ประเภทของงานวิจัย: การวิจัยประยุกต์

สาขาที่ทำวิจัย: เทคโนโลยีชีวภาพ

หน่วยงานที่รับผิดชอบ: สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม 75/1 ถ. พระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 โทร 02-2461743 โทรสาร 02-2462134 และ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โทรศัพท์ 02-470-7564 โทรสาร 02-452-3455

คณะผู้วิจัย:

หัวหน้าโครงการ 1. ผศ. ดร. อนันต์ ทองทา สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ผู้ร่วมวิจัย 1. ดร. พรทิพย์ วิรัชวงศ์ สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม

2. น.ส. หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์ คณะทรัพยากรชีวภาพ และ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สถานที่ทดลองและเก็บข้อมูล: คณะทรัพยากรชีวภาพ และ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และ สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม 75/1 ถ. พระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 โทร 02-2461743 โทรสาร 02-2462134

1. บทคัดย่อ

งานวิจัยที่เสนอในรายงานฉบับนี้มี 4 ส่วน ประกอบด้วย ส่วนที่ 1 การศึกษาวิจัยเพื่อหาความเข้มข้นของเซลล์ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ KM 71 ที่เหมาะสมก่อนการเหนี่ยวนำให้ผลิต human growth hormone (hGH) โดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร และ 15 ลิตร ส่วนที่ 2 การทำ hGH ให้บริสุทธิ์ ส่วนที่ 3 การปรับขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และส่วนที่ 4 การวิเคราะห์หาปริมาณ host cell protein contamination (HCP) ในผลิตภัณฑ์ hGH

ในส่วนที่ 1 ทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสูง (high cell density cultivation) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีน เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงขยายขนาดการเลี้ยงในถังหมักเป็นขนาด 15 ลิตร การเพาะเลี้ยงแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ ช่วงการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch phase) ช่วงการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch phase) โดยใช้การป้อนสารอาหารแบบ exponential และช่วงสุดท้ายเป็นการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน (induction phase) ในช่วงการหมักแบบกะ (batch fermentation) ใช้ glycerol เริ่มต้นที่ 40-50 กรัมต่อลิตร โดยควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 และรักษาระดับออกซิเจนที่ไม่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมโดยการเพิ่มความเร็วใบพัด และการให้อากาศ โดยผสมรวมกับออกซิเจนในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 จนได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 25 กรัมต่อลิตร ในส่วนของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch) ได้ทำการป้อน glycerol เข้าสู่ระบบการหมักโดยอาศัยเทคนิคการป้อนสารอาหารแบบเอ็กโปเนนเชียล (exponential) ในการคำนวณอัตราการป้อนสารอาหารนั้น จะคิดจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) และคำนึงถึงค่าขีดจำกัดการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโต (limited substrate utilization rate for growth) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสะสมของ by-product และควบคุมปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ให้เป็นไปตามที่ต้องการ จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยีสต์ผลิตโปรตีน โดยการป้อน methanol เข้าสู่ระบบ เพื่อให้เซลล์ยีสต์ใช้เป็นแหล่งอาหาร และผลิตโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งก่อนเข้าสู่ระยะการเหนี่ยวนำนี้ ในถังหมักต้องมีความเข้มข้นเซลล์ และอัตราการป้อน methanol ที่เหมาะสม โดยจะทำการป้อน methanol แบบกะให้มีความเข้มข้นในระบบเป็นประมาณ 4 กรัมต่อลิตร และปล่อยให้เซลล์ยีสต์ใช้ methanol เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการป้อน methanol จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต hGH ที่ได้จากการทดลองในถังหมัก 2 ลิตร คือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นการเหนี่ยวนำให้สร้าง hGH เท่ากับประมาณ 150 กรัมต่อลิตร และอัตราการป้อน methanol ที่ประมาณ 0.033 กรัม methanol ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง โดยปรับลดการควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 22 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 เพื่อลดการทำงานของเอ็นไซม์

protease ในช่วงการเหนี่ยวนำให้สร้าง hGH ความเข้มข้นสูงสุดของ hGH ที่ผลิตได้ในการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร อยู่ในระดับ 0.004-0.426 กรัมต่อลิตร ค่าสัดส่วนของ hGH กับน้ำหนักเซลล์แห้ง อยู่ในช่วง 0.028–7.212 มิลลิกรัมต่อกรัม และได้สัดส่วนของ hGH กับโปรตีนรวมที่ 0.2-94.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้จากการทดลองในถังหมักขนาด 15 ลิตร โดยใช้ปริมาตรของน้ำหมักเริ่มต้นก่อนการ feed methanol ที่ 8 ลิตร และมีอัตราการป้อน methanol ในช่วงการป้อน คงที่ที่ 0.035 ลิตรต่อลิตร ของ methanol ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ hGH ที่ผลิตได้ในการทดลองในถังหมักขนาด 15 ลิตรอยู่ในระดับ 0.5-1.2 กรัมต่อลิตร ค่าสัดส่วนของ hGH กับน้ำหนักเซลล์แห้ง อยู่ในช่วง 3.7 – 6.9 มิลลิกรัมต่อกรัม และได้สัดส่วนของ hGH กับโปรตีนรวมมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเวลาในการเหนี่ยวนำให้สร้าง hGH ที่ประมาณ 65-72 ชั่วโมง

ในส่วนที่ 2 การศึกษาการแยก hGH ออกจากโปรตีนอื่นทำได้โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการดักจับโปรตีน (capture) ตามด้วยขั้นตอนการแยกโปรตีนที่ไม่ต้องการอื่นออก (intermediate) และขั้นตอนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ขั้นสุดท้าย (polishing) ทั้งนี้เพื่อให้กระบวนการแยกโปรตีนมีประสิทธิภาพ จึงมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ในแต่ละขั้นตอนในคอลัมน์ขนาดเล็กก่อน หลังจากนั้นเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงนำมาปรับใช้กับคอลัมน์ขนาดใหญ่ โดยการศึกษาเริ่มจากการนำน้ำหมักมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้ส่วนใส (supernatant) แยกออกมา และนำส่วนนี้ไปแยกเกลือออกด้วยวิธี dialysis โดยใช้ถุง dialysis หรือใช้เทคนิคการกรอง (ultra filtration) โดยใช้เมมเบรน (membrane) ขนาด 5 kDa ตัวอย่างส่วนใสที่แยกเกลือออกแล้วนำไปผ่านขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ชนิดของคอลัมน์และสภาวะที่ใช้สามารถสรุปได้ ดังนี้ ขั้นตอนการ capture ใช้คอลัมน์ Q-Sepharose Fast Flow ขนาด 600 มิลลิลิตร ด้วย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 gradient 0-35% buffer B (Tris-HCl buffer with 1 M NaCl) 10 column volume (CV) ด้วยอัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อนาที ขั้นตอน intermediate ใช้คอลัมน์ DEAE-Sepharose Fast Flow ขนาด 80 มิลลิลิตร ด้วย phosphate buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 gradient 0-15% buffer B (phosphate buffer with 1 M NaCl) 40 CV ด้วยอัตราการไหล 13 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับขั้นตอน polishing ใช้คอลัมน์ Source 30Q ขนาด 20 มิลลิลิตร ด้วย Tris-HCl ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 gradient 0-15%, 40 CV ด้วยอัตราการไหล 3 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวอย่างที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ในแต่ละขั้นตอนนั้นได้นำมาวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วยสี coomassie blue และ silver ผลการวิเคราะห์ตรวจได้จากแถบสีที่พบบนแผ่นเจลปรียบเทียบกับแถบ standard ของ hGH และจากผล

ของเจล SDS-PAGE พบว่าตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Source 30Q ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการแยกโปรตีน มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์

ส่วนที่ 3 เป็นการปรับขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ Butyl Fast Flow แทนการใช้คอลัมน์ DEAE-Sepharose Fast Flow ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการดักจับโปรตีน (capture) โดยใช้คอลัมน์ Capto Q โดย equilibrate คอลัมน์และเตรียมตัวอย่างก่อน load ลงในคอลัมน์โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์และโปรตีนอื่น ๆ ถูกชะออกโดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ NaCl โปรตีนทั้งหมดที่ถูกชะออกจากคอลัมน์นำไปวิเคราะห์ SDS-PAGE เก็บส่วนที่มีฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์ทั้งหมดรวมกัน เอาเกลือออกโดยใช้คอลัมน์ desalt เพื่อเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในบัฟเฟอร์ที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไป ขั้นตอนที่สองเป็นการแยกโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนออกไป (intermediate) โดยคอลัมน์ Butyl Fast Flow ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนที่จะ load ลงไปในคอลัมน์ โดยใช้บัฟเฟอร์ sodium phosphate ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 และมีเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตผสมอยู่ด้วย การชะฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์และโปรตีนอื่น ๆ ทำได้โดยการลดความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับการใช้คอลัมน์นี้ก่อนที่จะได้สภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง ได้มีการศึกษาหาความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในตัวอย่างและบัฟเฟอร์ โดยเตรียมตัวอย่างและบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแตกต่างกัน 3 ค่า คือ 0.5 โมลาร์ 1.0 โมลาร์ และ 1.5 โมลาร์ และพบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 โมลาร์ มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้เตรียมตัวอย่างและบัฟเฟอร์เพราะทำให้มีการแยกโปรตีนต่าง ๆ ออกจากกันได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และแยกโปรตีนได้ดีเท่ากับที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้มีการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน 3 ค่า ได้แก่ 5.0, 6.0 และ 7.0 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในการแยกโปรตีนจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 เพราะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ใกล้เคียงกับความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในขั้นตอนแรก ในขั้นตอนสุดท้ายของการแยกฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์ (polishing) ได้ใช้คอลัมน์ Source 15Q เพื่อทำให้ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์ให้มีความบริสุทธิ์ที่สุด ในขั้นตอนนี้ได้มีการศึกษาการชะของโปรตีนโดยใช้ gradient ที่แตกต่างกัน รวมทั้งการใช้ การ hold gradient มาช่วย เพื่อทำให้ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์มีความบริสุทธิ์ที่สุดและทำให้ได้ recovery มากที่สุด หลังจากผ่านกระบวนการแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีทั้ง 3 ขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ทำให้ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และได้ recovery ประมาณ 16.46 เปอร์เซ็นต์

สำหรับในส่วนที่ 4 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ HCP ในผลิตภัณฑ์ hGH โดยปริมาณของ HCP ต้องอยู่ในระดับมาตรฐานคือไม่เกิน 10 ppm ทำได้โดยนำฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีให้บริสุทธิ์แล้ว นำมาเปลี่ยนบัฟเฟอร์ให้อยู่ในน้ำ deionized (DI) และทำให้อยู่ในรูปแห้งด้วยวิธี freeze dry นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ HCP ด้วยวิธี ELISA พบว่าค่าของ HCP ที่ตรวจพบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในมนุษย์มีค่า 0.027 ppm ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้

คำสำคัญ : *Pichia pastoris*, การเติมอาหารแบบ Exponential, Human growth hormone, Protein purification