

DOWNSTREAM BIOPROCESS OPTIMIZATION OF BOVINE GAMMA GLOBULIN AS A PROTEIN MODEL FOR THE PREPARATION OF F(AB')₂

Chutamas CHANASUK^{1*}, Wanatchaporn ARUNMANEE², Patanachai LIMPIKIRATI³ and Veerakiet BOONKANOKWONG⁴

1 Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand; 6470049033@student.chula.ac.th (Corresponding Author)

2 Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand

3 Department of Food and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand

4 Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand

ARTICLE HISTORY

Received: 24 November 2023

Revised: 13 December 2023

Published: 25 December 2023

ABSTRACT

This work was aimed to study pH and temperature effects on the digestion process of IgG to F(ab')₂. Experiments were designed with 2 factors and 2 levels of each factor, and bovine gamma globulin was used as a protein model. Purification process of F(ab')₂ was performed by using centrifugal filtration. Purity and secondary structure of F(ab')₂ after digestion and purification process were evaluated by size exclusion chromatography (SEC) and circular dichroism (CD) spectroscopy, respectively. Results of the study showed that: (a) pH has more effect on the digestion process than does a temperature, (b) centrifugal filtration with a molecular weight cut off (MWCO) at 30K could yield F(ab')₂ with a purity up to 89%, as determined by SEC, and (c) it could be estimated from CD measurement of F(ab')₂ that its secondary structure comprise parallel β 32.6%, antiparallel β 44.7%, α -Helix 0.0% and other structure 22.7%.

Keywords: F(ab')₂, Bovine gamma globulin, Protein purification

CITATION INFORMATION: Chanasuk, C., Arunmanee, W., Limpikirati, P., & Boonkanokwong, V. (2023). Downstream Bioprocess Optimization of Bovine Gamma Globulin as a Protein Model for the Preparation of F(ab')₂. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 1(12), 22

การปรับกระบวนการทางชีวภาพปลายน้ำให้ดีที่สุดของแกมมาโกลบูลิน จากวัวที่ใช้เป็นโปรตีนตัวแบบสำหรับการเตรียมเอฟเอบีไฟล์มทู

จุฑามาศ ชนะสุข^{1*}, วณิชพร อรุณมณี², พัฒนชัย ลิ้มปิกิริติ³ และ วีระเกียรติ บุญกนกวงศ์⁴

1 หลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 6470049033@student.chula.ac.th (ผู้ประพันธ์บรรณกิจ)

2 ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยโปรตีนจาก IgG เป็น $F(ab')_2$ โดยออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล 2 ตัวแปรตัวแปรละ 2 ระดับและใช้โปรตีนตัวแบบเป็นแกมมาโกลบูลินของวัว ศึกษาการกรองโปรตีนโดยใช้ centrifuge tube filtration เพื่อให้ได้ $F(ab')_2$ ที่ได้จากการบวนการตัดโปรตีนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ความบริสุทธิ์และโครงสร้างทุติยภูมิของ $F(ab')_2$ หลังจากกระบวนการย่อยและกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ถูกประเมินโดย size exclusion chromatography (SEC) และ circular dichroism (CD) ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า 1) ปัจจัยค่าความเป็นกรดต่างส่งผลต่อการประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยโปรตีนมากกว่าปัจจัยด้านอุณหภูมิเมื่อกำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อกระบวนการตัดโปรตีนเป็นค่าคงที่เดียวกัน 2) Centrifuge tube filtration ที่ MWCO 30K สามารถทำให้ $F(ab')_2$ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยพิจารณาจากผลวิเคราะห์ด้วย SEC พบว่ามี $F(ab')_2$ 89% และ 3) สามารถประมาณโครงสร้างทุติยภูมิของ $F(ab')_2$ โดยใช้ circular dichroism พบโครงสร้างทุติยภูมิประกอบด้วยชนิด Parallel β 32.6% ชนิด Antiparallel β 44.7% α -Helix 0.0% และโครงสร้างอื่นๆ 22.7%

คำสำคัญ: เอฟเอบีไฟล์มทู, การย่อยโปรตีน, การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ข้อมูลอ้างอิง: จุฑามาศ ชนะสุข, วณิชพร อรุณมณี, พัฒนชัย ลิ้มปิกิริติ และ วีระเกียรติ บุญกนกวงศ์. (2566). การปรับกระบวนการทางชีวภาพปลายน้ำให้ดีที่สุดของแกมมาโกลบูลินจากวัวที่ใช้เป็นโปรตีนตัวแบบสำหรับการเตรียมเอฟเอบีไฟล์มทู. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 1(12), 22

บทนำ

ปัจจุบันมีการพัฒนายาในกลุ่มยาชีววัตถุ (Biologics) หลากหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือการนำอิมมูโนโกลบูลิน จี (Immunoglobulin G: IgG) มาพัฒนาใช้ทางการแพทย์ทั้งในส่วนของการใช้เพื่อรักษาโรคและใช้ในการวินิจฉัยโรค เนื่องจากมีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูง มีการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody: mAb) ขึ้นมาในระดับอุตสาหกรรมและถูกนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับยาในกลุ่มยาชีววัตถุที่มีโครงสร้างลักษณะอื่น (Data Bridge Market Research, 2022) มีข้อมูล que แสดงว่าตลาดของยากลุ่มยาชีววัตถุยังมีแนวโน้มของการเติบโตอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนแบ่งทางการตลาดของ mAb ก็มีการเติบโตอย่างต่อเนื่องด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของยอดจำหน่ายโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วงปี 2019 คิดเป็นประมาณร้อยละ 70 ของมูลค่าการจำหน่ายยาในกลุ่มยาชีววัตถุทั่วโลก (Ecker, Crawford, & Seymour, 2020) มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาชีววัตถุโดยสารสำคัญเป็น IgG ที่มีการตัดให้เหลือเฉพาะส่วนของโครงสร้างเอพไพอีพริมาท (F(ab')₂) ซึ่งพบได้มากในยากลุ่มที่พัฒนาเป็นเซรุ่มต้านพิษงูและแอนติซีรัม (Antiserum) ชนิดต่างๆ เช่น F(ab')₂ ของอิมมูโนโกลบูลินที่ได้จากม้าสำหรับต้านบาดทะยัก (Equine Anti-Tetanus Immunoglobulin F(ab')₂ Fragments) (Zhang et al., 2018) และ F(ab')₂ ของอิมมูโนโกลบูลินที่ได้จากม้าสำหรับต้านพิษสุนัขบ้า (Equine Anti-Rabies Immunoglobulin F(ab')₂ Fragments) (Kittipongwarakarn et al., 2011) ในช่วงที่มีการระบาดของเชื้อโควิด (Coronavirus SARS-CoV-2) พบงานวิจัยที่นำ F(ab')₂ มาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อโควิดโดยใช้ F(ab')₂ ที่สกัดได้จากเลือดม้าซึ่งเป็นการรักษาในลักษณะที่ได้ภูมิคุ้มกันแบบรับมา (Passive Immunotherapy) ด้วยกลไกการป้องกันไม่ให้ไวรัสเกาะติดและเข้าสู่เซลล์ของผู้ที่ได้รับเชื้อไวรัส (Gupta et al., 2022) เป็นต้น จากตัวอย่างงานวิจัยและผลิตภัณฑ์ที่กล่าวมาข้างต้นได้เลือกใช้ส่วนของโครงสร้าง IgG ชนิด F(ab')₂ เนื่องจากการตัดส่วนของโครงสร้างที่เป็นเอฟซี (FC) ออกไปสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ซึ่งเกิดจากความแตกต่างระหว่างสัตว์ต่างสายพันธุ์ (Pei et al., 2020) ลดความเสี่ยงจากการเพิ่มการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับแอนติบอดี (Antibody-Dependent Enhancement of Infection: ADE) และปฏิกิริยาที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายไวต่อสิ่งกระตุ้นมากผิดปกติ (serum sickness) (Gupta et al., 2022: 1) ตลอดจนการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ (Complement) และการเกิดอาการแพ้ที่รุนแรง (Anaphylaxis Reactions) (Kittipongwarakarn et al., 2011)

การทบทวนวรรณกรรม

โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินมีลักษณะคล้ายตัวอักษรวาย (Y) ประกอบไปด้วยสายโปรตีนทั้งหมด 4 สาย มีสายโปรตีนสายหนัก (Heavy Chain) จำนวน 2 สาย และสายโปรตีนสายเบา (Light Chain) จำนวน 2 สาย หน้าที่การทำงานของอิมมูโนโกลบูลินคือการจับกับแอนติเจนโดยใช้ส่วนของแอนติบอดีที่มีหน้าที่จับแอนติเจน (Fragment Antigen-Binding, Fab) และมีชิ้นส่วนเอฟซี (Fragment Crystallizable Region: FC) ทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารกิจกรรมทางชีวภาพ (Biological Activity) (Antibody Structure, Function, Classes and Formats, 2021)

ส่วน F(ab')₂ สามารถได้มาจากการขบวนการย่อยโปรตีนโดยการตัด IgG ซึ่งมีขนาดประมาณ 150 กิโลดาลตันด้วยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) ผลที่ได้จากการย่อยจะเป็นส่วน F(ab')₂ ที่มีขนาดประมาณ 90 กิโลดาลตันและส่วนของโปรตีนที่มีขนาดต่างๆ (Low Molecular Weight Fractions) (Nasiri et al., 2017) สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เปปซินที่งานวิจัยแนะนำคือค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ในช่วง 2.80-4.40 (Kinman & Pompano, 2019) หรือช่วง 3.25-3.50 เอนไซม์เปปซินสามารถเสียรูปแบบไม่สามารถคืนกลับได้ที่ค่า pH ประมาณ 7 (Jones & Landon, 2002) นอกจากสภาวะความเป็นกรดต่างแล้ว ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการย่อยโปรตีนได้แก่ จำนวนโปรตีนตั้งต้น จำนวนเอนไซม์ที่ใช้ และระยะเวลาในการบ่ม (Incubating Time) (Kinman & Pompano, 2019) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อย IgG ให้เป็น F(ab')₂

โดยทั่วไปในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารละลายโปรตีนจะใช้เทคนิคการตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) เทคนิคนี้ใช้วิเคราะห์แยกส่วนประกอบภายในสารละลายโปรตีนโดยอาศัยขนาดของโมเลกุลและประจุของโปรตีนที่ต่างกันซึ่งทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของโปรตีนชนิดต่างๆ ผ่านตัวกลางที่เป็นอะคริลามายด์เจล (Acrylamide Gel) ภายใต้สนามไฟฟ้า ทำให้โมเลกุลโปรตีนสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วช้าต่างกัน โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่สามารถเคลื่อนที่บนเจลได้ระยะทางสั้นกว่าโปรตีนขนาดเล็ก สามารถประมาณการน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างได้โดยเทียบกับระยะทางของสารมาตรฐานโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight Marker) (Merck, 2023)

การวิเคราะห์ส่วนประกอบภายในสารละลายโปรตีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) นิยมใช้กับคอลัมน์ชนิดเอซซีซี (Size Exclusion Chromatography: SEC) การแยกโปรตีนขึ้นกับขนาดของโปรตีนและความสามารถของโปรตีนในการซึมผ่านช่องรูพรุนของอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ โปรตีนขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของอนุภาคในระยะทางที่น้อยกว่าโปรตีนขนาดเล็ก ดังนั้นโปรตีนขนาดใหญ่จะถูกวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ชะออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าโปรตีนขนาดเล็ก (Huang, Ch,i & Chien, 2018)

การวิเคราะห์โครงสร้างระดับสูงของโปรตีนสามารถใช้เทคนิคเซอร์คิวลาร์ไดโครอสมิซึม (Circular Dichroism: CD) โดยเครื่องมือวิเคราะห์จะวัดสัญญาณความแตกต่างระหว่างแสงโพลาไรซ์ชนิดหมุนขวาและหมุนซ้ายที่ผ่านสารละลายโปรตีนตัวอย่างซึ่งจะมีการดูดกลืนแสงไปบางส่วน การประเมินลักษณะโครงสร้างระดับสูงของโปรตีนตัวอย่างจะอ้างอิงจากลักษณะเฉพาะของกราฟความสัมพัทธ์ระหว่างค่าเดลตาเอปไซลอน ($\Delta\epsilon$) หรือองศาความรี (Degrees Ellipticity) และความยาวคลื่น (Wave Length) (Greenfield, 2006: 2876)

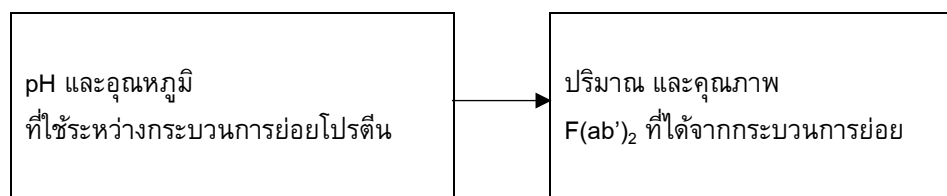
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายโปรตีนสามารถใช้ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Pierce™ BCA Protein Assay Kits) ใช้หลักการที่ประยุกต์มาจากการทำปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) ระหว่างโปรตีนและคอปเปอร์ไอออนในตัวกลางที่มีความเป็นด่าง และใช้กรดบิซินโชนิค (Bicinchoninic Acid: BCA) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับคิวปรัสไอออน (Cuprous Cation: Cu^{1+}) ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง (Thermo Fisher Scientific, 2023)

สมมติฐานการวิจัย

การย่อยโปรตีนแต่ละชนิดจำเป็นต้องใช้ช่วงของสภาวะที่อาจมีความแตกต่างกัน โดยปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยโปรตีนได้แก่ ชนิดของโปรตีน ความเข้มข้นของโปรตีน ชนิดของเอนไซม์ แหล่งที่มาของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ค่า pH ขณะทำการย่อยโปรตีน ระยะเวลาที่ใช้ และอุณหภูมิขณะทำการย่อยโปรตีน

ในการศึกษานี้จะทำการย่อย IgG ให้ได้เป็น $F(ab)_2$ ด้วยเอนไซม์เปปซิน โดยจะทำการศึกษาผลของปัจจัยในกระบวนการย่อยโปรตีน 2 ปัจจัย ได้แก่ ค่า pH และอุณหภูมิที่ใช้ระหว่างกระบวนการย่อยโปรตีน ซึ่งจะกำหนดปัจจัยอื่นๆ ให้เป็นค่าคงที่

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

กระบวนการย่อยโปรตีน

แกมมาโกลบูลินจากวัว (Bovine Gamma Globulin) (Millipore, USA) ความเข้มข้น 2 mg/ml, เอนไซม์เปปซิน (MP Biomedicals Europe, France) ความเข้มข้น 50 mg/ml กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid) ความเข้มข้น 1 N และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) ความเข้มข้น 1 N ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารละลายทั้งหมดของกระบวนการย่อยโปรตีน

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าโปรตีนจะใช้เวลาสำหรับกระบวนการย่อยอย่างสมบูรณ์ที่ช่วงเวลา 1.5-2 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ 42 ml: 2 μ l ดังนั้นจึงทำการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial Design) เพื่อศึกษาผลของ 2 ตัวแปรได้แก่ ค่า pH และอุณหภูมิของสารละลายโปรตีนระหว่างกระบวนการย่อย โดยแต่ละตัวแปรจะทำการศึกษาที่ 2 ระดับซึ่งมีรายละเอียดดังตารางที่ 1 กำหนดระยะเวลาของกระบวนการย่อยที่ 1.5 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

ตารางที่ 1 การทดลองแบบแฟกทอเรียลเพื่อศึกษา 2 ตัวแปร ตัวแปรละ 2 ระดับ

ตัวแปรที่ทำการศึกษา		อุณหภูมิระหว่างกระบวนการย่อยโปรตีน	
		37.5 °C (-)	38.5 °C (+)
pH ระหว่างกระบวนการย่อยโปรตีน	2.71-3.10 (-)	-, - B, F	-, + D, H
	3.11-3.50 (+)	+, - A, E	+, + C, G

กระบวนการกรองโปรตีน

ในการศึกษาใช้หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงเพื่อกรอง (Centrifuge Tube Filtration) ที่มีค่าขนาดการกรอง (MWCO) 30 kDa (Macrosep™, Pall, USA) ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อกรองจำนวน 5 รอบ ตั้งอุณหภูมิขณะปั่นเหวี่ยงที่ 20 °C ใช้แรง 5000 g เป็นระยะเวลา 30 นาที/รอบ ซึ่งในแต่ละรอบหลังจากปั่นเสร็จจะเติม 100 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 เพื่อละลายส่วนที่กรองได้ก่อนทำการกรองในรอบต่อไป หลังจากการกรองรอบสุดท้ายจะทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้ 100 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 สะโปรตีนออกจากอุปกรณ์การกรองและปรับปริมาตรสุดท้ายที่ 4 ml

การวิเคราะห์โปรตีน

1) การวิเคราะห์เบื้องต้นโดย SDS-PAGE

ทำการเตรียม Acrylamide Gel 2 ส่วนได้แก่ เจลส่วนล่าง (Resolving Gel) และเจลส่วนบน (Stacking Gel) ชั้นเจลส่วน Resolving Gel มีองค์ประกอบของ Acrylamide 10% เตรียมจากการผสมน้ำกลั่น 4.8 ml 40% Acrylamide 2.5 ml 1.5M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml 10% SDS 100 μ l 10% APS 100 μ l และ TMED 4 μ l ชั้นเจลส่วน stacking gel เตรียมจากการผสมน้ำกลั่น 2.99 ml 40% acrylamide 623 μ l 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.26 ml 10% SDS 50 μ l 10% APS 50 μ l และ TMED 5 μ l ใช้กระแสไฟที่ 200 โวลต์ระยะเวลา 60 นาที (Luo et al., 2017) (Merck, 2023) จากนั้นย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD, USA)

2) การวิเคราะห์โดย Size Exclusion Chromatography

ในการศึกษานี้ใช้คอลัมน์ Yarra SEC 3000 columns (300×7.8 mm) (Phenomenex, USA) กับเครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) ใช้ Mobile Phase เป็น 0.025% Na₂S₂O₃ ใน 100 mM Phosphate Buffer pH 6.8 กำหนดอัตราการไหล (Flow Rate) ที่ 1 ml/min และตรวจวัดด้วย UV Detector ความยาวคลื่น 280 nm

3) การวิเคราะห์โดย Circular Dichroism Spectroscopy

ใช้เครื่อง Jasco J-815 Spectropolarimeter (Jasco, Japan) แสแกนช่วงความยาวคลื่น 190-250 nm ใช้ความเร็วในการแสแกน 20 nm/min ตั้งค่า band width ที่ 1.00 nm ใช้ cuvette ขนาด 1 cm และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัดจำนวน 3 รอบ

4) การวิเคราะห์โดย Pierce™ BCA Protein Assay Kits

ทำการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin: BSA) ที่ความเข้มข้นช่วง 125-2000 µg/ml เพื่อสร้างสมการกราฟสำหรับคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายโปรตีนตัวอย่างเติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารละลายที่มาพร้อมชุดทดสอบ (Working Reagent) นำไปใส่เครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

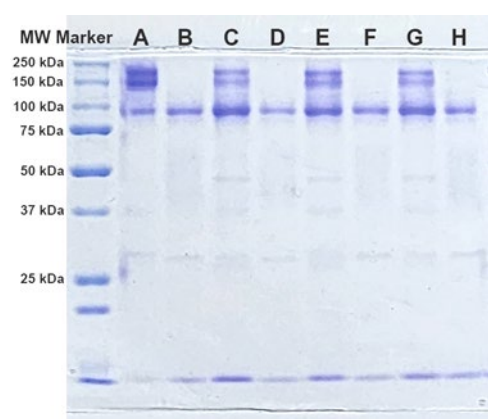
ผลการวิจัย

กระบวนการย่อยโปรตีน

จากการศึกษาการย่อย IgG ให้ได้เป็น $F(ab')_2$ ด้วยเอนไซม์เปปซิน โดยจะทำการศึกษาผลของปัจจัยในกระบวนการย่อยโปรตีน 2 ปัจจัยได้แก่ค่า pH และอุณหภูมิที่ใช้ระหว่างกระบวนการย่อยโปรตีนใช้ค่าจริงตามรายละเอียดในตารางที่ 2 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งพบว่า IgG น่าจะถูกย่อยได้หมด จากตัวอย่างสารละลายโปรตีนรหัส B, D, F และ H ซึ่งเป็นสภาวะที่ค่า pH อยู่ในช่วง 2.71-3.10 สังเกตจากบริเวณแถบที่ตรงกับ molecular weight marker ประมาณ 150 kDa ซึ่งแสดงถึง IgG หายไป ในส่วนของตัวแปรอุณหภูมิที่ 37.5 °C และ 38.5 °C อาจส่งผลการย่อยได้แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 2 ค่า pH และอุณหภูมิที่ใช้จริงในกระบวนการย่อยโปรตีน

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	pH	อุณหภูมิ
ชุดที่ 1	A	3.50	37.5 °C
	B	2.77	37.5 °C
	C	3.29	38.5 °C
	D	2.85	38.5 °C
ชุดที่ 2	E	3.22	37.5 °C
	F	2.89	37.5 °C
	G	3.11	38.5 °C
	H	2.87	38.5 °C



ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์เบื้องต้นด้วย SDS-PAGE

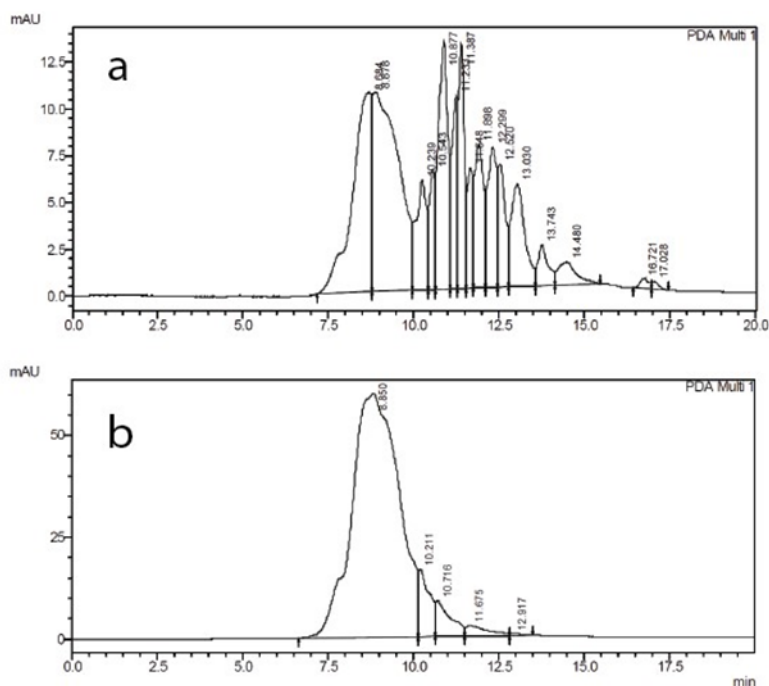
กระบวนการกรองโปรตีน

ได้นำตัวอย่างสารละลายโปรตีนรหัส B, D, F และ H มาทำการกรองซึ่งการกรองด้วย Macrosep™ MWCO 30 kDa ช่วยกำจัดเอาโปรตีนขนาดเล็กที่ไม่ต้องการออก ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน พร้อมทั้งใช้ในการเปลี่ยนตัวทำละลายจากเดิมโปรตีนละลายอยู่ในน้ำ ขั้นตอนนี้จะเปลี่ยนโปรตีนไปอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ส่วนตัวอย่างสารละลายโปรตีนรหัส A, C, E และ G ยังตัดตัว IgG ได้ไม่หมดจึงไม่นำตัวอย่างมาทำการกรอง

ผลการวิเคราะห์โปรตีน

1) การวิเคราะห์โดย Size Exclusion Chromatography

นำตัวอย่าง B, D, F และ H รวมกันแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย SEC เทียบระหว่างก่อนและหลังกรองได้โครมาโตแกรม (Chromatogram) ดังแสดงในรูปที่ 3a และ 3b และมีรายละเอียดของ % peak area ของ Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายโปรตีนหลังทำการกรองดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 3 chromatograms ของสารละลายโปรตีน (a) ก่อนทำการกรอง (b) หลังทำการกรอง

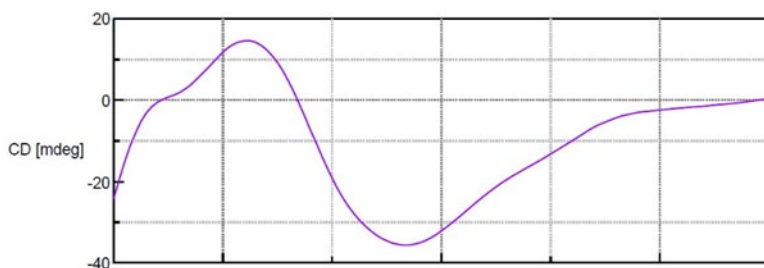
ตารางที่ 3 ค่า % Peak Area ของ Chromatogram (3b) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายโปรตีนหลังทำการกรอง

PDA Chl 280nm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.850	5733762	59671	88.542	67.887
2	10.211	358626	16524	5.538	18.799
3	10.716	263617	8712	4.071	9.911
4	11.675	111278	2564	1.718	2.917
5	12.917	8470	426	0.131	0.485
Total		6475754	87898	100.000	100.000

2) การวิเคราะห์โดย Circular Dichroism Spectroscopy

นำตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่ผ่านการกรองแล้วมาเจือจางให้ความเข้มข้นลดลง 40 เท่า แล้วทำการวิเคราะห์ด้วย CD ได้ผลเป็นไปตามกราฟดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์เข้าโปรแกรม Bestsel เพื่อประเมินโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนพบว่าโครงสร้างหลักเป็นเบต้าชีท (β -sheet) ชนิดพาราเลล (Parallel) 32.6% ชนิดแอนติพาราเลล (Antiparallel) 44.7% แอลฟาเฮลิคซ์ (α -helix) 0.0% และโครงสร้างอื่น ๆ 22.7%



ภาพที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Degrees Ellipticity และ Wave Length

3) การวิเคราะห์โดย Pierce™ BCA Protein Assay Kits

นำตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่ผ่านการกรองแล้วนำมาเจือจางให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า แล้วนำไปวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างสารละลายโปรตีนมีค่าความเข้มข้น 7,154.55 $\mu\text{g/ml}$

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาเมื่อกำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนให้คงที่ พบว่า ตัวแปรค่า pH ของสารละลายโปรตีนระหว่างกระบวนการย่อยมีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนมากกว่าตัวแปรด้านอุณหภูมิ เมื่อใช้ค่า pH ในช่วง 2.7-3.1 ซึ่งเป็นช่วง pH ค่าต่ำของการทดลองสามารถย่อยตัว IgG ได้หมด แต่ค่า pH ในช่วง 3.1-3.5 ซึ่งเป็นช่วง pH ค่าสูงของการทดลองไม่สามารถย่อยตัว IgG ได้หมด ต่างจากช่วงของค่า pH ที่มีการแนะนำในงานวิจัยของ Kinman and Pompano (2019) และ Jones and Landon (2002) ประสิทธิภาพในการย่อยที่ต่างกันนี้อาจเป็นผลมาจากเอนไซม์เปปซินจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกันทำให้คุณสมบัติและประสิทธิภาพของเอนไซม์อาจแตกต่างกัน นอกจากนี้โปรตีนตัวแบบของการศึกษานี้เป็นคอนเดนซิดกับโปรตีนในงานวิจัยดังกล่าวอาจส่งผลต่ออัตราการย่อยที่ต่างกันได้ในส่วนของตัวแปรอุณหภูมิที่กำหนดให้ค่าสูงเป็น 38.5 $^{\circ}\text{C}$ ค่าต่ำเป็น 37.5 $^{\circ}\text{C}$ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยใกล้เคียงกัน

การกรองโปรตีนด้วย Macrosep™ MWCO 30 kDa ให้ผลการกรองและสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนในระดับที่ดี สามารถวัดความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนหลังการกรองได้ที่ 7,154.55 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมี% area ของ peak หลักซึ่งคาดว่าเป็น F(ab)'_2 ประมาณ 89% มี impurity เป็นโปรตีนชนิดน้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 11% และเบื้องต้นไม่พบ impurity เป็นโปรตีนชนิดน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งเกี่ยวข้องกับประเด็นด้านความปลอดภัยของยาที่พัฒนาจากโปรตีน ในส่วนของโครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีนยังพบว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยและการกรองมาแล้วยังปรากฏโครงสร้างหลักที่มี β -sheet ชนิด Parallel 32.6% ชนิด Antiparallel 44.7% Helix 0.0% และโครงสร้างอื่นๆ 22.7% ซึ่งสอดคล้องตามงานวิจัยของ Janda and Casadevall (2010) ที่ประเมินว่าโครงสร้างของ IgG มี β -sheet มากกว่า 40% อาจมีเล็กน้อยหรือไม่ α -helix และมีโครงสร้างอื่นๆ ประมาณ 30-40% และสอดคล้องตามงานวิจัยของ Castillo (2019) ที่ระบุว่าส่วนของ Fab มีโครงสร้างทุติยภูมิซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เป็นชั้น β -sheet

ข้อเสนอแนะที่ได้รับจากการวิจัย

ค่าตัวแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษานี้อาจเป็นช่วงที่แคบเกินกว่าจะเห็นผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการตัดโปรตีนที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

อาจศึกษาปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการตัดโปรตีนเพิ่มเติมหรือทำการศึกษปัจจัยในช่วงที่กว้างขึ้นเพื่อให้ได้รับข้อมูลที่ครอบคลุมมากขึ้น นอกจากนี้อาจศึกษาการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอื่นเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่มีความละเอียดมากขึ้นในการศึกษา Impurity

เอกสารอ้างอิง

- Castillo, N. C. (2019). *Stability and aggregation-prone conformations of an antibody fragment antigen-binding (Fab)*. Retrieved from <https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10075185/>.
- Data Bridge Market Research. (2022). *Global Biologics Market-Industry Trends and Forecast to 2029*. Retrieved from <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-biologics-market>.
- Ecker, D. M., Crawford, T. J., & Seymour, P. (2020). *The Therapeutic Monoclonal Antibody Product Market*. Retrieved from <https://bioprocessintl.com/business/economics/the-market-for-therapeutic-mab-products/>.
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, 1(6), 2876-2890.
- Gupta, D. et al. (2022). Equine immunoglobulin fragment F(ab')₂ displays high neutralizing capability against multiple SARS-CoV-2 variants. *Clinical Immunology*, 237, 1-10.
- Huang, T. Y., Chi, L. M., & Chien, K. Y. (2018). Size-exclusion chromatography using reverse-phase columns for protein separation. *Journal of Chromatography A*, 1571, 201-212.
- Janda, A., & Casadevall, A. (2010) Circular Dichroism Reveals Evidence of Coupling Between Immunoglobulin Constant and Variable Region Secondary Structure. *Molecular immunology*. 47(7-8), 1421-1425.
- Jones, R. G. A., & Landon, J. (2002). Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F(ab')₂ fragments in high yield from serum. *Journal of Immunological Methods*, 263, 57-74.
- Kinman, A. W., & Pompano, R. R. (2019). Optimization of Enzymatic Antibody Fragmentation for Yield, Efficiency, and Binding Affinity. *Bioconjugate chemistry*, 30(3), 800-807.
- Kittipongwarakarn, S. et al. (2011). New method to produce equine antirabies immunoglobulin F(ab')₂ fragments from crude plasma in high quality and yield. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 189-195.
- Merck. (2023). *Introduction to SDS-PAGE-Separation of Proteins Based on Size*. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-page>.
- Nasiri, H. et al. (2017). Production and purification of polyclonal antibody against F(ab')₂ fragment of human immunoglobulin G. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 8(4), 307-312.
- Pei, Z. et al. (2022). Canine immunoglobulin F(ab')₂ fragments protect cats against feline parvovirus virus infection. *International Immunopharmacology*, 86, 1-7.
- Sinobiological. (2021). *Antibody Structure, Function, Classes and Formats*. Retrieved from <https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/antibody-structure-function>.
- ThermoFisherScientific. (2023). *Pierce™ BCA Protein Assay Kits*. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>.
- Zhang, X. J. et al. (2018). Functional and proteomic comparison of different techniques to produce equine anti-tetanus immunoglobulin F(ab')₂ fragments. *Journal of Chromatography B*, 29-39.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2023 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).