโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 แถบโปรตีน ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วย Western blot analysis พบว่าน่าจะเป็น

rHA โปรตีนที่เกิดจากการ polymerization อย่างไรก็ตามพบว่ามีอีก 1 โปรตีนปนเปื้อน คือ แถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 25 kDa ซึ่งหากเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนระหว่าง rHA โปรตีนและโปรตีนปนเปื้อนขนาดเล็กกว่า 25 kDa นี้พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกัน (รูปที่ 12แถวที่ 5 และ 6) ดังนั้นตัวอย่างนี้ยังต้องการขั้นตอนต่อไปในการให้ได้ rHA โปรตีนที่ปราศจากการปนเปื้อน

2. นอกจากตัวอย่างที่ได้จากการชะออกจาก CHT คอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ D ตามข้อที่ 1 แล้ว เมื่อตรวจสอบตัวอย่างโปรตีน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างโปรตีนที่ไม่เกาะกับ CHT คอลัมน์ (CHT flow through) และที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (CHT Wash) (รูปที่ 12 แถวที่ 3 และ 4) กลับมี rHA โปรตีนในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างโปรตีนอื่นๆที่ได้จาก CHT คอลัมน์ อีกทั้งไม่เห็นโปรตีนปนเปื้อนขนาดเล็กกว่า 25 kDa ดังนั้นอีกทางเลือกหนึ่งในการแยก rHA โปรตีนให้บริสุทธิ์นอกจากการให้เกาะกับ CHT คอลัมน์และชะออก อาจใช้วิธีการตรงกันข้าม คือให้โปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ โดยเฉพาะโปรตีนปนเปื้อนขนาดเล็กกว่า 25 kDa เกาะกับ CHT คอลัมน์แต่ให้ rHA โปรตีนเท่านั้นผ่านคอลัมน์ ซึ่งน่าจะให้ rHA โปรตีนที่ปราศจากการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่นๆ โดยไม่ต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติมอีก

3. ในขั้นตอนสุดท้ายที่ทำการแยกโปรตีนด้วย CHT คอลัมน์นั้น จากการทำ Western blot analysis พบว่าทุกตัวอย่างโปรตีนที่ได้ทั้งข้อ 1และ 2 ข้างต้นมี rHA โปรตีนอยู่ด้วยโดย rHA โปรตีนดังกล่าวมี Hemagglutination activity ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่ากระบวนการแยก rHA โปรตีนได้ผล โดยใช้ขั้นตอน คือ เริ่มจากการใช้ QXL/QFF และนำส่วน flow through มาลง SP-Sepharose คอลัมน์ จากนั้นชะโปรตีนออกจาก SP-Sepharse ด้วย18-25% บัฟเฟอร์ B เพื่อนำไปลง CHT คอลัมน์ ซึ่งตัวอย่างโปรตีนที่มี rHA โปรตีนที่มีโปรตีนปนเปื้อนน้อยที่สุดหรือไม่พบเลย คือ ตัวอย่างโปรตีนที่ไม่เกาะกับ CHT คอลัมน์

4.รีคอมบีแนนต์ฮีแมกลูตินินโปรตีนที่ผลิตได้มีปริมาณ 228.5ไมโครกรัมต่อลิตรและเมื่อนำมาทดสอบการเป็นแอนติเจนในหนูทดลองโดยตรวจสอบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของโปรตีนที่ผลิตและทำบริสุทธิ์ได้ในหนูทดลอง ซึ่งดำเนินการทดลองโดยฉีดโปรตีนเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิ 3 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บซีรัมมาวิเคราะห์หาภูมิคุ้มกันเปรียบเทียบกับซีรัมของหนูก่อนการฉีดโปรตีนกระตุ้นพบว่ารีคอมบีแนนต์ฮีแมกลูตินินโปรตีนสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันกับหนูได้